

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención Bioanálisis Clínico
Molecular, Hematología y Medicina Transfusional.*

*“Estudio de la expresión de los receptores ErbBs en músculos rápidos y lentos
de ratones obesos y normopesos”*

Alumno: Ximena Alexandra Ramírez Qüinlan
Tutora: PhD. Nevenka Juretić
Cotutora: PhD. Paola Llanos

Una firma manuscrita en tinta oscura, que parece ser la del tutor, sobre una línea horizontal.

Firma tutora

Una firma manuscrita en tinta oscura, que parece ser la de la cotutora, sobre una línea horizontal.

Firma cotutora

Fecha: 10 de julio del 2019

Agradecimientos

Dra. Nevenka Juretić, Programa Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina Universidad de Chile. Proyecto Puente-ICBM 2018/02.

Dra. Paola LLanos, Instituto de Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología Universidad de Chile. Proyecto FONDECYT 1190406.

Índice

Resumen	4
Introducción	6
Obesidad	6
Músculo esquelético: diferentes tipos de fibras musculares y sus funciones	7
Músculo en obesidad: adaptación de fibras musculares	8
Vía de Neuregulina y receptores ErbBs	9
Vía de Neuregulina y receptores ErbBs. Rol en obesidad	11
Hipótesis y objetivos	13
Materiales y métodos	
Aprobación ética y preparación de los animales y extracción de los músculos	14
Extracción del RNA total de músculos enteros	15
Síntesis de DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa y Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR)	16
Western blot para receptores ErbBs	17
Análisis estadístico	18
Resultados	19
Discusión	24
Conclusión	28
Bibliografía	29
Anexos	32

Resumen

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el organismo. Junto con el sedentarismo y la alimentación poco saludable, la obesidad contribuye a la aparición del Síndrome metabólico, el cual se describe como un conjunto de alteraciones metabólicas que incrementan la posibilidad de padecer problemas vasculares, cardíacos, cerebrales y diabetes. El músculo esquelético es el órgano más importante para la homeostasis de la glucosa, ya que es el responsable de aproximadamente el 80% de la captación y catabolismo de la glucosa estimulada por insulina en condiciones normales. Estudios previos han relacionado la vía de NRG/receptores ErbBs con el metabolismo de la glucosa en músculos esqueléticos durante la contracción muscular o con la síntesis de colesterol. Sin embargo, no existe un estudio acabado respecto a la caracterización de los receptores ErbBs en los diferentes tipos musculares (rápidos y lentos) ni en condiciones de normopeso y obesidad. **Hipótesis:** En músculos rápidos de ratones obesos aumenta la expresión de los receptores ErbBs en comparación a ratones normopesos, efecto que no ocurre en músculos lentos de ratones obesos. **Objetivo general:** Evaluar la expresión de los receptores ErbBs en músculos rápidos y lentos de ratones obesos y normopesos. **Material y método:** Para esta investigación, ratones C57BL/6J fueron alimentados con una dieta control (DC) o alta en grasas (DAG) durante 12 semanas. A partir de ellos se obtuvieron los músculos tibiales anterior (TA), flexor digital de los dedos (FDB), extensor largo de los dedos (EDL), sóleos (S) y gastrocnemio (G), en donde se determinó el nivel relativo de expresión del RNAm de los receptores ErbBs mediante PCR en tiempo real (qPCR). Además, utilizando Western blot se evaluó el contenido proteico relativo en estas mismas condiciones para finalmente comparar el nivel de expresión de cada receptor estudiado en base al tipo de músculo analizado. **Resultados:** En el músculo FDB se observó una disminución significativa de los niveles de RNAm para ErbB2, ErbB3 y ErbB4 en ratones obesos comparado con los normopeso, mientras que para el músculo EDL se

observó un aumento significativo en los 3 receptores estudiados. En tanto, en los músculos G y TA se observó una disminución significativa de los niveles de RNAm sólo para ErbB4 de ratones alimentados con DAG comparado con los DC. Con respecto a los niveles proteicos, sólo se pudo determinar un aumento significativo de ErbB3 en el músculo FDB, a pesar de la disminución observada por qPCR.

Conclusión: Contrario a lo planteado en la hipótesis, en este estudio no se pudo establecer una correlación directa entre el tipo de fibra muscular y los niveles de expresión de los receptores ErbBs. Sin embargo, los resultados obtenidos tanto por qPCR como Western blot sugieren que existe una expresión diferencial de los receptores ErbBs tanto en condiciones de obesidad como en normopeso.

Introducción

Obesidad

De acuerdo a la Organización mundial de la salud, la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa en el organismo (1). La última Encuesta Nacional de Salud (ENS) realizada el 2016-2017 por el Ministerio de Salud, y publicada en noviembre de este año, reveló que el 74,2% de las personas mayores de 15 años en nuestro país tiene exceso de peso; catalogando al 31,2% como obesos, 39,8% con sobrepeso y el 3,2% con obesidad mórbida en base al cálculo del índice de masa corporal (IMC) (2). Basados en estos porcentajes, Chile se ubica dentro de los cinco países con mayores tasas de obesidad en Latinoamérica, lo que denota un serio problema de salud a nivel nacional (2).

El sobrepeso y la obesidad disminuyen la expectativa de vida, empeoran la calidad de vida y aumentan el riesgo de mortalidad por causas principalmente cardiovasculares, diabetes y cáncer, asociándose a más de 60 enfermedades y trastornos (1).

Junto con el sedentarismo y la alimentación poco saludable, la obesidad contribuye a la aparición del Síndrome metabólico, el cual se describe como un conjunto de alteraciones metabólicas que incrementan la posibilidad de padecer problemas vasculares, cardíacos, cerebrales y diabetes. Entre ellas se encuentran la hipertensión, intolerancia a la glucosa (que puede progresar a resistencia a la insulina con posterior desencadenamiento de diabetes mellitus), obesidad central y dislipidemia (definida como el aumento de triglicéridos y LDL y disminución de HDL) (3).

El músculo esquelético es el órgano más importante para la homeostasis de la glucosa en el organismo, ya que es el responsable de aproximadamente el 80% de la captación y catabolismo de la glucosa estimulada por insulina en condiciones normales. La resistencia a la insulina en el músculo esquelético es el principal defecto en diabetes mellitus tipo 2, por lo tanto, la

desregulación del metabolismo de este órgano es fundamental para el desarrollo de dichas patologías (4).

Músculo esquelético: diferentes tipos de fibras musculares y sus funciones

El músculo esquelético es un tejido altamente dinámico sometido a constantes remodelaciones en base a las diversas demandas metabólicas y funcionales del organismo (5).

