





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



## **ROSIGLITAZONA Y EXPRESIÓN DE ABCA1:**

**Efectos sobre el nivel de colesterol de membrana plasmática en el  
músculo esquelético de ratones obesos adultos**

**OSCAR ALBERTO QUINTEROS WALTEMATH**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOLOGÍA

Directoras de Tesis: Prof. Dra. Paola Llanos Vidal  
Prof. Dra. Sonja Buvinic Radic

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

**OSCAR ALBERTO QUINTEROS WALTEMATH**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiología en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 4 de septiembre de 2018.

**Prof. Dra. Paola Llanos**  
Directora de Tesis  
ICOD, Facultad de Odontología,  
Universidad de Chile

**Prof. Dra. Sonja Buvinic**  
Directora de Tesis  
ICOD, Facultad de Odontología,  
Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Mario Chiong**

**Prof. Dra. Gladys Tapia**

**Prof. Dr. Rodrigo Troncoso**

**Prof. Dra. Alejandra Espinosa**  
Presidenta de Comisión

“Somos arquitectos de nuestro propio destino”

**Albert Einstein**

**1879 - 1955**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer a todas las personas que de una u otra forma han aportado a la posibilidad de llevar a cabo este trabajo.

- A la comisión revisora de esta tesis, Doctores: Alejandra Espinosa, Mario Chiong, Rodrigo Troncoso y Gladys Tapia, por sus acertados consejos para finalizar este trabajo.
- A todos los integrantes del Laboratorio de la Dra. Hidalgo por facilitar tan amablemente sus equipos e instalaciones y especialmente a Luis por su apoyo desinteresado.
- Al Dr. Genaro Barrientos por poner a mi disposición todo su conocimiento.
- A todos los integrantes del Laboratorio de la Dra. Pedrozo, especialmente Mane, quienes nos acogieron en momentos difíciles.
- A mis compañeros de laboratorio actuales, Pablo, Paloma, Luan, Javiera, Pepe, Hugo. Y también pasados, Alexis, Giovanni, Roberto, Esteban y Cristian por acompañarme y ayudarme íntegramente en este proceso.
- A la Dra. Karina Robles por su confianza para permitir este proceso haciéndolo compatible con mi quehacer laboral.
- A mis directoras de Tesis, Dra. Sonja Buvinic por apoyar desinteresadamente este proyecto y a mi mentora, la Dra. Paola Llanos que desde el primer momento me contagió con su pasión por la ciencia y me apoyó de principio a fin en la realización de esta tesis.

Por supuesto, a mi familia, Luis, Jessica, Daniela, María Ignacia y Javiera por formarme como la persona que soy hoy y, especialmente a mi esposa Gabriela y nuestra hija Isabel que sin duda son el pilar que sostiene mi mundo.

Y a todos los que no puedo nombrar en estas pocas líneas, de verdad, ¡Muchas Gracias!

## **ÍNDICE GENERAL**

RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	10
Resistencia a la Insulina: aspectos epidemiológicos y moleculares .....	11
Músculo esquelético como principal captador de la glucosa por acción de la insulina .....	12
Colesterol y su acción sobre la señalización de insulina en el músculo esquelético .....	12
ABCA1 media el flujo de salida del colesterol celular .....	14
Receptores activados por los proliferadores de peroxisomas .....	15
PPAR $\gamma$ .....	16
Expresión de ABCA1 y PPAR $\gamma$ .....	19
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVOS .....	25
Objetivo General .....	26
Objetivo Específicos .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
RESULTADOS .....	33
Efectos fisiológicos del tratamiento con RSG en ratones HFD .....	33
El tratamiento con RSG no modifica los niveles proteicos de ABCA1 en ratones HFD .....	41
El tratamiento con RSG modifica el contenido de colesterol de fibras musculares de ratones obesos. ....	44
DISCUSIÓN .....	47
CONCLUSIONES .....	55
BIBLIOGRAFÍA .....	57

## **RESUMEN**

La resistencia a la insulina es un estado fisiopatológico altamente prevalente que antecede la aparición de diabetes tipo II. La obesidad como factor predisponente a estas patologías, se asocia a un estado de lipotoxicidad en áreas claves del metabolismo, interfiriendo en la señal de insulina especialmente en el músculo esquelético, tejido que capta gran parte de la glucosa en estados postprandiales. El colesterol, ha sido sugerido como un posible regulador de la sensibilidad a la insulina. En este contexto, la proteína ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1) media la extracción de colesterol de la célula y su disminución se asocia a una acumulación de colesterol y pérdida de la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético de ratón adulto. Se ha descrito en otros tejidos que la expresión de ABCA1 es inducida por agonistas farmacológicos del receptor nuclear PPAR $\gamma$  como rosiglitazona (RSG). Sin embargo, los efectos de su sobreexpresión en el músculo esquelético adulto aún no han sido estudiados. El objetivo principal de este trabajo es evaluar el contenido proteico de ABCA1 y los niveles de colesterol en la membrana plasmática tras la acción de RSG en músculo esquelético de ratones obesos.

Se inyectó intraperitonealmente 3 mg/kg/día de RSG o vehículo (VEH) durante 8 días a un modelo de ratón C57BL/6J alimentados con dieta alta en grasas (HFD) por 8 semanas (grupos HFD+RSG y HFD+VEH, respectivamente). Posterior al tratamiento, se analizaron parámetros fisiológicos como peso, glicemia, niveles de colesterol total y triglicéridos plasmáticos, grasas corporales, además de una prueba de tolerancia a la glucosa en ambos grupos. Los niveles proteicos de ABCA1 fueron medidos a través de Western blot en el músculo esquelético y los niveles de colesterol por Filipina III en fibras musculares aisladas desde el músculo Flexor digitor brevis (FDB).

La intervención con RSG disminuyó en un 14% los niveles de colesterol en fibras musculares esqueléticas posterior al tratamiento, pese a no modificar significativamente los niveles proteicos de ABCA1, presentando solo una tendencia al alza en el músculo FDB, por otro lado, el tratamiento no generó cambios en los parámetros fisiológicos, salvo presentar una tendencia a mejorar el control glicémico postprandial.

Estos resultados permitirán identificar alternativas de sobreexpresión de ABCA1 para entender su contribución en la acumulación de colesterol en la membrana plasmática de la célula muscular, con la finalidad futura de identificar su modulación en la sensibilidad a insulina del músculo esquelético en ratones obesos.

## **ABSTRACT**

ROSIGLITAZONE AND EXPRESSION OF ABCA1: Effects on the level of plasma membrane cholesterol in the skeletal muscle of adult obese mice.

Insulin resistance is a highly prevalent pathophysiological state that precedes the onset of type II diabetes. Obesity as a predisposing factor to these pathologies is associated with a state of lipotoxicity in key areas of metabolism, interfering in the insulin signal, especially in skeletal muscle, a tissue that acts as a metabolic regulator, capturing a large part of glucose in postprandial states. Cholesterol, an integral component of cell membranes, has been suggested as a possible regulator of insulin sensitivity. In this context, the ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1) protein mediates the extraction of cholesterol from the cell and its decrease is associated with an accumulation of cholesterol and loss of insulin sensitivity in adult mice skeletal muscle. It has been described in other tissues, that the expression of ABCA1 is induced by pharmacological agonists of nuclear PPAR $\gamma$  receptors like a rosiglitazone (RSG). However, the effects of overexpression in adult skeletal muscle have not yet been studied. The main objective of this work is to evaluate the protein content of ABCA1 and the levels of cholesterol in the membrane after the action of RSG in skeletal muscle of obese mice. 3 mg/kg/day of RSG or vehicle (VEH) was injected intraperitoneally for 8 days in a C57BL/6J mouse model fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks (HFD+RSG and HFD+VEH groups, respectively). After treatment, physiological parameters such as weight, blood glucose levels, plasmatic cholesterol levels, plasmatic triglycerides levels and body fat were analyzed, as well as a glucose tolerance test in both groups. Protein levels of ABCA1 were measured through Western blot in skeletal muscle and cholesterol levels by Filipin III in muscle fibers isolated from *Flexor digitor brevis muscle* (FDB). The intervention with RSG reduced the levels of cholesterol in skeletal muscle fibers after treatment by 14%, despite not modifying the protein levels of ABCA1, presenting only an upward trend in the FDB muscle, on the other hand, the treatment did not generate changes in physiological parameters, except to present a tendency to improve postprandial glycemic control.

These results will allow identify alternatives of ABCA1 overexpression and understanding their contribution in the accumulation of cholesterol in the plasma membrane with a future view to identify its modulation in skeletal muscle insulin sensitivity in obese mice.

## **INTRODUCCIÓN**

## Resistencia a la Insulina: aspectos epidemiológicos y moleculares

La resistencia a la insulina (RI) es un estado patológico que se define como la incapacidad del organismo para responder normalmente a las acciones de la insulina. La RI se encuentra relacionada a la obesidad y al estilo sedentario de vida, siendo responsable en gran medida de la aparición de la diabetes tipo II (DII)<sup>1,2</sup>, patología que crecerá en prevalencia a un 12,7% para el año 2035<sup>3</sup>. Estudios prospectivos han sugerido que la RI es el principal predictor en estimar si un individuo se convertirá en diabético tipo II<sup>2</sup>. Asimismo, se ha descrito que la RI afecta a un 24% de los adultos en Estados Unidos<sup>4</sup> y entre sus factores predisponentes destacan el sobrepeso y la obesidad. En Chile, la última encuesta nacional de salud 2016-2017 muestra que el sobrepeso afecta a ~40% de la población mientras que la obesidad a un 31%<sup>5</sup>.

Un desbalance entre el consumo nutricional y el gasto energético caracteriza a las personas obesas. En la condición de obesidad, el tejido graso presenta adipocitos hipertróficos que son menos sensibles a la insulina, con tasas mayores de liberación de ácidos grasos (AG)<sup>6</sup>. Esta concentración elevada de AG se asocia a acumulación ectópica de grasa en tejidos claves del metabolismo como el músculo esquelético y el hígado, fenómeno conocido como lipotoxicidad<sup>6</sup>, el cual, es uno de los aspectos más importantes de la RI, donde elevados niveles de ácidos grasos libres (AGL) generan metabolitos como diacilglicerol y ceramidas que causan alteraciones en la activación de la vía de la insulina, entre las que destacan, defectos en la actividad de los transportadores de glucosa 4 (GLUT4 por sus siglas en inglés), activación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K por sus siglas en inglés) y fosforilación en tirosina de los receptores de sustrato de insulina (IRS por sus siglas en inglés) en el músculo esquelético<sup>7</sup>. Por otra parte, obesidad, RI y DII son considerados estados proinflamatorios<sup>8</sup>, por ejemplo, el tejido adiposo blanco genera una inflamación crónica caracterizada por la infiltración de macrófagos y la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$  por sus siglas en inglés) e interleucina 6<sup>9</sup>. A esta condición se agrega una disminución de adiponectina, generando reducción de sus efectos insulino-sensibilizantes en sujetos obesos<sup>10</sup>. Dada la problemática epidemiológica, una clara comprensión de la RI y de los

mecanismos celulares y metabólicos que la subyacen, deben ser el primer paso para el éxito de la investigación en el campo de la DII.