La unidad funcional del músculo es la fibra muscular o miocito, existiendo diferentes tipos de ellas, las cuales varían en sus propiedades mecánicas, bioquímicas y metabólicas. La proporción relativa de los tipos de fibras en un músculo está determinada en base a su funcionalidad en el organismo, puesto que las fibras tipo I son fibras de contracción lenta, presentan alta resistencia a la fatiga, poseen alta capacidad oxidativa, son ricas en mitocondrias y se presentan en mayores proporciones principalmente en músculos de sostén y equilibrio postural. Por otro lado, las fibras tipo II son de contracción rápida debido a su alta intensidad y velocidad durante la contracción, por ello es que se fatigan rápidamente. Este tipo de fibras posee una subclasificación en fibras IIA, IIX y IIB. Las fibras IIA poseen características oxidativas, mientras que las IIB un predominio del metabolismo glucolítico para sus funciones y, se encuentran en mayores proporciones en músculos encargados de ejercicios de potencia o deportes que implican movimientos. Existen músculos mixtos que poseen niveles similares de ambos tipos de fibra muscular (5). En ratones de la cepa C57BL/6J, se ha descrito que en el músculo sóleo hay un predominio de fibras tipo I y IIA, siendo catalogado como un músculo lento oxidativo, mientras que los músculos gastrocnemio (G), tibial anterior (TA) y extensor largo de los dedos (EDL) poseen predominantemente fibras tipo IIB siendo clasificados como músculos rápidos glicolíticos. En tanto, en el músculo flexor digital de los dedos (FDB) hay un predominio de fibras tipo IIA, por lo que es reconocido como un músculo rápido oxidativo (6).

Músculo en obesidad: adaptación de fibras musculares

La evidencia indica que existe una estrecha relación entre un aumento en el almacenamiento de triglicéridos en el músculo esquelético y la resistencia a la insulina. Los mecanismos potenciales para esta asociación incluyen defectos aparentes en el metabolismo de los ácidos grasos que se centran en las mitocondrias en obesidad (7).

El contenido lipídico varía de acuerdo al tipo de fibra muscular, por lo general, las fibras lentas del tipo oxidativas contienen mayores niveles lipídicos que las fibras de contracción rápida tipo II, y a su vez, las fibras rápidas oxidativas (IIA) poseen mayores niveles que las rápidas glicolíticas (IIB). Por otro lado, se ha descrito que la actividad de las enzimas oxidativas es mayor en las fibras tipo I, además, éstas poseen una mayor sensibilidad a la insulina y una mayor capacidad para la absorción de ácidos grasos que las fibras tipo IIA y IIB (7).

En consecuencia, los músculos de ratones alimentados con una dieta alta en grasa prolongada en el tiempo cambian su morfología adaptando el tipo de fibra muscular desde fibras IIB (fibras rápidas y glicolíticas) a fibras IIA (rápidas y oxidativas) (8, 9, 10). Por ejemplo, en un estudio realizado en ratones machos de la cepa C57BL/6J alimentados con una dieta alta en grasas por 12 semanas, se determinó que en el músculo EDL aumentó el porcentaje de fibras IIA/X a expensas de la disminución de las fibras IIB (10).

El músculo esquelético es un órgano que posee una gran capacidad de flexibilidad metabólica, cambiando de predominantemente la oxidación de lípidos durante las condiciones de ayuno, acompañada de altas tasas de absorción de ácidos grasos, a una mayor captación, oxidación y almacenamiento de glucosa en condiciones estimuladas con insulina. Sin embargo, en condiciones de obesidad, donde se observa una resistencia a la insulina periférica, se manifiesta una mayor

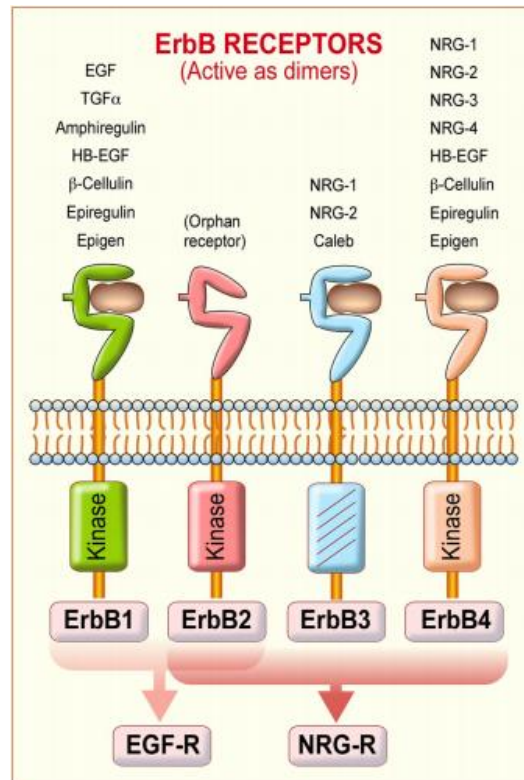
oxidación de los lípidos durante las condiciones estimuladas con insulina, lo que da cuenta de la pérdida de la flexibilidad metabólica que posee un músculo esquelético no sano (7).

Vía de Neuregulina y receptores ErbBs

Se ha descrito que el músculo es capaz de sintetizar y secretar proteínas denominadas mioquinas que podrían estar involucradas en la regulación muscular del metabolismo energético. Neuregulina (NRG) es una mioquina perteneciente a la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF). Se han identificado 4 genes, que codifican para NRG-1 a la 4, siendo NRG-1 la más estudiada en músculo esquelético. Las diferentes isoformas de NRG se expresan principalmente de células de origen endotelial, mesenquimático y neural, por lo que su participación es de gran importancia en procesos de proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de varios tipos celulares tales como las células del epitelio, el nervio, el músculo cardíaco y esquelético. El gen de la NRG-1 codifica múltiples isoformas generadas por el splicing alternativo y el uso de un promotor diferencial. La mayoría de las isoformas de NRG-1 contienen un dominio de transmembrana que puede sufrir un corte proteolítico mediado por la metaloproteasa ADAM17/TACE o ADAM19/meltrin-B que permite su unión a los receptores de NRG denominados receptores ErbBs. Dos de los principales eventos estudiados que inducen la escisión proteolítica de NRG-1 de transmembrana es la estimulación de la actividad nerviosa y la contracción muscular (11, 12)

Los receptores ErbBs, símbolo genético derivado del nombre de un oncogén viral de la leucemia eritroblástica, son una familia de receptores proteicos que presentan actividad tirosina quinasa y están relacionadas estructuralmente con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta familia está compuesta por 4 miembros: ErbB-1 también llamado EGFR o HER-1, ErbB-2 o HER-2, ErbB-3 o HER-3 y ErbB-4 o HER-4 (13, 14).

Figura 1. Caracterización de los receptores ErbBs junto a sus ligandos reconocidos (10).



Como se muestra en la Figura 1, de todos estos receptores, ErbB1 no reconoce a NRG, pero si otros ligandos; ErbB2 carece de un dominio de unión a ligando, pero posee un dominio citosólico tirosina quinasa catalíticamente activo, y el receptor ErbB3 reconoce a NRG, pero carece de actividad tirosina quinasa. Sólo el receptor ErbB4 posee tanto la capacidad de unión a NRG como la actividad tirosina quinasa, por lo que puede activarse como homo o heterodímero. Los otros receptores deben necesariamente heterodimerizar para complementarse y ser funcionales para la vía activada por NRG. Estos receptores forman homo y heterodímeros y, se ha descrito que la activación del dominio tirosina quinasa conduce a la activación de un amplio rango de vías de señalización como PLCy, ERK 1/2, p38 MAPK, PI3-K/Akt, entre otras (10).

La vía de señalización NRG/receptores ErbBs ha sido estudiada en varios contextos. En el músculo esquelético se ha descrito su participación en el metabolismo de la glucosa durante la contracción muscular. Producto del ejercicio, se produce un aumento del calcio intracelular que activa una

metaloproteasa que produce un procesamiento proteolítico de la NRG-1 de transmembrana, favoreciendo la liberación del dominio que actúa como ligando del heterodímero formado por ErbB2/ErbB4. Esto desencadena la fosforilación y activación de una proteína quinasa que estaría involucrada en el aumento de la captación de la glucosa gracias a la traslocación de los transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana celular (10). De esta manera, NRG cumple una función homóloga a la insulina, ya que ambas favorecen la traslocación de los GLUT4 a la membrana celular para facilitar la captación y el ingreso de la glucosa a través de ellos hacia el citosol (10).

Por otra parte, estudios realizados en ratas adultas han descrito que la administración aguda de NRG-1 aumenta significativamente la activación del receptor ErbB3, medida a través de su fosforilación, y la proteína quinasa Akt. La activación de esta vía, tendría un efecto en la disminución de la glucosa en el hígado debido a la inhibición de la expresión de los genes que codifican las enzimas gluconeogénicas (15).

Vía de Neuregulina y receptores ErbBs. Rol en obesidad

Estudios realizados por Ennequin G y colaboradores en el año 2015 han descrito que el entrenamiento de ratas obesas con ejercicios de resistencia de baja intensidad, combinado con un cambio a dieta control, promueven la actividad de ADAM17, lo que resulta en la escisión de NRG-1 y la activación del receptor ErbB4. Por lo que se ha sugerido que la vía NRG-1/ErbB4 puede contribuir a mejorar del metabolismo energético observado regularmente después de las intervenciones de dieta y ejercicio (16).

De igual manera, experimentos realizados en ratones inducidos a obesidad por una dieta alta grasa han reportado una disminución de NRG-4 en tejido adiposo. Además, se demostró que la transferencia de un plásmido con el gen de NRG-4 en ratones de 8 semanas de edad, generó un

efecto protector ante la obesidad evidenciado en un peso corporal significativamente menor que el de los animales controles (17).

Por otra parte, se ha descrito un posible rol perjudicial asociado a la activación de la vía de NRG-1/homodímero ErbB4, que conduce a la activación de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP) que actúa como factor transcripcional de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol, tales como β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCOA), HMGCOA sintetasa 1 y los receptores para LDL (18).

A pesar de las importantes funciones descritas para esta vía en condiciones fisiológicas y de obesidad, hasta la fecha no hay estudios que describan la expresión de los receptores ErbBs en distintos tipos de músculos de ratones obesos y normopesos. Esta caracterización será el punto de partida hacia nuevos estudios que nos permitan dilucidar vínculos moleculares de gran interés.

Tomados en conjunto, estos antecedentes sugieren que los receptores ErbBs aumentan su expresión en músculos rápidos en condiciones de obesidad, donde existe un aumento de colesterol y lípidos junto con una resistencia a la insulina.

Hipótesis

En músculos rápidos de ratones obesos aumenta la expresión de los receptores ErbBs en comparación a ratones normopesos, efecto que no ocurre en músculos lentos de ratones obesos.

Objetivo general

Evaluar la expresión relativa de los receptores ErbBs en músculos rápidos y lentos de ratones obesos y normopesos.

Objetivos específicos

1. Estudiar el nivel de expresión relativa del RNAm de los receptores ErbB2, ErbB3 y ErbB4 en diferentes tipos de músculos de ratones obesos y normopesos por PCR en tiempo real (q-PCR).
2. Determinar el nivel de expresión proteica relativa de los receptores ErbBs en diferentes tipos de músculos de ratones obesos y normopesos por Western blot.

Materiales y método

1. Aprobación ética

Los animales se utilizaron de acuerdo con el protocolo de uso y cuidado de animales #1065 aprobado por la Comisión de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile asociado al proyecto FONDECYT Regular N°1190406. Esta tesis cumple con los requerimientos básicos de bioseguridad para ser desarrollado, y se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT Bioseguridad 1a edición, 1994, Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ta edición y el Manual de Bioseguridad en Laboratorios (Organización Mundial de la Salud, OMS, Ginebra 2005) (Anexo 1).

2. Preparación de los animales y extracción de los músculos.

Para esta investigación se utilizaron los músculos tibiales anterior (TA), flexor digital de los dedos (FDB), extensor largo de los dedos (EDL), sóleos (S) y gastrocnemios (G) obtenidos desde ratones machos de la cepa C57BL/6J procedentes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estos ratones fueron mantenidos en un ambiente controlado de temperatura constante de 21°C con libre acceso a agua y alimentación en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Cuando los animales alcanzaron un peso corporal de 12-14 gramos (20 días después del destete) se dividieron en dos grupos aleatoriamente: el grupo A (DC) fue sometido a una dieta control compuesta por 10% de grasa, 20% de proteínas y 70% de carbohidratos y el grupo B (DAG), sometido a una dieta alta en grasa compuesta por 60% de grasa, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos.

Adicionalmente se evaluó peso corporal, glicemia, insulinemia, índice de resistencia a la insulina (HOMA) y colesterol sérico como medidas de control metabólico (datos no mostrados). Posteriormente, los animales fueron sometidos a ayuno (6-8 horas) y anestesiados con Isoflurano 2,5% inhalado para la extracción muscular.

3. Extracción del RNA total de músculos enteros.

Para la extracción del RNA a partir de músculos enteros, se utilizó el reactivo de Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras musculares junto al reactivo trizol fueron homogeneizadas mediante el homogeneizador Fluko Superfine Homogenizers (Sumilab) durante 10 seg. para luego colocarlas en hielo por 30 seg. Para cada homogeneización, el vástago del homogeneizador fue lavado con agua sin nucleasas, etanol al 70% y RNAsa away (Invitrogen). Este protocolo se repitió hasta que se observó un fluido homogéneo realizándose mínimo 3 veces. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 min a 4-8°C y se recuperó el sobrenadante. Se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se completó con trizol hasta alcanzar un volumen de 1 ml, para luego proceder a la extracción del RNA.