### **Músculo esquelético, principal captador de la glucosa por acción de la insulina**

En adultos sanos el músculo esquelético conforma ~40% de la masa corporal total<sup>11</sup>, además es el mayor órgano para la oxidación de AG<sup>12</sup>. El músculo esquelético actúa como regulador metabólico captando cerca del 80% de la glucosa plasmática durante estados de hiperinsulinemia<sup>12</sup>, la cual se almacena principalmente como glucógeno<sup>12,13</sup>. En el músculo esquelético la insulina se une a su receptor, promoviendo el incremento de la captación de glucosa a través de la estimulación de la translocación de GLUT4 desde compartimientos intracelulares a la membrana plasmática<sup>14</sup>. En personas con DII, la captación de glucosa mediada por insulina se encuentra disminuida<sup>15</sup>, siendo parte de las alteraciones presentes en la DII y la RI atribuidas a un transporte de glucosa alterado, producido por un tráfico desregulado de GLUT4<sup>16</sup>. Por ello, es interesante sospechar que cualquier alteración a nivel del metabolismo muscular origina profundos efectos sobre la fisiología sistémica.

### **Colesterol y su acción sobre la señalización de insulina en el músculo esquelético**

Los lípidos interfieren en la señal promovida por la insulina para el transporte de glucosa<sup>17</sup>. Esto ha sido objeto de estudios para responder, cuál o cuáles especies lipídicas ejercen dicho efecto. Dado que los triglicéridos acumulados en músculo esquelético poseen una actividad biológica neutra, es decir, no interfieren en la actividad de proteínas, otras especies lipídicas debieran dar cuenta del efecto deletéreo sobre la señal insulínica. En este sentido, las ceramidas han mostrado estar aumentados en músculo esquelético de sujetos con RI<sup>18,19</sup>. Nuestro<sup>20,21</sup> y otros grupos<sup>23</sup> han sugerido que el exceso de colesterol tiene un papel en los efectos deletéreos de la señal de insulina para el transporte de glucosa.

El colesterol es un componente integral de la membrana celular de células eucariotas, incluyendo las del músculo esquelético<sup>21</sup>, que interactúa con fosfolípidos y esfingolípidos disminuyendo la fluidez de la bicapa y la permeabilidad a iones y agua<sup>22</sup>. Estudios indican que los túbulos transversales (túbulos T), una membrana plasmática especializada que se invagina al citoplasma del músculo esquelético, presentan una concentración de colesterol cuatro veces mayor respecto al sarcolema<sup>23</sup>. En modelos animales de experimentación y humanos con intolerancia a la glucosa se ha reportado una acumulación de colesterol en las membranas del músculo esquelético<sup>24</sup>. Además, un incremento de un 30% en el contenido de colesterol total se observa en triadas, un sistema de membrana compuesto por un túbulo T y dos cisternas terminales de retículo sarcoplasmático, aisladas de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés) comparadas con aquellos alimentados con dieta control (NCD por sus siglas en inglés). Adicionalmente, los estudios han sugerido un 40% de disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en fibras musculares de ratones HFD comparadas con aquellas obtenidas de ratones NCD<sup>20</sup>. En este reporte, la administración subcutánea de metil-β-ciclodextrina (MβCD), un compuesto que extrae colesterol de las membranas celulares, revirtió los efectos deletéreos en ratones HFD e incrementó el contenido de GLUT4 en la membrana respecto a los ratones NCD<sup>20</sup>. Es interesante, que similares resultados fueron obtenidos en experimentos *in vitro* en fibras musculares<sup>20</sup>, líneas celulares de músculo<sup>25</sup> y adipocitos<sup>26</sup>. En conjunto, estos hallazgos sugieren que al modificar el contenido de colesterol de la membrana se induce un cambio en la fluidez de ésta, que puede modificar la captación de glucosa mediada por insulina en el músculo esquelético de ratones HFD.

Es importante destacar que el colesterol se encuentra altamente regulado a nivel celular y sistémico<sup>27</sup>. En este sentido, el proceso conocido como transporte reverso de colesterol (TRC) tiene un papel fundamental en la remoción de colesterol y otros lípidos desde las células de los diferentes tejidos hasta el hígado, donde en su etapa final, los hepatocitos extraen las moléculas lipídicas desde las lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés) para luego excretarlas en la

secreción biliar<sup>28,29</sup>. Por estos motivos, planteamos que el colesterol puede ser un factor sustantivo en el manejo de la glucosa en el músculo esquelético.

### **ABCA1 media el flujo de salida del colesterol celular**

Las proteínas ATP-Binding Cassette (ABC) son una familia de transportadores integrales de membrana que utilizan trifosfato de adenosina (ATP por sus siglas en inglés) como fuente de energía para el transporte de sustratos en contra de un gradiente química<sup>30</sup>. Los transportadores ABC en humanos están involucrados en estados fisiopatológicos como cáncer y fibrosis quística<sup>30</sup>, además de alteraciones metabólicas entre las que se ha sugerido la RI<sup>31</sup>. Uno de los representantes de la familia ABC es la proteína ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1), formada por 2.261 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 240 kDa<sup>32</sup>. ABCA1 tiene como función mediar el flujo de salida celular de colesterol y fosfolípidos hacia su receptor extracelular, la apolipoproteína A1 (apoA1) para la generación de HDL, proceso conocido como la primera fase del TRC<sup>33</sup>. Una deficiente expresión de ABCA1 se observa en la enfermedad de Tangier, un extraño desorden genético que exhibe drásticas reducciones en la formación y concentración plasmática de HDL, con una alta y prematura incidencia de patologías cardiovasculares<sup>33,34</sup>. ABCA1 está altamente expresada en macrófagos e hígado, así como también está presente ubicuamente en otros tejidos incluido el músculo esquelético<sup>35</sup>, además se ha descrito que ABCA1 está altamente regulada por su expresión génica y modificaciones postraduccionales<sup>36</sup>. Interesantemente, ABCA1 se ve alterada en condiciones de RI y DII, disminuyendo su expresión en leucocitos y fibroblastos humanos, lo que se asocia a una reducción de la salida de colesterol de estas células en paciente diabéticos<sup>37</sup>. Asimismo, se ha observado que ratones *knock out* (KO) para ABCA1, la exposición a HFD promueve aumentos del contenido de colesterol y triglicéridos, produciendo una alteración en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en adipocitos, además de modificar la expresión de genes involucrados en la homeostasis del colesterol y glucosa<sup>38,39</sup>.

Datos en segunda revisión de nuestro laboratorio<sup>38</sup>, sugieren una disminución de la expresión proteica de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones HFD (figura

1) y en biopsias musculares humanas obtenidas de sujetos obesos insulino-resistentes (datos no mostrados). Adicionalmente, la disminución de los niveles de ABCA1 a través de un modelo *knock down* de músculo esquelético, promueven incrementos del colesterol y una disminución de la translocación de GLUT4 a la membrana celular con una consecuente disminución de la captación de glucosa inducida por insulina<sup>38</sup>. Sin embargo, la sobreexpresión de ABCA1 en el músculo de ratones obesos aún es un aspecto no explorado.

### **Receptores activados por los proliferadores de peroxisomas**

Los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR por sus siglas en Inglés) son miembros de la familia de receptores nucleares, particularmente de la subfamilia 1-C<sup>40</sup>. En humanos, los receptores nucleares identificados incluyen 48 integrantes cuya actividad se regula por la unión directa de esteroides, hormonas tiroideas, vitaminas, metabolitos lipídicos y xenobióticos, entre otros<sup>41,42</sup>. Los PPAR actúan como factores de transcripción activados por ligando y poseen una estructura canónica común, con un dominio regulador en el extremo N-terminal seguido de un dominio de unión a una zona del ADN denominado elemento de respuesta a hormonas, además de un dominio de unión a ligando en la región C-terminal<sup>43</sup>.

Tres distintos miembros PPAR han sido identificados: PPAR $\alpha$  (gen NR1C1) que se asocia al metabolismo lipídico y es activado por fibratos, PPAR  $\beta/\delta$  (gen NR1C2) que se asocia a metabolismo de AG como a la supresión de la inflamación en macrófagos y PPAR $\gamma$  (gen NR1C3) que se asocia a homeostasis de la glucosa, almacenamiento de AG y diferenciación adipocitaria<sup>41</sup>. Los PPAR son funcionales a través de la formación de un heterodímero con el receptor  $\chi$  retinoide (RXR), acoplándose a regiones promotoras de genes denominadas elemento de respuesta a PPAR (PPRE por sus siglas en inglés), regulando la transcripción de una manera dependiente de ligando a través del reclutamiento diferencial de coactivadores y corepresores<sup>44</sup>. Los PPRE se han identificado en numerosos genes que controlan diversos aspectos del metabolismo de lípidos y carbohidratos<sup>45</sup>. Además, se ha

descrito que los PPAR podrían unirse directamente a PPRE o formar heterodímeros con otros receptores nucleares como receptor x hepático (LXR por sus siglas en inglés) o el receptor de hormona tiroidea  $\beta$  (T3R $\beta$  por sus siglas en inglés)<sup>45</sup>.

## **PPAR $\gamma$**

PPAR $\gamma$  es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción<sup>42</sup>. De forma clásica, PPAR $\gamma$  heterodimeriza con RXR generando un cambio conformacional que atrae coactivadores transcripcionales<sup>41</sup>. Por otro lado, en ausencia de ligando PPAR $\gamma$  tiene el potencial de silenciar genes reclutando co-represores<sup>46</sup>. La actividad de PPAR $\gamma$  junto a estos complejos, afecta la transcripción genética alterando la estructura de la cromatina, regulando así la expresión de genes<sup>41</sup>. Aunque en general a los PPAR se les denomina receptores nucleares huérfanos, dado que no presentan un ligando natural específico conocido<sup>47</sup>, una variedad de sustancias han sido estudiadas como ligandos naturales de PPAR $\gamma$  dentro de las que se destacan AG, eicosanoides, derivados oxidados de lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés) y metabolitos derivados de las prostaglandinas J2<sup>41</sup>. A pesar de los esfuerzos de investigación en esta área, todavía no es posible determinar si PPAR $\gamma$  posee un ligando natural altamente específico o si opera como sensor por débiles concentraciones de AG y eicosanoides<sup>41</sup>. Por otra parte, es de interés que PPAR $\gamma$  es altamente activado por los compuestos sintéticos denominados tiazolidinedionas<sup>42</sup>.

PPAR $\gamma$  está predominantemente expresado en el tejido adiposo en comparación con otros tejidos<sup>48</sup>, ahí regula el metabolismo de los AG, favoreciendo un flujo neto de éstos desde la circulación y otros tejidos hacia los adipositos<sup>41</sup>, además PPAR $\gamma$  posee efectos ampliamente demostrados sobre la diferenciación adipositaria<sup>49-51</sup>. Igualmente, se ha sugerido que PPAR $\gamma$  también tendría un papel endocrino en el tejido adiposo, aumentando factores que promueven la sensibilidad a la insulina como adiponectina y reduciendo la expresión de factores que aumentan la resistencia a la insulina como cortisol y TNF $\alpha$ <sup>41</sup>. Por otro lado, se ha descrito que en células  $\beta$ -pancreáticas, la estimulación de PPAR $\gamma$  provoca una disminución de la

lipotoxicidad<sup>52</sup>, además de una disminución en la producción de radicales libres y reducción del estrés de retículo, disminuyendo la apoptosis y mejorando la secreción de insulina en personas con DII<sup>53</sup>.