Las muestras fueron tratadas con 0,2 ml de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 seg. y se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. El RNA contenido en el sobrenadante se precipitó con 0,5 ml de isopropanol, se dejó a temperatura ambiente por otros 10 min y luego se centrifugó a 12.000 rpm por otros 15 min a 4°C. Una vez lavado con etanol al 80%, el precipitado fue resuspendido en 20 µl de H₂O sin nucleasas.

Para eliminar el DNA genómico se utilizó el kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total se determinó espectrofotométricamente mediante la medición de su absorbancia a 260 nm.

4. Síntesis de DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa.

Se siguió el protocolo incluido en el kit para RT-PCR de la enzima Super Script II (Invitrogen). Para ello, una mezcla compuesta por 1 µg de RNA total, 1 µL dNTP 10 mM y 1 µL oligodT 0,5 µg/µL en un volumen final de 10 µl, fue incubada durante 5 min. a 65°C y luego puesta en hielo por al menos un minuto. Posteriormente, se agregó una segunda mezcla que contenía 4 µL Buffer 5x First, 2 µL DTT 0,1 M, 0,25 µL RNAsin, 0,25 µL de transcriptasa reversa Super Script II y 3,5 µL H₂O sin nucleasas. La síntesis del cDNA se realizó incubando el sistema a 42°C por 50 min. y luego a 70°C por 15 min. Además, se incluyó como control un tubo -RT que contenía todos los reactivos excepto la enzima. El cDNA fue guardado a -20°C hasta su utilización.

5. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (qPCR).

Mediante q-PCR se analizaron los niveles de expresión de los receptores ErbBs de los distintos tipos de músculo de ratones normopesos y obesos. Se utilizó Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen constitutivo.

Los partidores utilizados fueron descritos por Oh y cols (12) y se describen en la siguiente tabla:

Partidor	Secuencia
ErbB2 (66 pb)	(S) 5'-GCTGCCCGAAACGTGCTA-3' (AS) 5'-CCGTGCCAGCCCGAA-3'
ErbB3 (72 pb)	(S) 5'-AGGCTTGTCTGGATTCTGTGGTT-3' (AS) 5'-GGGATCGGGTGCAGAGAGA-3'
ErbB4 (70 pb)	(S) 5'-GGAGGCTGCTCAGGACCAA-3' (AS) 5'-ACGCAGGCTCCACTGTCAT-3'
GAPDH (350 pb)	(S) 5'-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3'

	(AS) 5`-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3`
--	----------------------------------

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados.

El qPCR se realizó en un Termociclador Stratagene Mx3000p QPCR System (Agilent Technologies), utilizando el reactivo 5X HOT FIREPol EvaGreen QPCR Mix Plus (Solis BioDyne), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó una mezcla compuesta por 2 µL partidores 5uM (mezcla de partidador sentido y antisentido), 13 µL H₂O sin nucleasas y 4 µL EvaGreen. A cada tubo se agregó 19 µL de esta mezcla y 1 µL del cDNA correspondiente. Se incluyó como control un blanco, que contiene todos los reactivos excepto el cDNA de las muestras. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Para realizar la cuantificación del cDNA tanto de los genes de interés como del gen constitutivo, se utilizó el programa *Mxpro Software* (Comparative quantification) de Stratagene. El análisis de los resultados se efectuó a través del algoritmo Delta-Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)(19).

6. Western blot para receptores ErbBs.

Para la extracción de proteínas a partir de muestras musculares se utilizó el homogeneizador Fluko Superfine Homogenizers (Sumilab) junto a un buffer de lisis que contiene tampón T-PER (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) complementado con inhibidores de proteasas (EGTA 100 mM, EDTA 100 mM, BAPTA 100 mM, PMSF 200 mM, Benzamidina), inhibidores de fosfatasas (Na₃VO₄ 1 M, NaF 1 M) y un coctel completo de inhibidores 2x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Este proceso se lleva a cabo en todo momento en hielo y se realizó inmediatamente después de la extracción muscular.

Posterior a la homogenización manual, los lisados celulares fueron sonicados por 5 min. a 4°C y mantenidos en hielo por 10 min., para luego ser centrifugados a 4.000 g por 20 min. a 4°C. El pellet fue descartado y el sobrenadante almacenado a -80 °C hasta su utilización. La determinación de la

concentración de proteínas se realizó por el método Sulfosalicílico, utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA). La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Brevemente, 40 μ g totales de proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% y transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo fueron incubados a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Anti-ErbB2 (ab131490), Anti-ErbB3 (ab5470) y Anti-ErbB4 (ab137412) adquiridos en Abcam. El anticuerpo contra β -Tubulina fue adquirido en Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA. Posterior al lavado, las membranas fueron incubadas por dos horas con el anticuerpo secundario anti-conejo a razón de dilución 1:5000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La detección se realizó por quimioluminiscencia por métodos estándares.

Para el análisis de los resultados obtenidos mediante Western blot se utilizó el programa ImageJ, el cual permite generar un análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas.

7. Análisis estadístico

El resultado de los experimentos se expresó como valor promedio \pm error estándar (SEM), y la significancia de las diferencias fue evaluada usando el test de T de Student para datos no pareados considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

1. Expresión de los receptores ErbBs en distintos tipos de músculos de ratones obesos y normopeso, mediante qPCR.

Para determinar los niveles de expresión relativa del RNAm de los receptores ErbBs en distintos tipos de músculos aislados desde ratones alimentados con dieta control (DC) y dieta alta en grasas (DAG), se realizaron estudios de qPCR. Los músculos rápidos analizados fueron: Gastrocnemio (G), Tibial anterior (TA), Flexor digital de los dedos (FDB) y Extensor largo de los dedos (EDL). En tanto, el músculo lento analizado fue Sóleo (S).

Nuestros resultados indican que existe una expresión diferencial del RNAm de cada receptor en los diversos tipos musculares analizados. Los niveles de RNAm para el receptor ErbB2 disminuyeron significativamente ($0,12 \pm 0,03$ veces) en el músculo FDB de ratones alimentados con DAG comparado con el grupo DC, cuyos valores fueron normalizados a 1; mientras que para el músculo EDL, se observó un aumento significativo en los niveles de RNAm de este mismo receptor ($4,83 \pm 0,32$ veces) en el grupo DAG comparado con el DC. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los niveles de RNAm de los músculos S, G y TA (Figura 2A).

Asimismo, los niveles de RNAm para el receptor ErbB3 disminuyeron significativamente ($0,09 \pm 0,04$ veces) en el músculo FDB de ratones alimentados con DAG comparado con el grupo DC; en tanto, para el músculo EDL se observó un aumento significativo en los niveles del RNAm ($4,04 \pm 0,53$ veces) de ratones DAG en comparación a ratones DC. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de RNAm de los músculos S, G y TA (Figura 2B).

Los niveles del RNAm para el receptor ErbB4 en los ratones DAG disminuyeron significativamente en los músculos G, TA y FDB alcanzando valores de $0,39 \pm 0,1$; $0,32 \pm 0,09$ y $0,22 \pm 0,13$ veces, respectivamente, comparados a los DC. Contrariamente, los niveles del RNAm para este mismo receptor en el músculo EDL aumentaron significativamente ($1,95 \pm 0,59$ veces) en el grupo DAG en

comparación al DC. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en los niveles del RNAm en el músculo S (Figura 2C).

Por lo tanto, para los 3 receptores se observan diferencias significativas en el músculo FDB y EDL de ratones alimentados con DAG comparados con el grupo DC. Sin embargo, a pesar de ambos ser músculos rápidos, en FDB se observa una disminución de la expresión génica de los 3 receptores analizados, mientras que en EDL se observa un aumento, aunque el aumento es menor en ErbB4 en comparación a ErbB2 y ErbB3 (Figura 2).

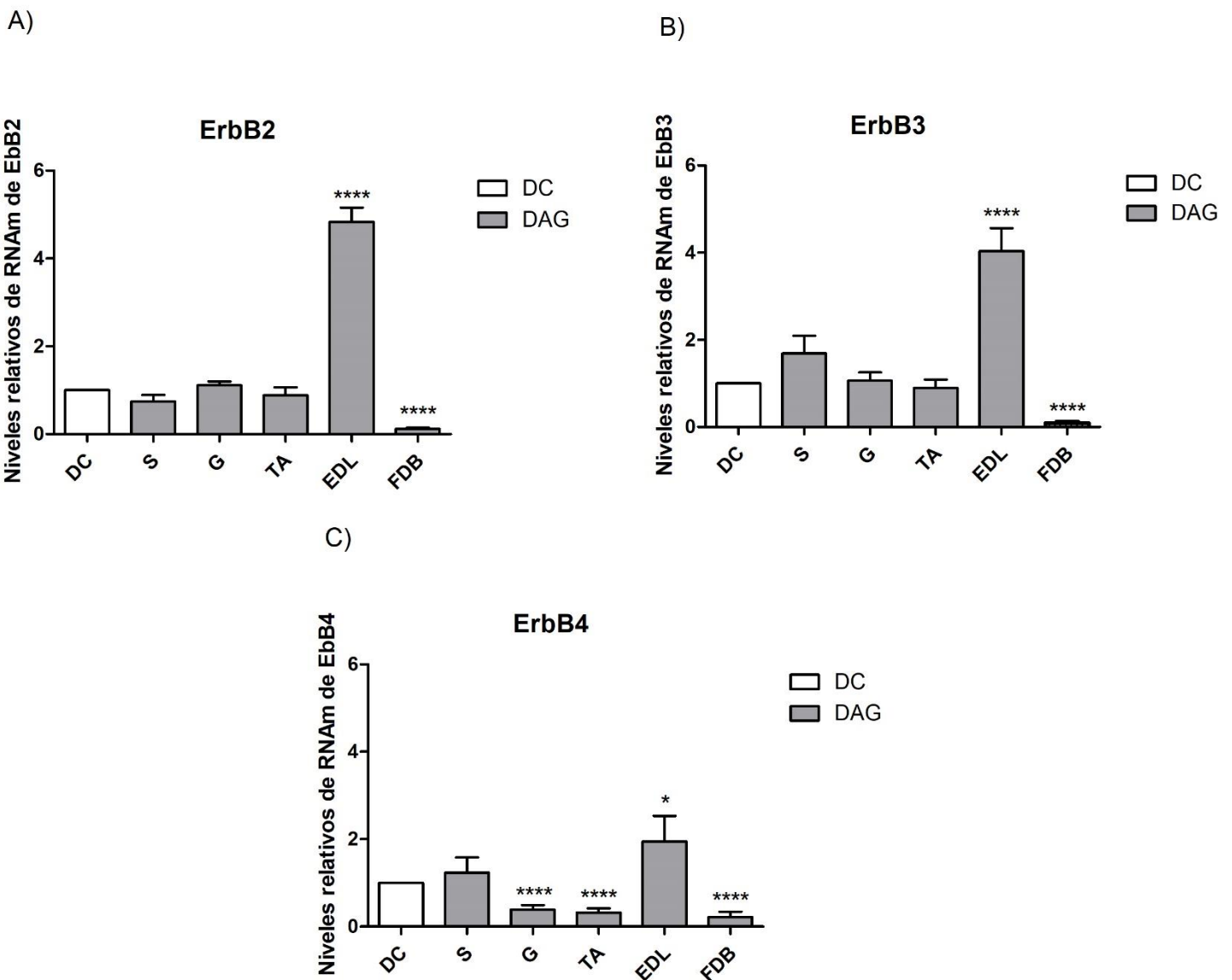


Figura 2. Niveles relativos de RNAm para los receptores ErbBs en diferentes músculos de ratones alimentados con DAG y DC. Los resultados se presentan como el promedio grupal \pm SEM. La normalización fue realizada respecto a los niveles de RNAm de GAPDH. DC fue normalizado a 1 para cada tipo de músculo. **** $p \leq 0,0001$, * $p \leq 0,04$ determinados aplicando Unpaired t-test mediante el programa GraphPad Prism v.6.01. **a)** Nivel de expresión del RNAm de ErbB2. DC (n=9); G (n=9); S y FDB (n=8); TA (n=7) y EDL (n=5). **b)** Nivel de expresión del RNAm de ErbB3. DC, S, G y FDB (n=8); TA (n=7) y EDL (n=5). **c)** Nivel de expresión del RNAm de ErbB4. DC y G (n=8), S (n=7), TA y FDB (n=5) y EDL (n=4).

2. Niveles de expresión proteicos de los receptores ErbBs en distintos tipos de músculos de ratones obesos y normopeso, mediante Western blot

Para determinar los niveles relativos de expresión proteica de los receptores ErbBs en distintos tipos de músculos aislados desde ratones alimentados con DC y DAG, se realizaron estudios de Western blot. Los músculos rápidos analizados fueron: Gastrocnemio (G), Tibial anterior (TA), Flexor digital de los dedos (FDB) y Extensor largo de los dedos (EDL). En tanto, el músculo lento analizado fue Sóleo (S).

La Figura 3A muestra la detección de una banda inmunoreactiva concordante con el peso esperado para el receptor ErbB3 (148-155 kDa) en el músculo S y FDB. De acuerdo al análisis densitométrico de la banda, se determinó un aumento estadísticamente significativo de $2,2 \pm 0,26$ veces los niveles proteicos en el músculo FDB de ratones DAG comparados a ratones DC. El aumento observado en el músculo S no fue estadísticamente significativo (Figura 3B).

Se ha descrito que el peso esperado para el receptor ErbB4 es de 147 kDa. En la figura 4A se observan los niveles proteicos en el músculo S en ratones DAG con respecto a ratones DC. El aumento observado no fue estadísticamente significativo (Figura 4B).