Estudios con inmunohistoquímica han expuesto que PPAR $\gamma$  se encuentra presente al interior de núcleos de miocitos de fibras blancas y rojas en ratas y humanos<sup>54</sup>, además PPAR $\gamma$  presenta dos isoformas,  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 2, siendo la isoforma  $\gamma$ 1 predominante en el músculo esquelético humano<sup>55</sup>. Se ha reportado que la magnitud de expresión de ARN mensajero (mRNA) de PPAR $\gamma$  en músculo es hasta 20 veces menor con respecto al tejido adiposo<sup>55</sup>. Además, de los tres PPAR identificados, PPAR $\gamma$  sería el de menor expresión en el músculo esquelético de ratas, tanto en músculos oxidativos como glucolíticos<sup>56</sup>. No obstante, estudios sugieren que la contribución de PPAR $\gamma$  en el músculo esquelético no es menor y su importancia ha sido evidenciada en varios estudios<sup>57-60</sup>. Hevener *et al.* reportan un severo estado de insulino-resistencia, asociado a defectos en la vía de señalización de insulina en ratones KO músculo específico para PPAR $\gamma$ <sup>57</sup>. De la misma forma otro trabajo, concluye que PPAR $\gamma$  presenta alta expresión proteica en el músculo esquelético, sobre todo en sujetos severamente insulino-resistentes, y que el contenido de PPAR $\gamma$  en el músculo puede ser un importante factor de control del metabolismo lipídico y de la glucosa<sup>55</sup>. Algunos trabajos mencionan que PPAR $\gamma$  podría participar en diferenciación muscular, al menos *in vitro* puesto que sería clave en la diferenciación de miocitos de la línea celular C2C12<sup>49</sup>. Interesantemente, las mutaciones de PPAR $\gamma$  en humanos se relacionan con obesidad<sup>61</sup> y RI<sup>62</sup>. La delección selectiva de PPAR $\gamma$  en músculo de ratones, conlleva un estado de insulino-resistencia caracterizado por una marcada disminución del consumo de glucosa inducido por insulina por parte del músculo esquelético, más aun, los agonistas de PPAR $\gamma$  no tienen efecto en generar mejoras en la sensibilidad a insulina en este modelo, sugiriendo fuertemente que PPAR $\gamma$  es blanco directo de las tiazolidinedionas *in vivo*<sup>57</sup>. Otro estudio, indica que una activación selectiva de PPAR $\gamma$  en el músculo esquelético induce la producción de adiponectina *in situ* la cual tendría un efecto paracrino insulino-sensibilizador protector ante una dieta inductora de RI<sup>58</sup>. En contraparte, un trabajo publicado por Norris *et al.* difiere de estas conclusiones al no

obtener cambios en la sensibilidad de insulina del músculo esquelético con la delección específica de PPAR $\gamma$  y, opuestamente, obteniendo mejoras con el tratamiento con agonistas PPAR $\gamma$ , especialmente debido a la acción de éstos sobre otros tejidos blanco, principalmente el adiposo<sup>63</sup>. Por otra parte, McAinch *et al.* sugieren que una dieta HFD (78% Kcal. derivadas de lípidos) por 8 semanas no modifica los niveles proteicos de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  en ratas sedentarias<sup>64</sup>, no obstante, Li *et al.* reportan una clara disminución del mRNA de PPAR $\gamma$  en un modelo murino de insulino-resistencia<sup>65</sup>.

Los antecedentes anteriormente expuestos, sugieren que PPAR $\gamma$  se expresa mayoritariamente en el tejido adiposo y que el efecto de sus agonistas confiere un efecto insulino-sensibilizador. Sin embargo, el papel de PPAR $\gamma$  en músculo esquelético aún no ha sido suficientemente explorados y su contribución podría ser subvalorada.

## **Tiazolidinedionas**

Las tiazolidinedionas (TZD) son fármacos insulino-sensibilizantes usados ampliamente en el tratamiento de la DII desde hace dos décadas recomendados tanto en monoterapia como en combinación con otras drogas. Actualmente, rosiglitazona (RSG) y pioglitazona (PIO) son las TZD disponibles para prescripción médica<sup>66</sup>.

Farmacológicamente RSG ha demostrado mayor afinidad como agonista PPAR $\gamma$ <sup>66</sup>. Comparaciones entre pioglitazona, ciglitazona, englitazona y rosiglitazona, muestran que esta última es la más potente en activar a PPAR $\gamma$ <sup>67</sup>. Reportes de ensayos con luciferasa han expuesto que RSG presenta los mayores niveles de activación de PPAR $\gamma$  a menores concentraciones en comparación a PIO y troglitazona (TRO)<sup>68</sup>. Por otro lado, RSG induce una diferenciación de adipocitos 50 veces mayor comparada con PIO y TRO<sup>68</sup>. Pioglitazona, pese a ser un compuesto afín a PPAR $\gamma$  no es completamente específico, puesto que también es ligando de PPAR $\alpha$ <sup>69</sup>. Se ha sugerido que los periodos necesarios para obtener efectos *in vitro*

con las TZD gracias a la activación de PPAR $\gamma$  y su consecuente mejora en la sensibilidad a la insulina en líneas celulares de músculo esquelético requieren al menos 5 horas de preincubación<sup>54</sup>, lo que según estos autores apunta a un mecanismo indirecto mediado probablemente por el metabolismo lipídico<sup>54</sup>.

Estos datos sugieren que RSG puede ser un adecuado candidato para explorar los efectos de los agonistas PPAR $\gamma$  en el músculo esquelético.

### **Expresión de ABCA1 y PPAR $\gamma$**

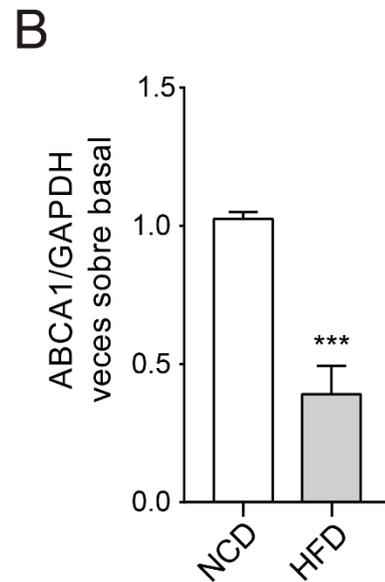
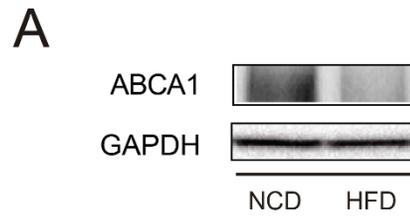
Ha sido reportado que la expresión de ABCA1 es mediada por factores de transcripción como PPAR $\gamma$ , además, estudios en diversos tejidos han sugerido que el tratamiento con RSG aumenta la expresión de ABCA1<sup>70-72</sup>. Se ha observado, que agonistas de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  inducen la expresión del gen que codifica para ABCA1 aumentando el flujo de salida de colesterol mediado por apoA1 en estudios *in vitro* en macrófagos humanos, en éstos, una curva dosis respuesta para RSG (50 nM a 1  $\mu$ M) generan aumentos crecientes del mRNA de ABCA1 cuatro veces mayor respecto al control no tratado<sup>71</sup>. Chawla *et al.* reportan que la activación de PPAR $\gamma$  aumenta la expresión de ABCA1, promoviendo una cascada de señalización que culmina en el aumento del TRC en lesiones ateroscleróticas humanas<sup>70</sup>. Al mismo tiempo, se ha sugerido que la activación de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  tiene efectos sobre un aumento en los mensajeros de ABCA1 en fibroblastos y macrófagos de ratón<sup>72</sup>. Asimismo, se ha observado aumentos del mRNA de ABCA1 al doble del control en miotubos diferenciados estimulados 24 horas con agonistas de PPAR $\gamma$  y RXR<sup>73</sup>. Por otra parte, una dosis de 10 mg/kg/día de un TZD sintética inespecífica genera aumentos en la captación de glucosa *in vitro* en el músculo esquelético sóleo de ratas obesas<sup>54</sup>. Además, agonistas PPAR $\gamma$  en altas dosis resultan en una significativa captura de glucosa mediada por insulina en el músculo esquelético tras 7 a 11 días de administración y no así después de 1 a 2 días posterior al tratamiento en un modelo de ratas obesas<sup>54</sup>. De la misma forma, Hevener *et al.* reporta que en un modelo KO músculo específico para PPAR $\gamma$ , RSG a dosis de 3 mg/kg/día, no genera un incremento en la captura de glucosa dependiente de insulina *in vivo* en comparación al control *wild-type* no tratado<sup>57</sup>.

Es importante destacar que ABCA1 juega un papel fundamental en la homeostasis del colesterol en la célula  $\beta$ -pancreática<sup>74</sup>, siendo esta proteína necesaria para la secreción de insulina y para la respuesta de estas células a las TZD<sup>75</sup>. Brunham *et al.* plantean que el papel de ABCA1 es crítico en la fisiología de la célula  $\beta$ -pancreática, puesto que su ausencia lleva a defectos en la liberación de insulina. Además, en este mismo trabajo se muestra un incremento de los niveles proteicos de ABCA1 promovidos por la incubación de 12 horas con 1  $\mu$ M de RSG en la línea celular INS-1 de páncreas<sup>75</sup>.

Estudios clínicos en humanos con TZD muestran distintas mejoras en la insulino-sensibilidad de los tejidos periféricos. Uno de ellos, compara la eficacia de RSG frente a metformina, mostrando que RSG aumenta la captura de glucosa del músculo esquelético y no así, metformina en pacientes DII recientemente diagnosticados<sup>60</sup>. Kim *et al.* reportan que TRO, incrementa la activación de proteína quinasa B (PKB o AKT por sus siglas en inglés) activada por insulina en el músculo esquelético de personas obesas DII. Ellos también sugieren que RSG tendría un efecto similar sobre animales KO para GLUT4 en tejido adiposo<sup>59</sup>. Por otro lado, Miyazaki *et al.* exponen que 16 semanas de tratamiento con RSG se asocia a incrementos significativos de la captura de glucosa dirigida a la síntesis de glucógeno a través de mejoras en la señalización de insulina y la reducción de los niveles circulantes de AGL<sup>76</sup>. Asimismo, Petersen *et al.* sugieren que tres meses de tratamiento con TRO incrementa la respuesta a insulina en el músculo, aumentando las tasas de síntesis de glucógeno y la oxidación de glucosa en pacientes DII<sup>77</sup>. Sin embargo, a la fecha no existen reportes que sugieran una relación entre el uso de los agonistas PPAR $\gamma$  y su posible efecto en promover un aumento de los niveles proteicos de ABCA1 y la disminución del colesterol en el músculo esquelético.