Con respecto a los experimentos efectuados para el músculo G, TA y EDL para los distintos receptores, no se detectaron bandas inmunoreactivas en el peso esperado, por lo que estos datos no fueron incluidos en esta tesis.

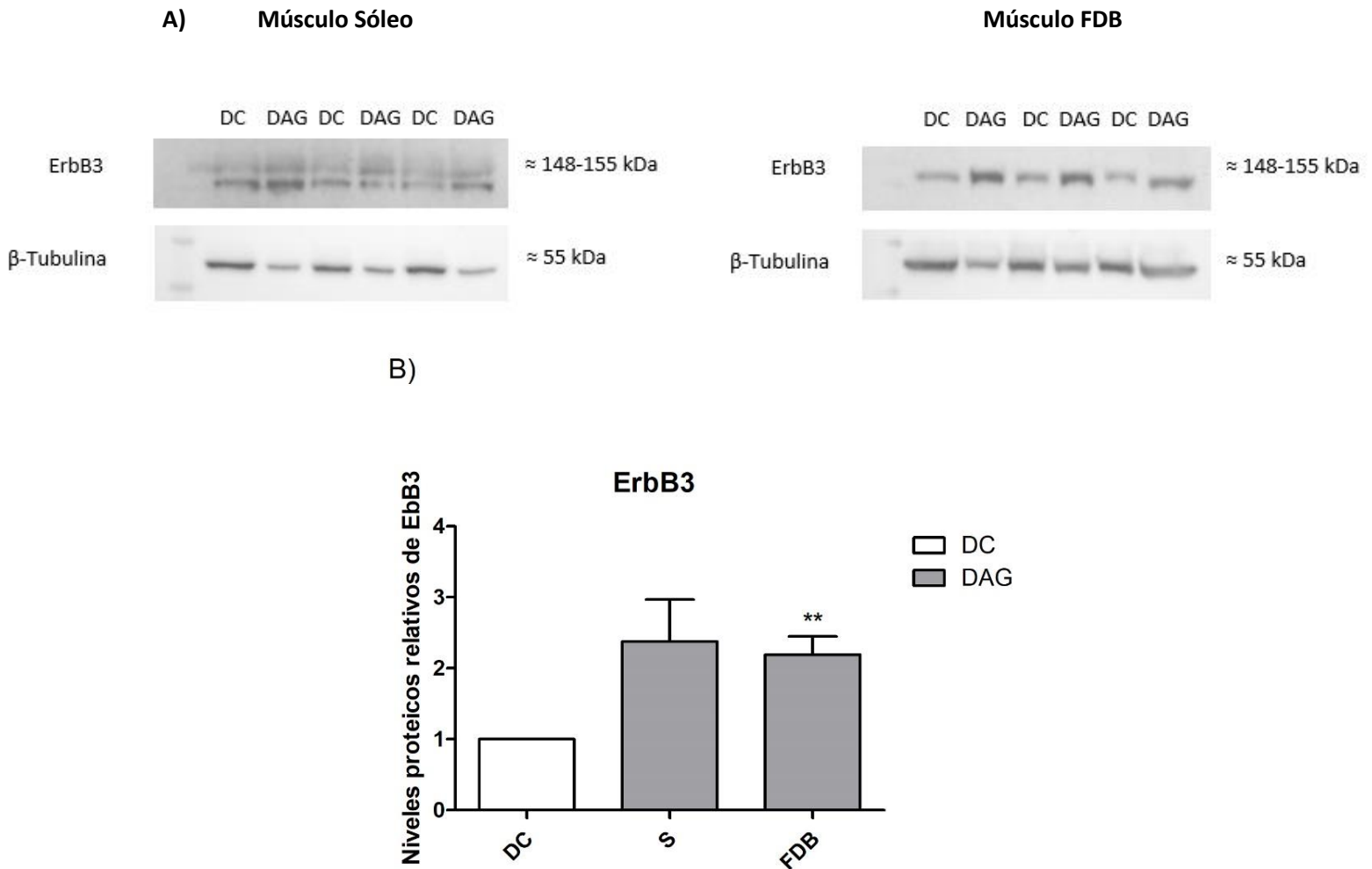


Figura 3. Niveles proteicos relativos del receptor ErbB3 en el músculo S y FDB de ratones alimentados con DAG y DC.

A) Se cargaron 40 μ g de proteínas totales por carril en un gel de poliacrilamida al 8%. β -Tubulina fue utilizada como control de carga. B) Los resultados se presentan como el promedio grupal \pm SEM. La normalización fue realizada respecto a los niveles proteicos de β -Tubulina. ** $p \leq 0,01$ determinados aplicando Unpaired t-test mediante el programa GraphPad Prism v.6.01. S y FDB (n=3).

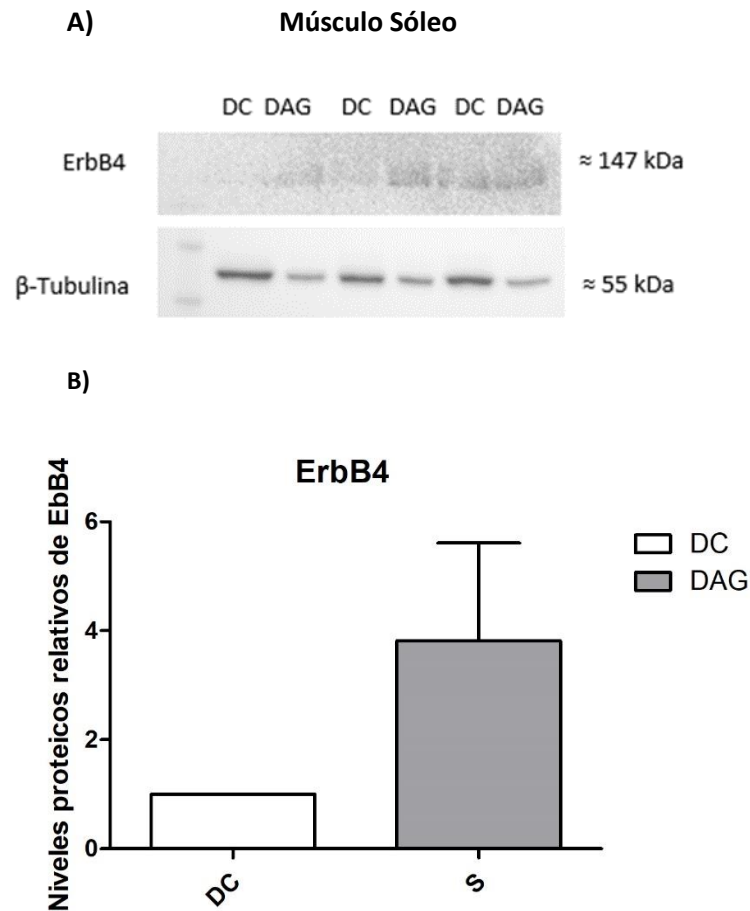


Figura 4. Niveles proteicos relativos del receptor ErbB4 en el músculo S de ratones alimentados con DAG y DC.

A) Se cargaron 40 μ g de proteínas totales por carril en un gel de poliacrilamida al 8%. β -Tubulina fue utilizada como control de carga. B) Los resultados se presentan como el promedio grupal \pm SEM. La normalización fue realizada respecto a los niveles proteicos de β -Tubulina. El análisis estadístico se realizó aplicando Unpaired t-test mediante el programa GraphPad Prism v.6.01, considerando diferencias significativas con un $p < 0.05$. (n=3).

Discusión

La obesidad es considerada actualmente una epidemia debido a la gran población mundial que afecta, a su crecimiento explosivo y a su asociación con alteraciones metabólicas, tales como la resistencia a la insulina (20).

El músculo esquelético es el principal tejido encargado de la homeostasis de la glucosa en hiperglicemia, puesto que es el responsable de aproximadamente el 80% de su captación y catabolismo inducido por insulina (4).

Estudios previos han relacionado la vía de Neuregulina (NRG)/receptores ErbBs con el metabolismo de la glucosa en el músculo. NRG es una mioquina que se expresa y secreta en el músculo esquelético cumpliendo un rol autocrino en este tejido. Los receptores ErbBs pertenecen a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, los cuales han sido relacionados en múltiples aspectos del desarrollo del músculo esquelético y de la regulación de su metabolismo energético (11). Sin embargo, a pesar de las relevantes funciones descritas para la vía de NRG/receptores ErbBs, aún se desconoce las isoformas de los receptores ErbBs (2, 3 y/o 4) que se expresan en los distintos tipos de músculo en condiciones fisiológicas y de obesidad.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la expresión de los receptores ErbB2, ErbB3 y ErbB4 en diversos tipos de músculos, de ratones alimentados por 12 semanas con una dieta control (DC; normopeso) y una dieta alta en grasa (DAG; obesos). Para ello, se analizaron los músculos rápidos G, TA, EDL y FDB y el músculo lento S.

Los resultados muestran que existen diferencias significativas en los niveles relativos de RNAm para los 3 receptores analizados en el músculo FDB y EDL de ratones alimentados con DAG en comparación al grupo DC. Sin embargo, a pesar de que se observa un aumento en la expresión génica en el músculo EDL, en el músculo FDB se observa una disminución. Si bien ambos músculos

están clasificados como músculos rápidos de acuerdo a su morfología, a su alta intensidad y a su velocidad durante la contracción, siendo fatigables rápidamente, ambos poseen un predominio de características metabólicas diferentes, ya que el músculo FDB posee una mayor actividad de enzimas oxidativas y, en el músculo EDL existe un predominio del metabolismo glicolítico (5). Estas diferencias funcionales podrían explicar los resultados obtenidos debido a la asociación de la vía NRG/receptores ErbBs en el metabolismo de la glucosa, sin embargo, en la literatura no existen antecedentes claros que lo relacionen, por lo que es necesario realizar más estudios al respecto.

Como se ha descrito previamente, NRG cumple una función análoga a la insulina, ya que en determinados contextos ambos participan en la translocación de GLUT4 a la membrana (11). Por lo que potenciar la activación de la vía de NRG-1/heterodímero ErbB2-ErbB4 sería beneficioso en obesidad.

Por otra parte, al analizar los niveles proteicos relativos del receptor ErbB3 en el músculo FDB, observamos un aumento significativo de este receptor en ratones alimentados con DAG en comparación al grupo DC, contrario a lo observado mediante qPCR. Al respecto, estudios recientes han descrito que los receptores ErbBs puede ser internalizados en un endosoma, en donde podrían ser: degradados, reciclados para volver a ejercer su función como un receptor de membrana o transportados al núcleo en su forma madura, en donde se desconoce su función (21, 22, 23, 24, 25). Sin embargo, los mecanismos regulatorios de esta metabolización aún no se encuentran dilucidados.

Con respecto a ErbB4, se ha descrito que la metaloproteasa ADAM17 produce un corte proteolítico de este receptor, que libera un fragmento intracelular soluble (dominio ICD) que viaja núcleo y actúa como factor transcripcional, que regula la expresión de genes que codifican para enzimas encargadas de la biosíntesis de colesterol (18). En base a su asociación con la regulación

del colesterol, esperábamos que la expresión del receptor ErbB4 se viera aumentada en condiciones de obesidad. Sin embargo, los resultados obtenidos no dieron cuenta de esto, en los músculos G, TA y FDB se observó una disminución significativa de este receptor en el grupo DAG en comparación al DC, y sólo en el músculo rápido EDL se observa un aumento de su expresión génica. Con respecto a los niveles proteicos de ErbB4, se observó una tendencia a aumentar en el músculo S de ratones obesos, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo, posiblemente por el bajo número de muestras utilizadas (n=2), por lo que se debería aumentar el “n” para confirmar estos resultados (n mayor a 3).

En relación a los experimentos de Western blot, es importante destacar que en esta tesis se realizaron experimentos con todos los músculos para los 3 tipos de receptores. En los primeros ensayos realizados se utilizó un buffer de lisis que contenía un tampón T-PER, EGTA 100 mM, EDTA 100 mM, PMSF 100 mM, Na₃VO₄ 1 M, NaF 1 M y cóctel completo de inhibidores 1x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pero no se pudo observar bandas inmunoreactivas en el peso esperado para los receptores analizados, es por eso que se procedió a reforzar con otros inhibidores como BAPTA 100 mM, Benzamidina, PMSF 200 mM y cóctel completo de inhibidores 2x (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para asegurarse de evitar el procesamiento de estos receptores. La complejidad se debió a que se desconoce a cabalidad los mecanismos de regulación asociados a esta familia de receptores y además, no se contaba con inhibidores contra las metaloproteasas específicas (ADAM17) que se han descrito como parte de la vía de metabolización (18, 24). Sumado a lo anterior, no se pudo contar con un control positivo efectivo, ya que, siguiendo las especificaciones del fabricante de los anticuerpos utilizados, se probaron células del hipocampo, sin embargo, tampoco se pudieron detectar bandas inmunoreactivas en el peso esperado debido a que en su proceso de extracción de proteínas no fue utilizado un buffer de lisis reforzado.

Por otra parte, debido a lo descrito en la literatura sobre la localización de estos receptores (de membrana y nuclear), sería interesante evaluarlos también por métodos como inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, entre otros, ya que por efectos de tiempo no pudo ser posible en esta instancia.