En conjunto, los antecedentes sugieren que PPAR $\gamma$  está involucrado en una vía de señalización para la regulación de ABCA1 y la biogénesis de HDL en diferentes células. Sin embargo, aún es desconocido si en el músculo adulto de ratones obesos estos compuestos promueven un aumento de la expresión de ABCA1. En este trabajo se pretende abordar el efecto de los agonistas PPAR $\gamma$  sobre

los niveles proteicos de ABCA1 y el colesterol de membrana con la finalidad de revertir los efectos deletéreos de la disminución de ABCA1 en ratones obesos.



**Figura 1. Niveles proteicos de ABCA1 en ratones alimentados con dieta alta en grasa.**

**A:** Western blot representativo y **B:** cuantificación de ABCA1 de homogeneizados del músculo FDB de ratones alimentados con dieta control (NCD) o alta en grasa (HFD) durante 8 semanas. GAPDH fue medida como control de carga, 40 µg por carril. \*\*\*  $p < 0.001$  determinado mediante análisis con la prueba de U Mann Whitney ( $n = 4$ ). (Manuscrito en tercera revisión, Sánchez-Aguilera P., Díaz-Vegas A., Campos C., Quinteros-Waltemath O., *et al.*, 2018).

## **HIPÓTESIS**

“El tratamiento con rosiglitazona aumenta los niveles proteicos de ABCA1 y disminuye la acumulación de colesterol en la membrana plasmática en el músculo esquelético de ratones obesos adultos”

## **OBJETIVOS**

## **Objetivo General**

- Determinar el efecto del tratamiento con RSG sobre el contenido proteico de ABCA1 y los niveles de colesterol de membrana plasmática en el músculo esquelético de ratones obesos adultos.

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto de RSG sobre los parámetros fisiológicos globales como glicemia, colesterol total y triglicéridos sanguíneos en ratones obesos adultos.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con RSG sobre los niveles proteicos de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones obesos adultos.
3. Determinar el efecto del tratamiento con RSG sobre los niveles de colesterol de membrana en fibras musculares aisladas desde el músculo FDB de ratones obesos adultos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Animales y protocolo de alimentación**

Ratones machos de la cepa C57BL/6J fueron obtenidos desde el bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los animales fueron destetados a los 21 días y alimentados exclusivamente por 8 semanas con dieta alta en grasas (HFD, 60% Kcal. grasas, 20% Kcal. proteínas, y 20% Kcal. carbohidratos; 0.72 mg/g de colesterol; D12492, Research diets, New Brunswick, NJ, USA). Los ratones fueron mantenidos en una habitación con temperatura constante entre 21 y 23°C en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Posterior a las 8 semanas de HFD, los animales fueron randomizados en 2 grupos:

- **Grupo HFD+RSG:** Tratamiento con rosiglitazona maleato (Cayman Chemical, Michigan, USA) inyectada intraperitonealmente (I.P.) a dosis de 3 mg/kg/día durante un periodo de 8 días.
- **Grupo HFD+VEH:** Inyecciones I.P. de Etanol 10% diluido en suero fisiológico al 0.9% durante un periodo de 8 días.

Además, en algunos experimentos se incorpora con fines comparativos un grupo de animales control (grupo NCD) alimentado exclusivamente con dieta control por 8 semanas. (NCD, 10 Kcal. grasas, 20% Kcal. proteínas, y 70% Kcal. carbohidratos, 0.72 mg/g de colesterol, D12450, Research diets, New Brunswick, NJ, USA)

## **Consideraciones Bioéticas y de Bioseguridad.**

Los animales se utilizaron de acuerdo con el protocolo de uso y cuidado de animales #0822 aprobado por la Comisión de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile asociado al proyecto FONDECYT de iniciación N°11150243. Este proyecto de tesis cumple con los requerimientos básicos de bioseguridad para ser desarrollado, y se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT Bioseguridad 1<sup>a</sup> edición, 1994, Manual de Normas de Bioseguridad, 2<sup>da</sup> edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4<sup>ta</sup> edición y el Manual de Bioseguridad en Laboratorios (Organización Mundial de la Salud, OMS, Ginebra 2005).

## **Reactivos**

Los reactivos utilizados durante el desarrollo de este trabajo fueron proporcionados por el Laboratorio de la Dra. Paola Llanos (Laboratorio de Metabolismo Muscular; con financiamiento aportado por el Proyecto FONDECYT de Iniciación 11150243, CONICYT-CHILE) y de la Dra. Sonja Buvinic (Laboratorio de Biología Celular; con financiamiento aportado por el Proyecto FONDECYT Regular 1151353, CONICYT-CHILE). Todos los reactivos son de grado analítico.

## **Determinaciones Bioquímicas**

A los ratones alimentados con HFD por 8 semanas se les registró peso con una balanza estándar (U.S. Solid, Cleveland, USA) y se les realizó test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal tras 6 horas de ayuno. Un bolo de 2 g/kg de glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue administrado y posteriormente se obtuvieron muestras sangre de la cola para medición de glicemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos con un equipo estándar (Accu-Checks active systems, Roche, Mannheim, Germany). Los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos se midieron usando tiras reactivas con equipo estándar (Accutrend plus, Roche, Mannheim, Germany). Posterior al tiempo de intervención, se repitieron estas evaluaciones. Además, posterior a la eutanasia se extrajeron y pesaron las grasas dorso-subcutánea, epididimal y retroperitoneal.

## **Análisis de Western Blot**

Músculos FDB, Sóleo, Gastrocnemio, Tibial Anterior y Extensor largo de los dedos, fueron extraídos de ratones de los grupos de estudio y lisados con tampón RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) complementado con inhibidores de proteasas (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) e inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, la muestra fue homogenizada manualmente y sonicada por 5 minutos a 4°C. El lisado fue mantenido en hielo por 10 minutos, para luego ser centrifugado a 4000 g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se almacenó el sobrenadante a -80°C hasta su uso. Las proteínas se

cuantificaron a través del método de ácido sulfosalicílico<sup>78</sup>. La separación de proteínas fue realizada por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 4,5 y 12% según corresponda. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4°C toda la noche a razón de dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-ABCA1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) y anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posterior al lavado, las membranas fueron incubadas por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo a razón de dilución 1:10000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y la detección fue realizada por quimioluminiscencia bajo métodos estándares.

### **Cultivo de fibras musculares esqueléticas adultas**

El procedimiento se realizó según el método reportado por Llanos *et al.*<sup>20</sup>. Brevemente, las fibras se obtuvieron desde el músculo completo FDB por digestión enzimática (90 minutos a 37°C) con colagenasa tipo II (Worthington, Lakewood, NJ, USA). Posteriormente, el músculo fue mecánicamente disgregado con pipetas pasteur hasta obtener fibras únicas aisladas, que fueron sembradas con gel ECM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) las que fueron usadas para experimentación hasta 8 horas después de cultivadas.

### **Contenido de colesterol en la membrana plasmática**

A través de tinción con Filipina III (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fue marcado el colesterol en la membrana plasmática. Brevemente, las fibras de músculos FDB extraídas de ratones de los grupos de estudio, fueron fijadas usando paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). Las fibras fueron incubadas por 2 horas a temperatura ambiente en 0,05 mg/ml de Filipina III en PBS/10%. Posterior al lavado, las fibras fueron visualizadas a través de microscopía de epifluorescencia (Spinning disk IX81, Olympus, Tokio, Japón). El análisis de las fibras se realizó cuantificando la media de fluorescencia de 3 regiones de interés, de

similar tamaño por fibra a través del programa Image-J (National Institutes of Health, USA).

### **Tamaño de la muestra**

La determinación del tamaño de la muestra se realizó según lo propuesto por Charan J. y Kantharia<sup>79</sup>. Aceptando un intervalo de confianza del 95%, una potencia del 80%, en un contraste bilateral y con una desviación estándar de 0.1 se requieren como mínimo 4 individuos por grupo para detectar diferencias superiores o iguales a un 20% de cambio.

### **Análisis estadístico**

Se evaluó la distribución normal de los datos obtenidos utilizando la prueba de Shapiro Wilk y homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Fligner-Killen. En el caso de cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se utilizó la prueba de T de Student para datos pareados y ANOVA de una vía, seguido de prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. En el caso de no cumplir los supuestos antes mencionados, fue utilizada la prueba de U Mann-Whitney para datos pareados o la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Se consideró significancia estadística con valores  $p < 0.05$ . Los datos fueron expresados en valor promedio  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó el programa estadístico Rstudio Versión 1.0.136 (RStudio, Inc., Boston MA) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para la confección de gráficos.



# RESULTADOS

## Efectos fisiológicos del tratamiento con RSG en ratones obesos

Con la finalidad de examinar el efecto que tiene el tratamiento con RSG sobre animales alimentados HFD, se llevaron a cabo análisis bioquímicos y pruebas fisiológicas de ratones inyectados con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG) por 8 días, y se observó el control metabólico de éstos. Además, con fines comparativos se muestra un grupo independiente de ratones alimentados por 8 semanas con dieta control (NCD).

Como ha sido reportado con anterioridad por nuestro grupo<sup>20</sup>, en este modelo de obesidad, 8 semanas de HFD exclusiva aumentan considerablemente el peso corporal de ratones comparados a sus pares NCD (figura 2, A y B). En nuestros animales, el peso corporal alcanzó valores de  $40,3 \pm 4,3$  y  $22,9 \pm 1,7$  g. en animales HFD y NCD, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con RSG no modificó el peso corporal encontrando valores de  $40,8 \pm 3,3$  g. en el grupo HFD+VEH y  $39,9 \pm 3,9$  g. en el grupo HFD+RSG (figura 2B).

Con el objetivo de evaluar los niveles de colesterol plasmático, nosotros realizamos mediciones de colesterol total en muestras sanguíneas de los animales HFD tratados o no con RSG intraperitonealmente. De similar manera a los resultados anteriores, los niveles de colesterol total plasmático de los animales inyectados con vehículo se ven aumentados respecto al grupo NCD alcanzando valores de  $161 \pm 11,9$  y  $66 \pm 13,8$  mg/dL, respectivamente (figura 2C). Al igual que los resultados anteriores, el tratamiento con RSG no modificó los valores de colesterol total plasmático en los animales HFD+RSG, alcanzando valores de  $162 \pm 8,7$  mg/dL (figura 2C) respecto al grupo HFD+VEH. De la misma manera se realizó medición en el plasma sanguíneo de los triglicéridos, los cuales, no presentan diferencias significativas tras la inyección de RSG alcanzando valores de  $196 \pm 21,3$  y  $171 \pm 30,4$  mg/dL en los grupos HFD+VEH y HFD+RSG, respectivamente.

Con la finalidad de evaluar la metabolización de la glucosa, se realizó una

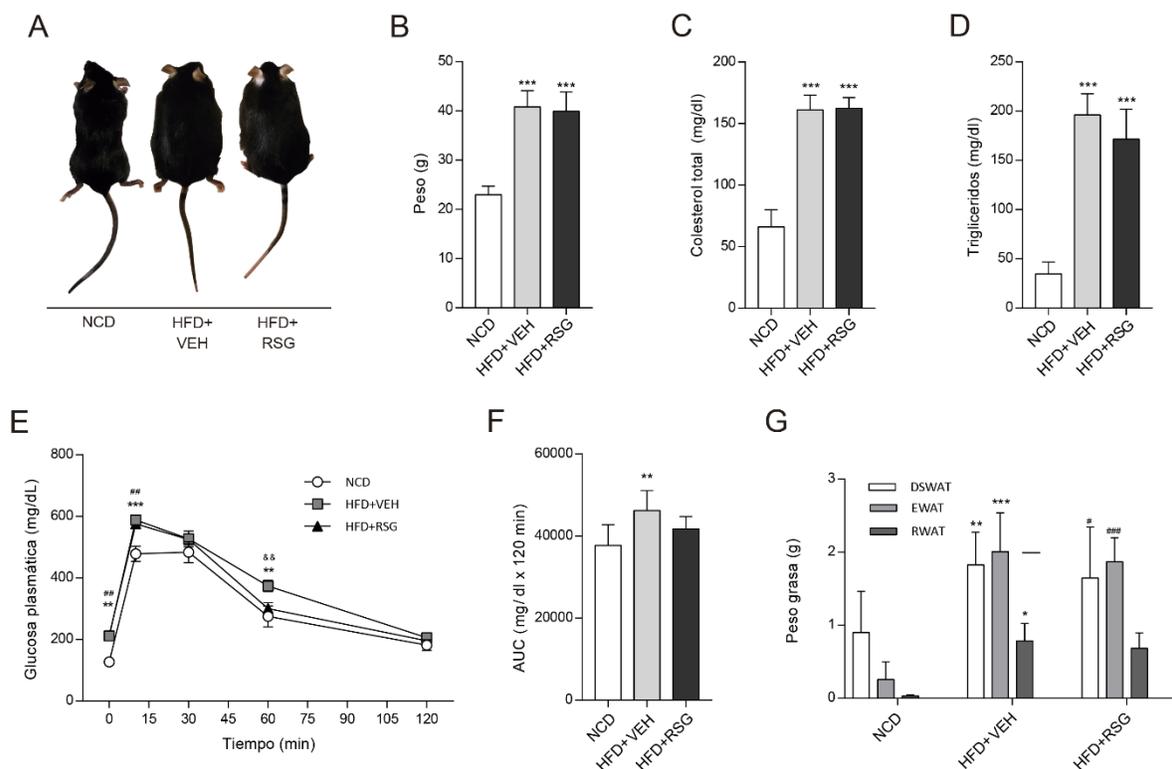
prueba de tolerancia a la glucosa (TTG) previo y posterior al tratamiento con RSG o

vehículo en los animales HFD. El análisis de la curva previo al tratamiento muestra

diferencia significativa entre animales NCD y HFD, con una marcada hiperglicemia a

los 120 min. de la prueba (datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con

RSG



**Figura 2. Parámetros fisiológicos posterior al tratamiento con RSG en ratones obesos.**

**A:** Imagen representativa de los grupos alimentados por 8 semanas con dieta control (NCD, izquierda) y dieta HFD e inyectados por 8 días con vehículo (HFD+VEH, centro) o con RSG a 3 mg/kg/día (HFD+RSG, derecha). **B:** Comparación del peso corporal en los grupos de estudio. **C:** Niveles de colesterol total plasmático en los grupos de estudio. **D:** Niveles de triglicéridos plasmáticos en los grupos de estudio. **E:** Test de tolerancia a la glucosa en los grupos NCD (círculos), HFD+VEH (cuadrados) y HFD+RSG (triángulos). **F:** Cuantificación del área bajo la curva (AUC) del test de tolerancia a la glucosa en los grupos de estudio. **G:** Peso de la grasa dorso-subcutánea (DSWAT), Epididimal (EWAT) y Retroperitoneal (RWAT) en los grupos de estudio. Datos presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en grupo HFD+VEH vs NCD, ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  en grupo HFD+RSG vs NCD. &&  $p < 0,01$  en grupo HFD+VEH vs HFD+RSG. Determinado con prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Tukey,  $n = 6 - 10$  animales por grupo.

normaliza los valores de glicemia postprandial solamente al minuto 60 observando una diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) entre los grupos HFD+VEH y HFD+RSG con valores de  $373,8 \pm 51,3$  y  $322,1 \pm 88,8$  mg/dL, respectivamente. Esta diferencia se refleja en la cuantificación del área bajo la curva del TTG (AUC) como una tendencia a disminuir el área del grupo HFD+RSG respecto a HFD+VEH que se aprecia en la figura 2F con valores de 46.215 y 41.785 mg/dLx120 min. Por otro lado, en el peso de la grasa dorso-subcutánea, epididimal y retroperitoneal que se muestra en la figura 2G, donde se observaron aumentos significativos en los grupos HFD respecto al NCD, sin encontrar diferencias entre los grupos HFD+VEH y HFD+RSG.

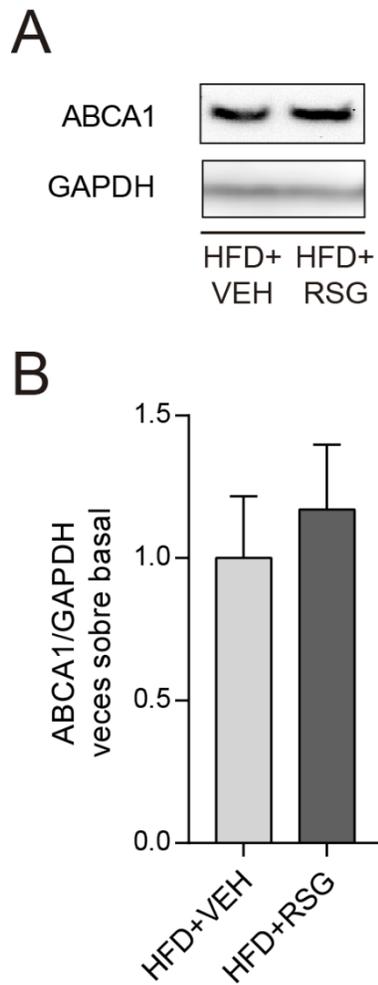
En conjunto, estos datos sugieren que el tratamiento con 3 mg/kg/día de RSG por 8 días en ratones alimentados con una dieta HFD no revierte los efectos deletéreos de ésta en peso corporal, colesterol, triglicéridos y peso de la grasa. No obstante, RSG presenta una tendencia a mejorar el control glicémico postprandial en estos animales.

### **Niveles proteicos de ABCA1 posterior al tratamiento con RSG en ratones obesos**

Para establecer si el agonista PPAR $\gamma$  promueve un aumento en los niveles proteicos de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones obesos, se llevaron a cabo análisis de Western blot en homogeneizado de músculo FDB (figura 3), sóleo, gastrocnemio (Gastro), tibial anterior (TA) y extensor largo de los dedos (EDL) (figura 4) de ratones HFD inyectados por 8 días con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG).

En el total de la muestra no se observan diferencias significativas en el contenido proteico de ABCA1 en músculo FDB entre los grupos HFD+VEH y HFD+RSG con valores de  $1 \pm 0,21$  y  $1,17 \pm 0,22$  veces, respectivamente (figura 3). Por otra parte, como se muestra en la figura 4, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos HFD+VEH y HFD+RSG en los músculos sóleo (figura 4A,  $1 \pm 0,31$  y  $1,03 \pm 0,47$  veces, respectivamente), Gastro (figura 4B,  $1 \pm 0,22$  y  $0,8 \pm 0,23$  veces, respectivamente), TA (figura 4C,  $1 \pm 0,01$  y  $0,96 \pm 0,01$  veces, respectivamente), y EDL (figura 4D,  $1 \pm 0,23$  y  $0,91 \pm 0,17$  veces, respectivamente), en el total de los individuos estudiados.





**Figura 3. Niveles proteicos de ABCA1 posterior al tratamiento con RSG en el músculo FDB de ratones obesos.**

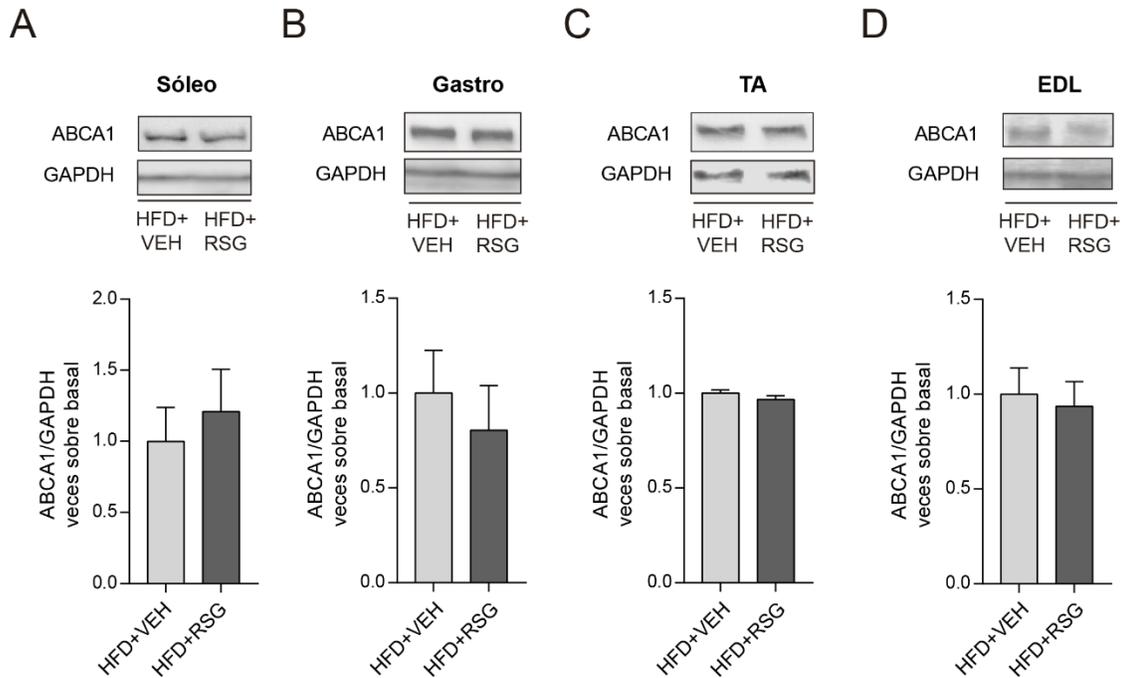
**A:** Western blot representativo de homogenizados de músculo FDB de ratones HFD inyectados por 8 días con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG) y **B:** cuantificación de los niveles proteicos de ABCA1 posterior al tratamiento (n = 8). GAPDH fue medida como control de carga, 40 µg. por carril. Datos presentados como promedio ± desviación estándar.

En conjunto, los datos sugieren que la administración intraperitoneal de RSG en la dosis y tiempo de tratamiento propuesta no modifica el contenido proteico de ABCA1 en el músculo esquelético de los ratones obesos examinados.

### **Contenido de colesterol de fibras musculares posterior al tratamiento con RSG en ratones obesos**

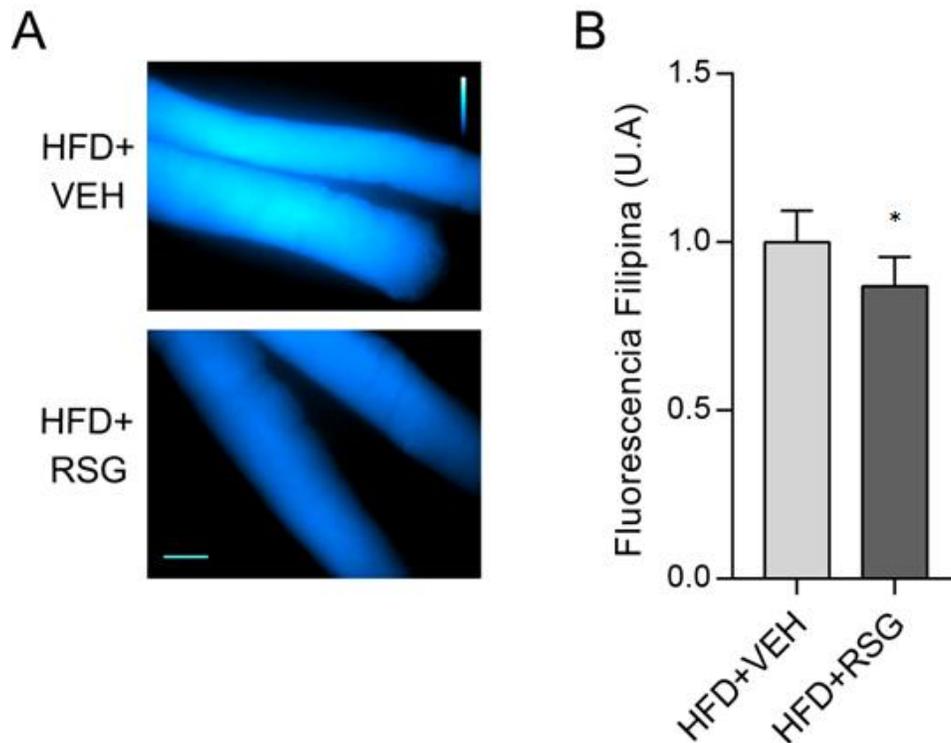
Para establecer si el tratamiento con RSG promueve un cambio en los niveles de colesterol en la membrana celular del músculo esquelético de ratones obesos, se midió el contenido de colesterol con Filipina III en fibras musculares extraídas del músculo FDB de ratones HFD inyectados por 8 días con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG), los resultados se presentan en la figura 5. El análisis de la fluorescencia en las fibras mostró una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de colesterol en el grupo HFD+RSG respecto al grupo de animales HFD+VEH, con valores de  $0,86 \pm 0,08$  veces y  $1,0 \pm 0,09$ , respectivamente (figura 5B).

Estos datos sugieren que RSG promueve una disminución del contenido de colesterol en fibras musculares extraídas desde el músculo FDB de ratones obesos.



**Figura 4. Niveles proteicos de ABCA1 posterior al tratamiento con RSG en músculos esqueléticos de ratones obesos.**

Western blot representativo y cuantificación de ABCA1 en homogenizados de músculo esquelético de ratones HFD inyectados por 8 días con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG) en **A:** Músculo Sóleo (n = 10), **B:** Gastrocnemio (Gastro, n = 5), **C:** Tibial anterior (TA, n = 3), **D:** Extensor largo de los dedos (EDL, n = 8). GAPDH fue medida como control de carga, 40 µg. por carril. Datos presentados como promedio ± desviación estándar.



**Figura 5. Niveles de colesterol en fibras musculares de ratones obesos posterior al tratamiento con RSG.**

**A:** Imágenes representativas de epifluorescencia de tinción con Filipina III de fibras musculares aisladas desde el músculo FDB de ratones HFD inyectados 8 días con vehículo (HFD+VEH) o RSG 3 mg/kg/día (HFD+RSG). **B:** Cuantificación de la fluorescencia relativa de Filipina III en ambos grupos (n = 5). Datos presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*  $p < 0,05$ , determinado con prueba T no pareada. Barra indica 20  $\mu$ m.

## **DISCUSIÓN**

En el presente estudio, reportamos por primera vez que el tratamiento con rosiglitazona a 3 mg/kg/día por 8 días en ratones adultos alimentados con dieta alta en grasa no genera aumentos significativos en los niveles proteicos de ABCA1 del músculo esquelético, pero logra una disminución en los niveles de colesterol de fibras extraídas del músculo FDB de ratones obesos.

Conocidos son los efectos de los agonistas PPAR $\gamma$  en el manejo de la IR y DII<sup>59,60,76,77,80-83</sup>, donde principalmente reducen la insulino-resistencia de los tejidos periféricos<sup>41,83</sup> e incrementan la secreción de insulina<sup>74,75</sup>. En el tejido adiposo las TZD suprimen la lipólisis, aumentan la adipogénesis, favorecen la liberación de adiponectina y reducen factores como resistina, IL-1 y TNF $\alpha$ <sup>41,83</sup>. Importantly, el músculo esquelético cumple un papel crucial en el metabolismo de la glucosa y los AG<sup>84</sup>, captando cerca del 80% de la glucosa plasmática durante estados postprandiales<sup>12,13</sup>. Con estos antecedentes, se han realizado trabajos con miras a observar los efectos de PPAR $\gamma$  sobre el músculo esquelético, como modelos KO músculo específico para PPAR $\gamma$  que generan marcados estados de insulino-resistencia<sup>57,63</sup>. Así también, estudios clínicos realizados en personas con DII, han evidenciado los efectos de PPAR $\gamma$  sobre el músculo esquelético traducidos en mejoras en la insulino-sensibilidad a través de aumentos de la producción de glucógeno y mejoras en la señal insulínica<sup>59,76,85</sup>.

Menos conocido es el efecto de PPAR $\gamma$  sobre la homeostasis del colesterol en el músculo esquelético. Nuestro grupo ha sugerido que ratones HFD presentan menores niveles de ABCA1 en este tejido, y a su vez, en un modelo *knock down* para ABCA1 en el músculo FDB, la disminución de esta proteína se traduce en un incremento del colesterol celular y una disminución de la captación de glucosa mediada por insulina asociadas a alteraciones en el nodo de señalización de la proteína AKT<sup>38</sup>. Por esto, en base a numerosos reportes de incrementos en la expresión y los niveles proteicos de ABCA1 con la estimulación de PPAR $\gamma$  en distintos modelos humanos y murinos de macrófagos<sup>70-72,86</sup>, fibroblastos<sup>72</sup>, páncreas<sup>75</sup> y miotubos<sup>73</sup>, el objetivo de este trabajo fue evaluar, con una aproximación farmacológica la respuesta ante el tratamiento con un potente agonista

PPAR $\gamma$ , hipotetizando aumentos en los niveles proteicos de ABCA1 y disminución del contenido de colesterol de membrana en el músculo esquelético de ratones HFD.

Respecto a esto, el modelo experimental planteado en este trabajo no logró cumplir el objetivo de aumentar significativamente los niveles proteicos de ABCA1 en el músculo esquelético, por lo que postulamos que esto responde a varias causas. Por una parte, la dosis de RSG y el tiempo de administración pudieron ser insuficientes. La literatura menciona varias configuraciones de tratamiento utilizadas *in vivo* con distintos resultados, por ejemplo, Way *et al.* proponen que 7 días de RSG a 3 mg/kg/día administrados por vía oral reducen los niveles de glicemia en ratas obesas<sup>87</sup>, Choi *et al.* sugieren que bastan 6 días de inyección intraperitoneal de RSG a 10 mg/kg/día para aumentar la tolerancia a glucosa y disminuir los niveles de insulina en ayuno en ratones alimentados con una dieta alta en grasa similar a la utilizada en nuestro estudio<sup>88</sup>, Zierath *et al.* reportan que RSG a 10 mg/kg/día administrados vía oral por 4 días, mejora el transporte de glucosa en el músculo esquelético de ratas obesas<sup>54</sup> y Díaz López *et al.* para evaluar el TRC en condiciones de bajo nivel de estrógenos, testearon 3 mg/kg/día de RSG durante 3 semanas, sin embargo, los autores no obtuvieron cambios en la expresión de ABCA1 en la pared arterial de conejos hembras alimentadas con dieta hipocolesterolémica<sup>89</sup>. Asimismo, con la utilización de dosis más altas se ha reportado con resultados favorables<sup>75</sup>. En el páncreas, 30 mg/kg/día de RSG por 2 semanas logran disminuir los niveles de colesterol de islotes pancreáticos en ratones *wild-type* y no así, en ratones KO páncreas específico para ABCA1<sup>75</sup>. Nuestro estudio posee un diseño experimental a 8 días, lo cual podría ser considerado como un estudio de corto plazo comparado con la mayoría de los estudios clínicos en humanos realizados a largo plazo que muestran resultados favorables con las TZD<sup>59,60,76,81</sup>. Por lo que resulta de interés conocer los niveles de ABCA1 en el músculo esquelético con tratamientos más prolongados y dosis mayores a las utilizadas en este trabajo.

Por otro lado, existe la posibilidad de que PPAR $\gamma$  tenga escaso efecto en la expresión de ABCA1 en el músculo esquelético, por ejemplo, debido en parte a la escasez de PPAR $\gamma$  en el músculo esquelético<sup>56</sup>. Muscat *et al.* testearon el efecto *in*

*in vitro* de RSG en la línea celular C2C12, reportando que RSG no incrementó los niveles proteicos de ABCA1, pero que la pre-incubación con el compuesto T0901317, un agonista no selectivo LXR, elevó 18 veces el ARNm de ABCA1 en este mismo modelo<sup>90</sup>. En concordancia con estos resultados, Chawla *et al. in vitro* obtienen aumentos de la expresión de ABCA1 con RSG en macrófagos sugiriendo fuertemente que LXR media la relación entre PPAR $\gamma$  y ABCA1, dado que el gen de LXR es blanco de PPAR $\gamma$  y, a su vez, el gen de ABCA1 es blanco de LXR $\alpha$  lo que favorecería la transcripción de ABCA1 en este tejido<sup>70</sup>. Por otra parte, otros reportes incluso descartan la contribución de PPAR $\gamma$  en la expresión de ABCA1, por lo menos en modelos *in vitro* de macrófagos<sup>91</sup>.

El músculo FDB es apropiado para la realización de pruebas *in vitro*<sup>92</sup> por su factibilidad para realizar cultivos de fibras musculares únicas y viables para experimentación. Este se compone principalmente por fibras rápidas tipo Ila y Iix y posee un muy bajo porcentaje de fibras lentas<sup>92</sup>, por otro lado es un músculo pequeño y podría tener escasa incidencia en la fisiología sistémica. Por este motivo, además de evaluar los niveles proteicos de ABCA1 en el músculo FDB, también fueron evaluados otros músculos de mayor tamaño e incidencia sistémica, así como de diferente proporción de fibras lentas como por ejemplo músculo sóleo y mixtas como músculo gastrocnemio, obteniendo similares resultados.

El colesterol de membrana y su manejo en el músculo esquelético es un aspecto relevante en el metabolismo muscular<sup>21</sup>. Se han observado incrementos en el contenido de colesterol total en triadas aisladas de ratones HFD comparadas con aquellas de ratones NCD<sup>20</sup>, mientras que la extracción de colesterol a través del compuesto M $\beta$ CD revierte los efectos deletéreos sobre la captación de glucosa mediada por insulina en estos ratones<sup>20</sup>, además de fibras musculares<sup>20</sup>, líneas celulares de músculo<sup>25</sup> y adipocitos<sup>26</sup>. Nuestros resultados sugieren una disminución de un 14% en el contenido de colesterol de la membrana plasmática de fibras extraídas de FDB de ratones HFD tratados con RSG en comparación al vehículo, pese a no incrementar los niveles proteicos de ABCA1. Estos resultados contradictorios pueden responder a variables no medidas en este estudio, tales como

modificaciones postraduccionales de ABCA1<sup>36</sup> o modificaciones en otras proteínas que tienen influencia en el colesterol a nivel celular como son proteína *ATP-Binding Cassette G1* (ABCG1)<sup>93,94</sup> y apoA1<sup>95</sup>. Por ejemplo, se ha sugerido que 10  $\mu$ mol de PIO y RSG generan aumentos de la expresión de ABCG1 en macrófagos de la línea THP-1<sup>93</sup> así también la administración crónica de 30 mg de PIO generan aumento de ABCG1 y ABCA1 en pacientes DII<sup>93</sup>.

Por otra parte, los niveles proteicos de ABCA1 presentaron una gran dispersión de datos mostrando una tendencia de aumento en el músculo FDB, por lo que no podemos descartar completamente que algunos animales presenten un incremento de la proteína tras el tratamiento con RSG. En la literatura existen reportes de respuestas dispares al tratamiento con TZD, interesantemente, en un estudio clínico realizado en individuos con alto riesgo de padecer DII, troglitazona por largos periodos de tratamiento, solo logra que 2/3 de los pacientes presenten respuesta a tratamiento expresando una insulino-sensibilización que preserva la función de la célula  $\beta$ -pancreática<sup>74</sup>. En humanos, este último caso, podría tener una posible explicación genética ya que se ha visto que la presencia de la variante R219K del gen ABCA1, tiene un menor efecto en la respuesta al tratamiento con RSG por un tratamiento de 48 meses a dosis de 4 mg/día en pacientes recientemente diagnosticados con DII<sup>96</sup>. Por lo tanto, en nuestro estudio, debido en parte a razones técnicas, no se pudo medir los niveles de ABCA1 y el contenido de colesterol simultáneamente en el músculo del animal, lo que refleja una desventaja objetiva para interpretar nuestros resultados. Sin embargo, en estudios futuros podremos evaluar este punto, dado que recientemente hemos optimizado los niveles proteicos extraídos y el cultivo de fibras desde un músculo FDB. Por otra parte, creemos necesario incorporar a nuestro diseño experimental un control positivo para la activación de PPAR $\gamma$ . En tejido adiposo se encuentran bien descritos genes blanco como el receptor scavenger clase B tipo 3 (SCARB3 por sus siglas en inglés o CD36) o lipoproteína lipasa (LPL)<sup>97</sup>. En nuestro caso, específicamente del músculo esquelético, reportes han especificado al gen del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma coactivador 1 alfa (PGC-1 $\alpha$  por sus siglas en inglés) como buen candidato para este fin<sup>98</sup>.

En cuanto a las pruebas fisiológicas de medición de colesterol plasmático total, triglicéridos totales y TTG, realizadas previo y posterior al tratamiento con RSG en animales HFD, el tratamiento al tiempo y dosis propuestas, no logran aminorar los efectos deletéreos de una HFD. Conocida es la dislipidemia asociada a RI y DII caracterizada por aumento de triglicéridos plasmáticos y disminución del colesterol HDL<sup>99</sup>. Nuestro modelo de HFD logra replicar la dislipidemia observada en estas patologías, pudiendo observar que los ratones HFD en comparación a los NCD exhiben aumento de peso corporal, aumento del colesterol total plasmático y de los triglicéridos plasmáticos (figura 2). Sin embargo, el tratamiento con RSG no logra reducir ni controlar estas alteraciones. Esto coincide, al menos en parte, con resultados a tratamientos con TZD que revelan aumentos en los niveles de HDL y disminución de LDL manteniendo un efecto neutral en el total de colesterol<sup>83</sup>. Para validar este aspecto, nosotros sugerimos realizar mediciones de fracciones de colesterol HDL y LDL plasmáticos o realizar un perfil o caracterización de las HDL de los ratones entendiendo que ABCA1 es uno de los principales factores que determinan los niveles plasmáticos de HDL<sup>94</sup>. Por su parte, los niveles de triglicéridos plasmáticos presentan un comportamiento que depende del fármaco utilizado, donde RSG ha mostrado incrementar los niveles de éstos, pese a mejorar de igual forma el control glicémico y aumentar los niveles de HDL, al contrario de lo que sucede con pioglitazona que tiende a disminuirlos<sup>100</sup>. Asimismo, se ha descrito un leve aumento en el peso corporal de los sujetos sometidos a tratamientos con TZD, principalmente debido al aumento de la adipogénesis y retención de líquido<sup>41</sup>, sin embargo, el peso corporal se mantuvo sin diferencias significativas entre los grupos de estudio en nuestros animales.

Respecto al manejo glicémico, nuestros resultados muestran una tendencia a la normalización del grupo tratado con RSG al minuto 60 en el TTG (figura 2) lo que nos sugiere que prolongando el tratamiento o aumentando las dosis estudiadas, esta diferencia debería incrementarse tal como ha sido reportada en amplios estudios realizados en seres humanos<sup>41,83</sup>. Por otra parte, es probable que nuestro modelo necesite pruebas más acuciosas para evaluar la respuesta insulino-sensibilizadora que presuntamente posee RSG para la dosis y el tiempo propuesto, tales como

medición de insulinemia e índices más sensibles como HOMA<sup>101</sup>. Conjuntamente, es importante aislar los efectos que podría tener PPAR $\gamma$  sobre el músculo esquelético por sobre los que pueda tener la estimulación de PPAR $\gamma$  en otros tejidos, y que puedan o no tener relación con disminuciones del colesterol de la fibra muscular, puesto que los mecanismos por los cuales RSG aumenta la captación de glucosa no están del todo aclarados<sup>72</sup>. En este sentido, estudios han mostrado que la reducción de los AGL por agentes anti-lipolíticos, suscitan un aumento de la captación de glucosa en el músculo esquelético en humanos<sup>102</sup> y que el tratamiento prolongado con TZD se asocia a incrementos o mejoras en la vía de señalización de insulina tales como PI3K<sup>59</sup>, AKT<sup>59,85</sup> e IRS1<sup>76,103</sup>, además de la posibilidad de que PPAR $\gamma$  pueda mejorar la captura de glucosa a través del eje CAP/Cbl-TC10 como señal paralela a PI3K para la translocación de los GLUT4<sup>104</sup> o que existan mecanismos como los descritos en tejido adiposo donde se ha observado que citoquinas pro-inflamatorias como TNF $\alpha$  producen la fosforilación de PPAR $\gamma$  en Serina 273 especialmente a través de la proteína quinasa dependiente de ciclinas 5 (CDK5 por sus siglas en inglés), las cuales son bloqueadas por RSG<sup>88</sup>.

La expresión de ABCA1 no depende solo de una vía, sino que es parte de una intrincada red de transducción de señales<sup>36</sup> que involucran a PPAR y LXR<sup>72</sup>. En este trabajo, queda la interrogante de conocer qué sucede con la activación de LXR en los niveles de ABCA1 en el músculo esquelético *in vivo*, ya que el análisis de la literatura sugeriría que agonistas LXR son otros buenos candidatos para incrementar farmacológicamente los niveles de ABCA1<sup>90</sup>. El presente estudio es novedoso porque es la primera vez que se evalúan los niveles proteicos de ABCA1 en músculo esquelético tras el tratamiento con RSG en un modelo *in vivo*. Sin embargo, futuros experimentos nos permitirán abordar y profundizar en esta hipótesis.



## CONCLUSIONES

Considerando los efectos descritos de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones obesos sobre el nivel de colesterol de membrana plasmática y el transporte de glucosa mediado por insulina, este trabajo se basó en probar un conocido agonista PPAR $\gamma$  con el fin de aumentar los niveles proteicos de ABCA1 y disminuir el colesterol de membrana en fibras musculares esqueléticas. Los principales resultados de esta tesis se resumen a continuación.

8 días de tratamiento con 3 mg/kg/día de rosiglitazona:

- No generan cambios significativos en los niveles de ABCA1 en el músculo esquelético de ratones obesos.
- Disminuyen los niveles de colesterol de la membrana plasmática de fibras FDB de ratones obesos.
- No modifican los efectos deletéreos de una dieta alta en grasa, pero tienden a normalizar el control glicémico.

Por lo tanto, nuestros datos no son concluyentes y responden parcialmente a la hipótesis propuesta, por lo que es de interés probar nuevas dosis o aumentos del tiempo de tratamiento, así como también explorar otros agonistas en la búsqueda de sobre expresar farmacológicamente ABCA1 y evaluar su función sobre el colesterol de membrana plasmática en el músculo esquelético de ratones obesos.

En resumen, **nuestra conclusión sugiere que rosiglitazona administrada a 3 mg/kg/día por 8 días a ratones obesos no modifica significativamente los niveles de ABCA1 en el músculo esquelético, pero sí disminuyen parcialmente los niveles de colesterol en fibras musculares extraídas del músculo FDB.**



# BIBLIOGRAFÍA

1. Martin, B. C. *et al.* Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet Lond. Engl.* **340**, 925–929 (1992).
2. Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171–176 (2000).
3. IDF diabetes atlas - Home. Available at: <http://www.diabetesatlas.org/>. (Accessed: 20th August 2017)
4. Meigs, J. B. Epidemiology of the insulin resistance syndrome. *Curr. Diab. Rep.* **3**, 73–79 (2003).
5. Estudios y Encuestas de Salud - Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Available at: <http://web.minsal.cl/estudios-y-encuestas-de-salud/>. (Accessed: 16th July 2017)
6. Obesity and Lipotoxicity | Ayse Basak Engin | Springer. Available at: <http://www.springer.com/gp/book/9783319483801>. (Accessed: 16th July 2017)
7. Characterization of Signal Transduction and Glucose Transport in Skeletal Muscle From Type 2 Diabetic Patients. *PubMed Journals* Available at: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10868945/>. (Accessed: 18th July 2017)
8. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* **25**, 4–7 (2004).
9. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
10. Bruce, C. R., Mertz, V. A., Heigenhauser, G. J. F. & Dyck, D. J. The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. *Diabetes* **54**, 3154–3160 (2005).
11. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M. & Ross, R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **89**, 81–88 (2000).

12. Thiebaud, D. *et al.* The Effect of Graded Doses of Insulin on Total Glucose Uptake, Glucose Oxidation, and Glucose Storage in Man. *Diabetes* **31**, 957–963 (1982).
13. DeFronzo, R. A. *et al.* The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* **30**, 1000–1007 (1981).
14. Klip, A., Sun, Y., Chiu, T. T. & Foley, K. P. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C879-886 (2014).
15. Utriainen, T. *et al.* Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia* **41**, 555–559 (1998).
16. Bogan, J. S. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 507–532 (2012).
17. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852–871 (2012).
18. Galgani, J. E. *et al.* Enhanced skeletal muscle lipid oxidative efficiency in insulin-resistant vs insulin-sensitive nondiabetic, nonobese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E646-653 (2013).
19. Moro, C. *et al.* Influence of Gender, Obesity, and Muscle Lipase Activity on Intramyocellular Lipids in Sedentary Individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 3440–3447 (2009).
20. Llanos, P. *et al.* The cholesterol-lowering agent methyl- $\beta$ -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E294-305 (2015).
21. Barrientos, G. *et al.* Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance. *Journal of Diabetes Research* (2017). Available at: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2017/3941898/>. (Accessed: 24th August 2017)
22. Bloch, K. E. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **14**, 47–92 (1983).

23. Lau, Y. H., Caswell, A. H., Brunschwig, J. P., Baerwald, R. j & Garcia, M. Lipid analysis and freeze-fracture studies on isolated transverse tubules and sarcoplasmic reticulum subfractions of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **254**, 540–546 (1979).
24. Habegger, K. M. *et al.* Fat-induced membrane cholesterol accrual provokes cortical filamentous actin destabilisation and glucose transport dysfunction in skeletal muscle. *Diabetologia* **55**, 457–467 (2012).
25. Habegger, K. M., Hoffman, N. J., Ridenour, C. M., Brozinick, J. T. & Elmendorf, J. S. AMPK enhances insulin-stimulated GLUT4 regulation via lowering membrane cholesterol. *Endocrinology* **153**, 2130–2141 (2012).
26. Liu, P. *et al.* Sphingomyelinase activates GLUT4 translocation via a cholesterol-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, C317-329 (2004).
27. Cortes, V. A. *et al.* Retracted: Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol. *Biol. Rev.* **88**, 825–843 (2013).
28. Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q. & Chen, C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **98**, 845–856 (2005).
29. Levinson, S. S. & Wagner, S. G. Implications of reverse cholesterol transport: recent studies. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **439**, 154–161 (2015).
30. Wilkens, S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
31. Key, C.-C. C. *et al.* Hepatocyte ABCA1 Deletion Impairs Liver Insulin Signaling and Lipogenesis. *Cell Rep.* **19**, 2116–2129 (2017).
32. Fitzgerald, M. L. *et al.* Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* **277**, 33178–33187 (2002).
33. Qian, H. *et al.* Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell* **169**, 1228–1239.e10 (2017).

34. Rust, S. *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **22**, 352–355 (1999).
35. Wellington, C. L. *et al.* ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **82**, 273–283 (2002).
36. Schmitz, G. & Langmann, T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1735**, 1–19 (2005).
37. Patel, D. C. *et al.* Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function. *PLoS One* **6**, e22142 (2011).
38. Pablo Sanchez-Aguilera. Role of ABCA1 on membrane cholesterol content, insulin-dependent Akt phosphorylation and glucose uptake in adult skeletal muscle fibers from mice. **(Manuscript No.: BBALIP-17-394)**,
39. de Haan, W., Bhattacharjee, A., Ruddle, P., Kang, M. H. & Hayden, M. R. ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity. *J. Lipid Res.* **55**, 516–523 (2014).
40. Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome. Available at: <http://genome.cshlp.org/content/14/4/580>. (Accessed: 17th July 2017)
41. Lehrke, M. & Lazar, M. A. The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**, 993–999 (2005).
42. Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C. & Sharma, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2**, 236–240 (2011).
43. Kumar, R. & Thompson, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**, 310–319 (1999).

44. Higgins, L. S. & Depaoli, A. M. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 267S–272S (2010).
45. Giguère, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function1. *Endocr. Rev.* (2011). doi:10.1210/edrv.20.5.0378
46. Guenther, M. G., Barak, O. & Lazar, M. A. The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6091–6101 (2001).
47. Benoit, G. *et al.* International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 798–836 (2006).
48. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798–800 (1994).
49. Heikkinen, S., Auwerx, J. & Argmann, C. A. PPAR $\gamma$  in human and mouse physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 999–1013 (2007).
50. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
51. Zhang, J. *et al.* Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10703–10708 (2004).
52. al, H. M., *et.* Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500208>. (Accessed: 28th July 2018)
53. Gupta, D., Kono, T. & Evans-Molina, C. The role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in pancreatic  $\beta$  cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* **12**, 1036–1047 (2010).

54. Zierath, J. R. *et al.* Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPARgamma agonist) action. *Endocrinology* **139**, 5034–5041 (1998).
55. Loviscach, M. *et al.* Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* **43**, 304–311 (2000).
56. Spangenburg, E. E., Brown, D. A., Johnson, M. S. & Moore, R. L. Alterations in peroxisome proliferator-activated receptor mRNA expression in skeletal muscle after acute and repeated bouts of exercise. *Mol. Cell. Biochem.* **332**, 225–231 (2009).
57. Hevener, A. L. *et al.* Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* **9**, 1491–1497 (2003).
58. Amin, R. H., Mathews, S. T., Camp, H. S., Ding, L. & Leff, T. Selective activation of PPARgamma in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E28-37 (2010).
59. Kim, Y.-B. *et al.* Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110beta protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **51**, 443–448 (2002).
60. Hällsten, K. *et al.* Rosiglitazone but Not Metformin Enhances Insulin- and Exercise-Stimulated Skeletal Muscle Glucose Uptake in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes* **51**, 3479–3485 (2002).
61. Ristow, M., Müller-Wieland, D., Pfeiffer, A., Krone, W. & Kahn, C. R. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *N. Engl. J. Med.* **339**, 953–959 (1998).
62. Barroso, I. *et al.* Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* **402**, 880–883 (1999).
63. Norris, A. W. *et al.* Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* **112**, 608–618 (2003).

64. McAinch, A. J. *et al.* Dietary regulation of fat oxidative gene expression in different skeletal muscle fiber types. *Obes. Res.* **11**, 1471–1479 (2003).
65. Li, G.-S. *et al.* Skeletal muscle insulin resistance in hamsters with diabetes developed from obesity is involved in abnormal skeletal muscle LXR, PPAR and SREBP expression. *Exp. Ther. Med.* **11**, 2259–2269 (2016).
66. Hauner, H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **18 Suppl 2**, S10-15 (2002).
67. Lehmann, J. M. *et al.* An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).
68. Fukui, Y., Masui, S., Osada, S., Umesono, K. & Motojima, K. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes* **49**, 759–767 (2000).
69. Kintscher, U. Pharmacological Differences of Glitazones. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 882–884 (2008).
70. Chawla, A. *et al.* A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* **7**, 161–171 (2001).
71. Chinetti, G. *et al.* PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* **7**, 53–58 (2001).
72. Ogata, M. *et al.* On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression. *Atherosclerosis* **205**, 413–419 (2009).
73. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  Agonist, GW501516, Regulates the Expression of Genes Involved in Lipid Catabolism and Energy Uncoupling in Skeletal Muscle Cells | Molecular Endocrinology | Oxford Academic. Available at: <https://academic.oup.com/mend/article/17/12/2477/2747399>. (Accessed: 16th April 2018)

74. Buchanan, T. A. *et al.* Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* **51**, 2796–2803 (2002).
75. [beta]-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment : Article : Nature Medicine. Available at: <https://www.nature.com/nm/journal/v13/n3/full/nm1546.html>. (Accessed: 20th June 2017)
76. Miyazaki, Y., He, H., Mandarino, L. J. & DeFronzo, R. A. Rosiglitazone improves downstream insulin receptor signaling in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **52**, 1943–1950 (2003).
77. Petersen, K. F. *et al.* Mechanism of troglitazone action in type 2 diabetes. *Diabetes* **49**, 827–831 (2000).
78. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
79. Charan, J. & Kantharia, N. D. How to calculate sample size in animal studies? *J. Pharmacol. Pharmacother.* **4**, 303–306 (2013).
80. Suter, S. L., Nolan, J. J., Wallace, P., Gumbiner, B. & Olefsky, J. M. Metabolic Effects of New Oral Hypoglycemic Agent CS-045 in NIDDM Subjects. *Diabetes Care* **15**, 193–203 (1992).
81. Mayerson, A. B. *et al.* The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 797–802 (2002).
82. Collino, M. *et al.* Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1892–1902 (2010).
83. Chiarelli, F. & Di Marzio, D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc. Health Risk Manag.* **4**, 297–304 (2008).

84. Koh, E. H. *et al.* Intracellular fatty acid metabolism in skeletal muscle and insulin resistance. *Curr. Diabetes Rev.* **1**, 331–336 (2005).
85. Hevener, A. L., Reichart, D. & Olefsky, J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* **49**, 2154–2159 (2000).
86. Li, A. C. *et al.* Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\gamma$ . *J. Clin. Invest.* **114**, 1564–1576 (2004).
87. Way, J. M. *et al.* Adipose Tissue Resistin Expression Is Severely Suppressed in Obesity and Stimulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Agonists. *J. Biol. Chem.* **276**, 25651–25653 (2001).
88. Choi, J. H. *et al.* Obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR $\gamma$  ligands. *Nature* **466**, 451–456 (2010).
89. Díaz López, M. *et al.* Efecto de la modulación de PPAR $\gamma$  sobre la vía reversa del colesterol. *MedUNAB* **9**, (2010).
90. Muscat, G. E. O. *et al.* Regulation of Cholesterol Homeostasis and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle by Liver X Receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 40722–40728 (2002).
91. Jiang, M. & Li, X. Activation of PPAR $\gamma$  does not contribute to macrophage ABCA1 expression and ABCA1-mediated cholesterol efflux to apoA1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 849–856 (2017).
92. Tarpey, M. D. *et al.* Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skelet. Muscle* **8**, 14 (2018).
93. Ozasa, H. *et al.* Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR $\gamma$ /LXR $\alpha$  pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* **219**, 141–150 (2011).

94. Kennedy, M. A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* **1**, 121–131 (2005).
95. Du, Y., Wang, L., Si, S., Yang, Y. & Hong, B. A novel compound 4010B-30 upregulates apolipoprotein A-I gene expression through activation of PPAR $\gamma$  in HepG2 cells. *Atherosclerosis* **239**, 589–598 (2015).
96. Wang, J. *et al.* Effects of ABCA1 variants on rosiglitazone monotherapy in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 252–258 (2008).
97. Savage, D. B. PPAR gamma as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert Rev. Mol. Med.* **7**, 1–16 (2005).
98. Al-Khalili, L. *et al.* Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* **48**, 1173–1179 (2005).
99. Siegel, R. D., Cupples, A., Schaefer, E. J. & Wilson, P. W. Lipoproteins, apolipoproteins, and low-density lipoprotein size among diabetics in the Framingham offspring study. *Metabolism.* **45**, 1267–1272 (1996).
100. Goldberg, R. B. *et al.* A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* **28**, 1547–1554 (2005).
101. Keskin, M., Kurtoglu, S., Kendirci, M., Atabek, M. E. & Yazici, C. Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *Pediatrics* **115**, e500-503 (2005).

102. Nuutila, P. *et al.* Effect of antilipolysis on heart and skeletal muscle glucose uptake in overnight fasted humans. *Am. J. Physiol.* **267**, E941-946 (1994).
103. Beeson, M. *et al.* Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)<sub>3</sub> is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes* **52**, 1926–1934 (2003).
104. Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–806 (2001).