Como se puede observar en el análisis de Western blot, β -Tubulina fue utilizada como control de carga. Sin embargo, se observa que existe una diferencia en la intensidad de las bandas al comparar su abundancia en ratones alimentados con DAG con el grupo DC. Para comprobar que la carga de las proteínas totales fue efectuada de forma pareja en todos los carriles y músculos analizados, se procedió a teñir la membrana con Azul de Coomassie, ya que este colorante posee afinidad contra las proteínas. La Figura 5 muestra a modo de ejemplo una membrana teñida, que da cuenta que todos los carriles fueron cargados con una concentración de proteínas similares. Sin embargo, se recomienda utilizar otra proteína como control de carga en los próximos estudios.

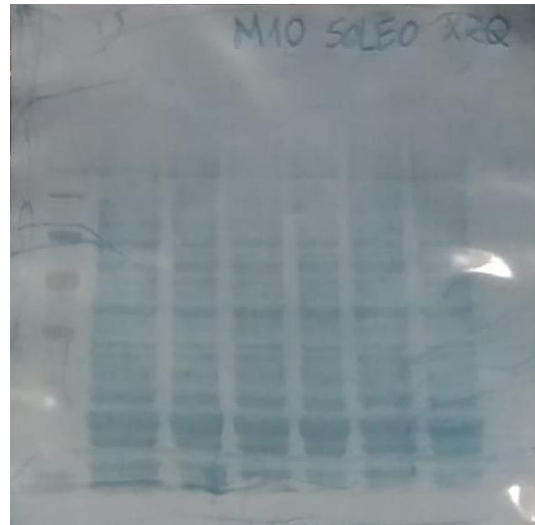


Figura 5. Membrana de PVDF teñida con Azul de Coomassie.

Conclusión

Contrario a lo planteado en la hipótesis, en este estudio no se pudo establecer una correlación directa entre el tipo de fibra muscular y los niveles de expresión de los receptores ErbBs, sin embargo, los resultados obtenidos tanto por qPCR y Western blot sugieren que existe una expresión diferencial de los receptores ErbBs tanto en condiciones de obesidad como en normopeso.

Los nuevos antecedentes adquiridos en este estudio permiten caracterizar la expresión de los receptores ErbBs en el músculo en condiciones fisiológicas como de obesidad:

- En el músculo rápido oxidativo FDB se observó una disminución significativa de los niveles de RNAm para ErbB2, ErbB3 y ErbB4 de ratones obesos comparado con los normopeso, junto con un aumento significativo de los niveles proteicos de ErbB3.
- En el músculo rápido glicolítico EDL se observó un aumento significativo de los niveles de RNAm para ErbB2, ErbB3 y ErbB4 de ratones del grupo DAG con respecto al grupo DC.
- En los músculos rápidos glicolíticos G y TA de ratones obesos se observó una disminución significativa de los niveles de RNAm para ErbB4, comparado con el grupo DC.
- En el caso de músculo lento oxidativo S, no se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de RNAm para ninguno de los receptores analizados, sin embargo se observó una tendencia al aumento en los niveles proteicos de ErbB4.

Los cambios en la expresión de estos receptores en ratones obesos podrían estar asociados a alteraciones en la vía de NRG/ErbBs, lo cual permitiría estudiar su implicancia en trastornos metabólicos relacionados con la obesidad.

Bibliografía

1. OMS|Obesidad [Internet]. [citado 7 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/topics/obesity/es/>
2. MINSAL. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 Primeros resultados. Departamento de Epidemiología División de Planificación Sanitaria Subsecretaría de Salud Pública. Santiago. 2017.
3. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. 2017;11(8):215-25.
4. Wu H, Ballantyne CM. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(1):43-54.
5. Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;98:56-67.
6. Augusto V, Padovani CR, Eduardo G, Campos R. Skeletal Muscle Fiber Types in C57bl6j Mice. *Braz. J. morphol. Sci*. 2004. 21(2), 89-94.
7. Kelley DE, Goodpaster BH. Skeletal Muscle Triglyceride. *Diabetes Care*. 2001;24(5):933.
8. Shortreed KE, Krause MP, Huang JH, Dhanani D, Moradi J, Ceddia RB, et al. Muscle-Specific Adaptations, Impaired Oxidative Capacity and Maintenance of Contractile Function Characterize Diet-Induced Obese Mouse Skeletal Muscle. Lucia A, editor. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7293.
9. Thomas MM, Trajcevski KE, Coleman SK, Jiang M, Di Michele J, O'Neill HM, et al. Early oxidative shifts in mouse skeletal muscle morphology with high-fat diet consumption do not lead to functional improvements. *Physiol Rep*. 2014;2(9).

10. Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kurebayashi N, Murayama T, Nakamura K, et al. Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2017;5(7):e13250.
11. Gumà A, Martínez-Redondo V, López-Soldado I, Cantó C, Zorzano A. Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(4):E742-750.
12. Buonanno A, Fischbach GD. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology.* 2001;11(3):287-96.
13. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5276-87.
14. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):54-65.
15. Caillaud K, Boisseau N, Ennequin G, Chavanelle V, Etienne M, Li X, et al. Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats. *Diabetes & Metabolism.* 2016;42(2):96-104.
16. Ennequin G, Boisseau N, Caillaud K, Chavanelle V, Gerbaix M, Metz L, et al. Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats. *J Physiol.* 2015;593(Pt 12):2665-77.
17. Ma Y, Gao M, Liu D. Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer. *Sci Rep.* 2016;6.

18. Haskins JW, Zhang S, Means RE, Kelleher JK, Cline GW, Canfrán-Duque A, et al. Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake. *Sci Signal*. 2015;8(401):ra111.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
20. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:1-17.
21. Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(17):7692-7.
22. M. Dietrich, M.S. Malik, M. Skeie, V. Bertelsen, E. Stang, Protein kinase C regulates ErbB3 turnover, *Experimental Cell Research*. 2019.
23. Lo H-W, Hung M-C. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*. 2006;94(2):184-8.
24. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003;15(2):143-8.
25. Wang S-C, Hung M-C. Nuclear Translocation of the Epidermal Growth Factor Receptor Family Membrane Tyrosine Kinase Receptors. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(21):6484-9.

Anexo 1: Certificado de aprobación del Comité de Bioética sobre Investigación en Animales.



Santiago, 4 de junio de 2019

Certificado Nº: **19273-MED-UCH**

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **CBA 1065 FMUCH**, del Proyecto de Investigación titulado: **"Inflammasoma NLRP3 en el músculo esquelético: Un nuevo vínculo entre la acumulación de colesterol y el transporte defectuoso de glucosa mediado por insulina en la resistencia a la insulina"**, de la investigadora Responsable **Dra. Paola Llanos**, Profesora Asistente, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.


La investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **800** ratones *Mus musculus* de la cepa **CS7BL/6**, provenientes de Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde junio de 2019 a abril de 2023, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto **Fondecyt Regular Nro. 1190406**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectaría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicas veterinarias, 39 académicas (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del **"Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales"** después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.


Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl