

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

Escuela de Tecnología Médica.

TESIS PROFESIONAL



Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico

“Estudio de los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en músculos esqueléticos tibial anterior y gastrocnemio de ratones alimentados con dieta alta en grasa y sometidos a ejercicio crónico”

Alumna: Daniela Vásquez
Director de Tesis: Nevenka Juretić
Co-tutor: Gonzalo Jorquera

Firma tutor

Firma Co-tutor

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

Escuela de Tecnología Médica.

TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico***

“Estudio de los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en músculos esqueléticos tibial anterior y gastrocnemio de ratones alimentados con dieta alta en grasa y sometidos a ejercicio crónico”

Alumna: Daniela Vásquez
Director de Tesis: Nevenka Juretić
Co-tutor: Gonzalo Jorquera

Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Fecha: 06 de noviembre de 2020

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mi Nana (abuela), quien todos los años de la carrera me despertó temprano para tomar desayuno antes de ir a la universidad.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia y amigos por el apoyo y por animarme a continuar cuando me sentía frustrada y sin ganas de nada.

En primer lugar, le doy las gracias a la profesora Nevenka por recibirme en su laboratorio, por ser siempre amable conmigo, por su paciencia, por ayudarme y estar presente semana a semana para responder dudas y avanzar con este proyecto, sobre todo este año que fue muy distinto e inesperado para ambas.

También le doy las gracias al profesor Gonzalo por su ayuda y por guiarnos en todas las dudas que teníamos durante el proceso de esta tesis.

Gracias a ambos por darme la oportunidad de conocer cómo se trabaja en los laboratorios de investigación, por hacer que creciera más mi interés y entusiasmo en la ciencia y mis ganas de buscar caminos relacionados a ello para mi futuro.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento del Proyecto Puente-ICBM 2018/02 (Nevenka Juretić) y del Proyecto FONDECYT POSTDOC 3170194 (Gonzalo Jorquera).

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
Obesidad	8
Actividad física y beneficios para la salud	9
Neuregulinas y sus receptores (ErbBs)	9
Vía de Neuregulina y receptores ErbBs. Rol en obesidad	12
Ejercicio crónico: Efecto en la vía de Neuregulina y receptores ErbBs en músculo	14
HÍPOTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Modelo experimental	18
Extracción de RNA	20
Síntesis de cDNA a partir de RNA	21
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	36
ANEXO	43

RESUMEN

El aumento a nivel mundial de la obesidad se atribuye a una mayor ingesta de alimentos hipercalóricos y una disminución en el consumo de nutrientes saludables, junto con un estilo de vida sedentario y actividad física insuficiente. El ejercicio es parte fundamental del balance energético y puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. El músculo esquelético es uno de los principales órganos encargados del balance energético. Estudios previos vinculan las alteraciones metabólicas de la obesidad con desbalances en los niveles de neuregulina, mioquina que se une a los receptores ErbBs (2, 3 y 4). En el músculo esquelético, esta vía se ha relacionado con el metabolismo de la glucosa y se ha propuesto que posee una función análoga a la insulina, favoreciendo la translocación de los transportadores GLUT4 a la membrana. Por otra parte, se ha descrito que la obesidad inducida por una dieta alta en grasa (DAG) en ratones disminuye significativamente la expresión de los ErbBs en hígado, tejido adiposo y en algunos tipos de músculo esquelético. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que describan el efecto del ejercicio en la expresión de los receptores ErbBs en músculo esquelético de ratones alimentados con DAG.

Hipótesis: Los ratones alimentados con DAG sometidos a ejercicio crónico (DAGe) presentan mayores niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en los músculos esqueléticos gastrocnemio (G) y tibial anterior (TA), respecto a aquellos no sometidos a ejercicio (DAGne). **Objetivo general:** Estudiar los cambios en los niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en músculos esqueléticos G y TA de ratones alimentados con DAG, sometidos y no sometidos a ejercicio crónico. **Materiales y metodología:** A partir de muestras congeladas de los músculos G y TA de ratones alimentados con DAG por 10 semanas y ejercitados en una trotadora motorizada durante 6 semanas (grupo DAGe; n= 8), y de muestras de ratones alimentados con DAG que no se ejercitaron (grupo DAGne; n= 7), se determinaron los niveles de mRNA de los receptores ErbBs mediante qPCR. **Resultados:** En el

músculo G (mixto glicolítico) se observó una disminución significativa en los niveles de mRNA del receptor ErbB2 en los animales DAGe respecto al grupo DAGne. En tanto, en el músculo TA (rápido glicolítico) se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA del receptor ErbB3 de ratones DAGe comparado con los DAGne. Con respecto a ErbB4, no se observaron cambios en los niveles de mRNA en ninguno de los 2 músculos y condiciones analizadas. **Conclusiones:** Una rutina de ejercicio crónico en ratones alimentados con DAG disminuyó la expresión génica de ErbB2 en un músculo mixto glicolítico (G), mientras que aumentó la expresión génica de ErbB3 en un músculo rápido glicolítico (TA), lo que sugiere que dependiendo del tipo de fibra muscular, el ejercicio tiene un efecto diferencial en la expresión génica de los receptores ErbBs, lo que podría estar relacionado con la función de cada músculo y el rol protector del ejercicio frente a la obesidad.

INTRODUCCIÓN

1. Obesidad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (1), causada principalmente por un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético (2).

Según datos de la Organización Panamericana de Salud (OPS), en el año 2016 más de 650 millones de personas presentaron obesidad (1). En tanto en Chile, se informó que más del 60% de la población mayor de 18 años tenía algún grado de exceso de peso (sobrepeso u obesidad) (3).

El aumento mundial de la obesidad se atribuye a varios factores, tales como una mayor ingesta de alimentos hipercalóricos con abundante contenido de grasas totales y azúcares, y la disminución del contenido en vitaminas, minerales y nutrientes saludables. Otro factor importante que contribuye a la obesidad es la tendencia a la disminución de la actividad física debido a la naturaleza sedentaria de muchas actividades recreativas, el cambio en los medios de transporte y la creciente urbanización (2).

La obesidad tiene consecuencias para la salud a corto y largo plazo, que incluyen el desarrollo de enfermedades no transmisibles (ENT) como enfermedades cardiovasculares (cardiopatías y accidentes vasculares cerebrales), diabetes mellitus tipo 2, trastornos del aparato locomotor (como artrosis y atrofia muscular) y ciertos tipos de cáncer (carcinoma endometrial, mamario, hepático, renal, de colon y próstata, entre otros). Los niños con obesidad tienen mayor probabilidad de seguir siendo obesos en la edad adulta, y de padecer ENT a edades tempranas (4).

2. Actividad física y beneficios para la salud.

Según datos de la OPS, uno de cada cuatro adultos (aproximadamente 1400 millones de personas en el mundo) no realizan los 150 minutos de actividad física de moderada intensidad por semana, recomendados por la OMS, y más del 80% de la población adolescente no realiza la suficiente actividad física recomendada (5).

La actividad física regular y adecuada (incluido cualquier movimiento corporal que requiera energía), puede reducir el riesgo de muchas ENT como enfermedades cardiovasculares, la diabetes, cáncer de mama y de colon, y la depresión (4, 5). También se le asocian beneficios que incluyen la prevención de la atrofia muscular y patologías que afectan las articulaciones (5). La energía que se gasta mientras se está físicamente activo es una parte fundamental del balance energético y del control de peso (6). Por lo tanto, la actividad física actúa como factor protector frente a las ENT a corto y largo plazo, las cuales son provocadas por la obesidad y el sobrepeso (5).

3.- Neuregulinas y sus receptores (ErbBs)

Las Neuregulinas (NRGs) son proteínas pertenecientes a la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF), que están involucradas en la regulación del metabolismo energético y que son consideradas mioquinas, ya que se sintetizan y secretan principalmente en el músculo esquelético (6), pero también en hígado (7) y tejido adiposo (8, 14).

Se han descrito cuatro genes que codifican para NRG (1 al 4); estas variantes presentan más de 30 isoformas que resultan del splicing alternativo de los genes NRG. (9) Algunas de estas isoformas se muestran en la **Figura 1**.

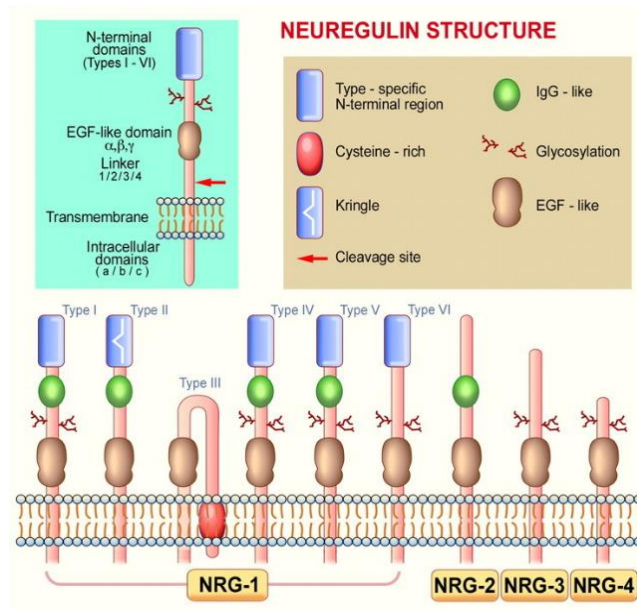


Figura 1. Esquema de la estructura de las distintas isoformas de NRGs (6).

La mayoría de las isoformas contienen un dominio de transmembrana. Además, en la región extracelular se encuentra un dominio de tipo EGF que es sensible a clivaje (6). La unión de NRG a receptores específicos denominados ErbBs, desencadena una serie de eventos de señalización río abajo, que genera efectos autocrinos, paracrinos o yuxtacrinos dependiendo del tipo de órgano (6).

Los receptores ErbBs son una familia de receptores compuesta por cuatro miembros: ErbB1 (conocido como HER1 o EGFR), ErbB2 (HER2 o NEU), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Estos se expresan en distintos tejidos y regulan distintos procesos como diferenciación y desarrollo celular, progresión del ciclo celular y apoptosis (6). Como se muestra en la **Figura 2**, las distintas isoformas de los receptores ErbBs presentan diferentes características estructurales:

- El receptor ErbB1 reconoce varios ligandos, pero no reconoce a NRG.
- El receptor ErbB2 no posee un sitio de unión a ligando, pero presenta un dominio tirosina quinasa que es catalíticamente activo, y es activado como resultado de la heterodimerización con otros receptores ErbBs.

- El receptor ErbB3 presenta un sitio de unión específico para NRG, pero no posee actividad tirosina quinasa, por lo que debe heterodimerizar con otros receptores ErbBs para poder activar la vía de señalización.
- El receptor ErbB4 presenta tanto un sitio de unión específico funcional para NRG, como la actividad tirosina quinasa, por lo que puede homo o heterodimerizar al ser activado por NRG (6).

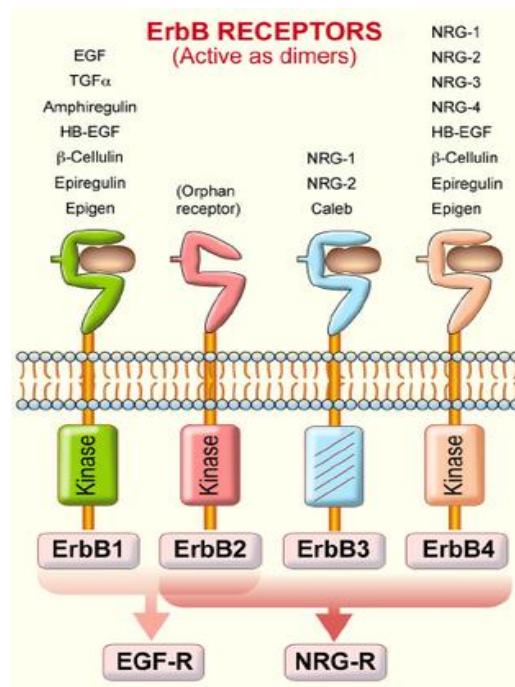


Figura 2. Representación esquemática de la familia de receptores ErbBs, los ligandos específicos para cada receptor y su actividad tirosina quinasa (6).

Se ha descrito que la activación del dominio tirosina quinasa conduce a la activación de un amplio rango de vías de señalización como fosfolipasa C- γ (PLC- γ), ERK 1/2, proteínas quinasas p38 (MAPK), fosfoinositol 3 quinasa (PI3-K) /proteína quinasa B (AKT), entre otras (6).

Dentro de la familia de las NRGs, la neuregulina-1 (NRG1) es la más estudiada en músculo esquelético. La mayoría de las isoformas de NRG1 contienen un dominio EGF que puede sufrir un corte proteolítico mediado por la enzima convertidora de factor de necrosis tumoral α (metaloproteasa ADAM17), lo cual permite que este dominio catalíticamente activo se una a los receptores ErbBs (6,10).

4.- Vía de Neuregulina y receptores ErbBs. Rol en obesidad.

Tejido adiposo

La neuregulina-4 (NRG4) es considerada una adipoquina, ya que esta isoforma se secreta principalmente en el tejido adiposo y participa en distintos procesos que regulan el metabolismo energético en tejido adiposo pardo y blanco (8). Además, se ha descrito que la activación de esta vía en adipocitos produce un aumento de los vasos sanguíneos en tejido adiposo blanco y genera una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina (21). Por otra parte, se ha demostrado que la sobreexpresión de NRG4 en tejido adiposo, disminuye significativamente la ganancia de peso en ratones alimentados con DAG en comparación a los ratones alimentados con dieta control (DC). Estos ratones también presentan una mejoría en la tolerancia a la glucosa y un aumento en la sensibilidad a la insulina, junto con una disminución significativa de esteatosis hepática y de la expresión de genes lipogénicos (8, 14). Estos resultados sugieren que la activación de la vía NRG4 en tejido adiposo tendría un rol protector frente a trastornos metabólicos en animales alimentados con DAG (8).

Por otro lado, se ha descrito que la activación de la vía NRG1/ homodímero ErbB4 presenta un rol perjudicial en células epiteliales de tejido mamario, ya que conduce a la activación de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), la cual actúa como factor transcripcional de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol tales como β -hidroxi- β -metil-glutaril-coenzima

A reductasa (HMGCOA), HMGCOA sintetasa 1 y de los receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDL) (20). La síntesis de estas enzimas provoca un aumento en la generación de colesterol intracelular, lo cual incluye la biosíntesis de *novo* de colesterol y una mayor tasa de unión de LDL a su receptor (20).

Hígado

El hígado es el órgano encargado de almacenar glucógeno y sintetizar glucosa, por lo que es uno de los principales órganos involucrados en la homeostasis de la glucosa, la cual depende principalmente del equilibrio entre su producción y consumo (7). Antecedentes indican que al estimular farmacológicamente la vía de señalización NRG1/ErbBs en hígado de ratones obesos y normopesos (31), se observa una supresión en la expresión de genes que codifican para enzimas gluconeogénicas y lipogénicas, y también una disminución de la producción de glucosa hepática, lo que resulta en un aumento en la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa (11, 31).

Músculo

Con respecto a los receptores ErbBs, estudios realizados recientemente en nuestro laboratorio señalan que existe una expresión diferencial de estos receptores en los distintos tipos de músculos, tanto en condiciones fisiológicas como de obesidad, lo que permitiría estudiar su implicancia en trastornos metabólicos relacionados con esta patología (16). En el músculo rápido flexor digital de los dedos (FDB), se ha observado una disminución de los niveles de mRNA para ErbB2 y ErbB3 en ratones obesos comparados con los normopeso, mientras que para el músculo rápido tibial anterior (TA), se ha descrito una disminución de los niveles de mRNA sólo para ErbB4 de ratones obesos comparado con los normopeso (16). En tanto, en el músculo mixto gastrocnemio (G), aunque no se observa una diferencia significativa, se ha descrito una tendencia de disminución de los niveles de mRNA de ErbB4 de ratones obesos comparados con los normopeso (16).

5.- Ejercicio crónico: Efecto en la vía de NRG y receptores ErbBs en músculo.

El músculo esquelético es uno de los órganos más importantes para la homeostasis de la glucosa postprandial, ya que es el responsable mayoritario de la captación, catabolismo y almacenamiento de glucosa, procesos estimulados por insulina después del consumo de alimentos (19).

La fibra muscular es la unidad funcional del músculo esquelético. Existen distintos tipos de fibras, las cuales se clasifican según sus propiedades mecánicas, bioquímicas y metabólicas. Las fibras tipo I son fibras de contracción lenta, alta resistencia a la fatiga, alta capacidad oxidativa, son ricas en mitocondrias y están en una mayor proporción en músculos de sostén y equilibrio postural como el músculo sóleo, el cual es considerado un músculo lento oxidativo. Por otro lado, existen las fibras tipo II, las cuales son de contracción rápida debido a su velocidad e intensidad al contraerse y se fatigan rápidamente. Las fibras tipo II se subclasifican en fibras IIA, las cuales presentan capacidad oxidativa y las IIB, en las que predomina el metabolismo glucolítico. Esta última se encuentra en mayor proporción en músculos encargados de ejercicios de potencia o deportes que implican movimientos rápidos, como el músculo TA, el cual es considerado un músculo rápido glucolítico (23), y el músculo G, que es considerado un músculo mixto glucolítico ya que presenta fibras de tipo I y IIB (24,25). Ambos músculos, TA y G, presentan mayores niveles proteicos y mayor actividad de enzimas glicolíticas (23,24), por lo que, al utilizar la glucosa como principal fuente energética, serían los primeros en responder a cambios en el metabolismo de la glucosa provocados por el ejercicio (26).

Se ha descrito que las NRGs están involucradas en la regulación del consumo y transporte de glucosa por parte del músculo esquelético cuando éste se contrae de manera aguda o al realizar ejercicio agudo (11, 17). La contracción muscular induce a un aumento en el consumo de glucosa por parte del músculo esquelético a través de la activación de la proteína AMP quinasa (AMPK), de la proteína

quinasa dependiente de calmodulina II (CAMKII) y de la vía de NRG/ErbBs, que inducen la translocación de los transportadores GLUT4 a la membrana plasmática del músculo de manera independiente a la acción de la insulina (6,11). La insulina por su parte activa la vía de señalización PI3-K y PKB/AKT (6).

Por otra parte, se ha descrito que la estimulación neuronal y la contracción muscular son los principales procesos que inducen la escisión proteolítica de NRG1 (6, 10). De hecho, se ha demostrado que al someter a ejercicio crónico a ratas obesas por DAG y sacarosa, se induce la activación de la vía NRG1/ErbB4, debido a la activación de ADAM17. Estos efectos se acentúan al combinar el ejercicio y el retorno a una dieta normal (12).

Estudios recientes de nuestro laboratorio señalan que la obesidad inducida por DAG por 12 semanas, disminuye la expresión de los receptores ErbBs en los músculos esqueléticos rápidos (16). Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que describan el efecto del ejercicio crónico en la expresión de estos receptores en músculo esquelético de ratones alimentados con DAG.

A partir de todo lo expuesto anteriormente, en esta tesis se estudió el efecto que tiene el ejercicio crónico sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en ratones alimentados con DAG, en un músculo rápido glucolítico (TA) y un músculo mixto glucolítico (G).

HIPÓTESIS

Los ratones alimentados con DAG sometidos a ejercicio crónico presentan mayores niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en los músculos esqueléticos G y TA, respecto aquellos no sometidos a ejercicio.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del ejercicio crónico sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en los músculos esqueléticos G y TA de ratones alimentados con DAG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del ejercicio crónico en el nivel de expresión relativa del mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en músculo esquelético G de ratones alimentados con DAG sometidos y no sometidos a ejercicio crónico, mediante qPCR.
2. Evaluar el efecto del ejercicio crónico en el nivel de expresión relativa del mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en músculo esquelético TA de ratones alimentados con DAG sometidos y no sometidos a ejercicio crónico, mediante qPCR.

Dada la contingencia en nuestro país, no se pudieron realizar todos los experimentos planteados originalmente en esta tesis, así que se decidió realizar un **estudio adicional (Anexo N°2)** acerca del efecto que tiene la duración de la DAG sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en los músculos TA y G.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Modelo experimental

Se utilizaron muestras guardadas a -80°C de músculos esqueléticos G y TA, de ratones macho de la cepa C57BL/6J, obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura constante entre $21-23^{\circ}\text{C}$ y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas con acceso libre a alimentación y agua. Los protocolos de manejo y cuidado de animales experimentales fueron aprobados por el comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Autorización Bioética: CBA #0929, FMUCH). El certificado de aprobación del Comité de ética se encuentra adjunto en el **Anexo N°1**.

Dieta

A los 21 días de nacidos (inmediatamente luego del destete), los animales (15 ratones) fueron alimentados con una DAG, la cual consiste en que, de las Kcal aportadas por el alimento, el 60% de éstas se obtuvieron de la grasa, el 20% se obtuvieron de las proteínas y el 20% se obtuvieron a partir de los carbohidratos (Research Diets INC D12492, USA). Esta alimentación se mantuvo por 10 semanas (**Figura 3**).

Entrenamiento

Se ha descrito que a la cuarta semana de DAG, el modelo murino presenta un alza de peso, y que a las 10 semanas con DAG, los animales presentan obesidad y resistencia a la insulina (27). Es por esta razón que los animales se sometieron a ejercicio desde la cuarta semana de DAG, para estudiar si el ejercicio muestra un efecto protector (ya sea preventivo o atenuante) frente a estas condiciones patológicas.

Durante la cuarta semana de DAG los animales se separaron aleatoriamente en dos grupos:

- a) 7-8 ratones con dieta alta en grasa sometidos a ejercicio (DAGe)
- b) 5-7 ratones con dieta alta en grasa sin sometimiento a ejercicio (DAGne), de acuerdo a lo que se indica en la **Figura 3**.

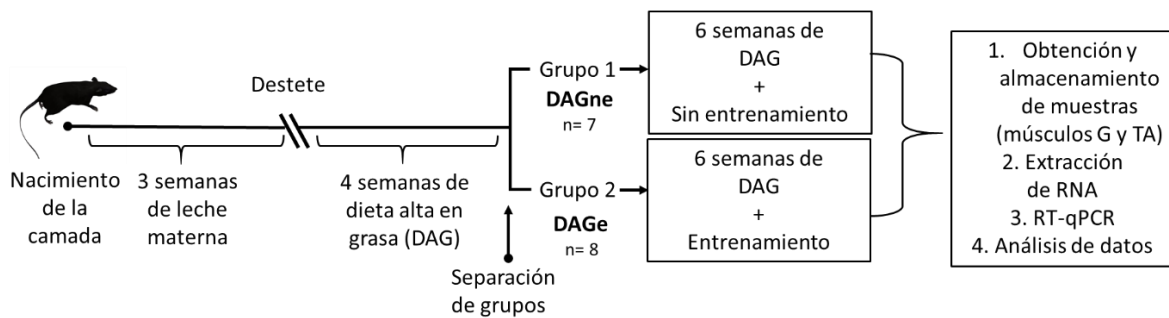


Figura 3. Esquema del diseño experimental. Los animales se alimentaron de leche materna hasta la tercera semana. Luego del destete, fueron alimentados con una DAG por 4 semanas. Al terminar la cuarta semana, la camada fue separada en dos grupos, DAGne y DAGe. Ambos grupos se mantuvieron por 6 semanas más con DAG, pero además el grupo DAGe se mantuvo con entrenamiento, no así el grupo DAGne. Finalmente, se extrajeron los músculos y se realizaron los experimentos de acuerdo a lo que se indica en el esquema.

De esta manera, tanto los ratones del grupo DAGne y DAGe se mantuvieron con DAG hasta la semana 10.

Los ratones ejercitados se sometieron a un proceso de aclimatación, el cual consiste en un trote en *treadmill* (trotadora motorizada) por 20 min durante 5 días consecutivos a 0,5 Km/h (velocidad equivalente al 50% del consumo máximo de oxígeno [VO₂ MAX] de esta cepa murina) (22). Esto se

realizó con el objetivo de que los animales conozcan y se habitúen al equipo y su entorno, y no se estresen. Además, para que aprendieran con anterioridad la tarea que deben realizar en las semanas de entrenamiento.

Después de la semana de aclimatación, se les realizó un test incremental para determinar la velocidad máxima que puede alcanzar cada ratón. El test incremental consiste en una prueba que se realiza en la trotadora y en la que se someten los ratones a un trote continuo a 0,3 Km/h (velocidad mínima posible) durante 1 min, para luego aumentar la velocidad en 0,1 Km/h cada 1 min. Al día siguiente de registrar la velocidad máxima de todos los animales, se comenzó con las 6 semanas de entrenamiento, lo que consiste en un trote continuo al 75% de la velocidad máxima, por 1 hora, 5 días a la semana.

El test incremental se realizó cada 1 o 2 semanas para reajustar la velocidad máxima a la que los animales trotan.

Al completar la semana 6 de entrenamiento los ratones fueron eutanasiados mediante dislocación cervical y posteriormente se obtuvieron las muestras de los músculos TA y G, las cuales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C (27).

2.- Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de muestras congeladas de los músculos G y TA se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Junto con el reactivo Trizol, las muestras musculares se homogenizaron utilizando el homogeneizador Fluko Superfine Homogenizer (Sumilab) durante 10 seg y luego fueron colocadas en hielo por 30 seg. El vástago del homogeneizador se lavó antes de cada homogeneización con agua libre de nucleasas, etanol al 70% y RNAsa away (Invitrogen) en ese mismo orden. El paso anterior se repitió hasta observar un fluido homogéneo.

Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min entre 4-8°C, se recuperó el sobrenadante y se midió su volumen, para luego ser completado con Trizol hasta 1mL y continuar con la extracción de RNA.

Las muestras se trataron con 0,2 mL de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 seg y se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego fueron centrifugadas a 12000 rpm por 15 min a 4°C. Se hizo precipitar el RNA presente en el sobrenadante agregando 0,5 mL de isopropanol y se dejó a temperatura ambiente por otros 10 min, nuevamente se centrifugaron a 12000 rpm por otros 15 min a 4°C. Finalmente el precipitado fue lavado con etanol 80% y se resuspendió en 20 µL de H₂O libre de nucleasas.

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

3.- Síntesis de cDNA a partir de RNA

Se utilizó el protocolo incluido en el kit para RT-PCR de la enzima SuperScript II (Invitrogen). Para ello, una mezcla compuesta por 1 µg de RNA total, 1 µL dNTP 10mM 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 de Buffer 5x First, 2 µL de DTT 0,1 M, 0,25 µL de RNAsin, 0,25 µL de transcriptasa reversa SuperScript 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 utilizó como control un tubo RT que contenía todos los reactivos excepto la enzima. El cDNA permaneció a -20°C hasta ser utilizado.

4.- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se analizó mediante qPCR los niveles de expresión de los receptores ErbB 2, 3 y 4 a partir del cDNA de las muestras obtenidas de los músculos TA y G (DAGne y DAGe). El análisis se realizó en duplicado para cada muestra. Como control se utilizó el gen constitutivo gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 1.- Secuencia de los partidores ErbB 2, 3 y 4 (28).

Partidor	Secuencia
ErbB2	Sentido 5'-GCTGCCCGAAACGTGCTA-3' Antisentido 5'-CCGTGCCAGCCCGAA-3'
ErbB3	Sentido 5'-AGGCTTGTCTGGATTCTGTGGTT-3' Antisentido 5'-GGGATCGGGTGCAGAGAGA-3'
ErbB4	Sentido 5'-GGAGGCTGCTCAGGACCAA -3' Antisentido 5'-ACGCAGGCTCCACTGTCAT-3'
GAPDH	Sentido 5'-TCCGCCCTCCGCTGATG-3' Antisentido 5'-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3'

El qPCR se realizó en un Termociclador *Stratagene Mx3000p QPCR System* (Agilent Technologies), utilizando el reactivo EvaGreen® (5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, Solis Biodyne) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se preparó una mezcla compuesta por 2 µL de partidores 5 µM (mezcla de partidor sentido y antisentido), 13 µL H₂O sin nucleasas y 4 µL del reactivo EvaGreen® 5X.

A cada tubo se le agregó 19 μL de esta mezcla y 1 μL del cDNA de la muestra correspondiente. Se incluyó como control un blanco, el cual contenía todos los reactivos, excepto el cDNA de alguna de las muestras.

Para la cuantificación del cDNA, ya sea 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 realizó a través del algoritmo Delta-Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

5.- Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedios \pm error estándar (SEM). La significancia estadística entre los grupos experimentales se calculó utilizando el programa *Graphpad Prism 6.01* mediante el test *t-Student* para datos no pareados. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$, y un “n” de 5 a 9 por cada experimento.

RESULTADOS

1. Estudio de los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en los músculos esqueléticos G y TA de ratones obesos sometidos a ejercicio crónico.

Mediante qPCR se determinaron los niveles relativos de mRNA de los receptores ErbBs en músculos G y TA, aislados desde ratones DAGne y DAGe.

Los resultados obtenidos indican que los niveles de mRNA para el receptor ErbB2 disminuyeron significativamente en el músculo G de ratones DAGe ($0,54 \pm 0,09$ veces) en comparación al grupo DAGne ($1 \pm 0,19$). Por otro lado, en el músculo TA, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA para ErbB2 entre los grupos DAGne y DAGe (**Figura 4A**).

Para el caso del receptor ErbB3, se observó un aumento significativo de los niveles de mRNA en el músculo TA de ratones DAGe ($2,37 \pm 0,62$ veces) en comparación al grupo alimentado con DAGne ($1 \pm 0,11$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA en el músculo G para el mismo receptor (**Figura 4B**).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA para el receptor ErbB4 en ninguno de los músculos estudiados (**Figura 4C**).

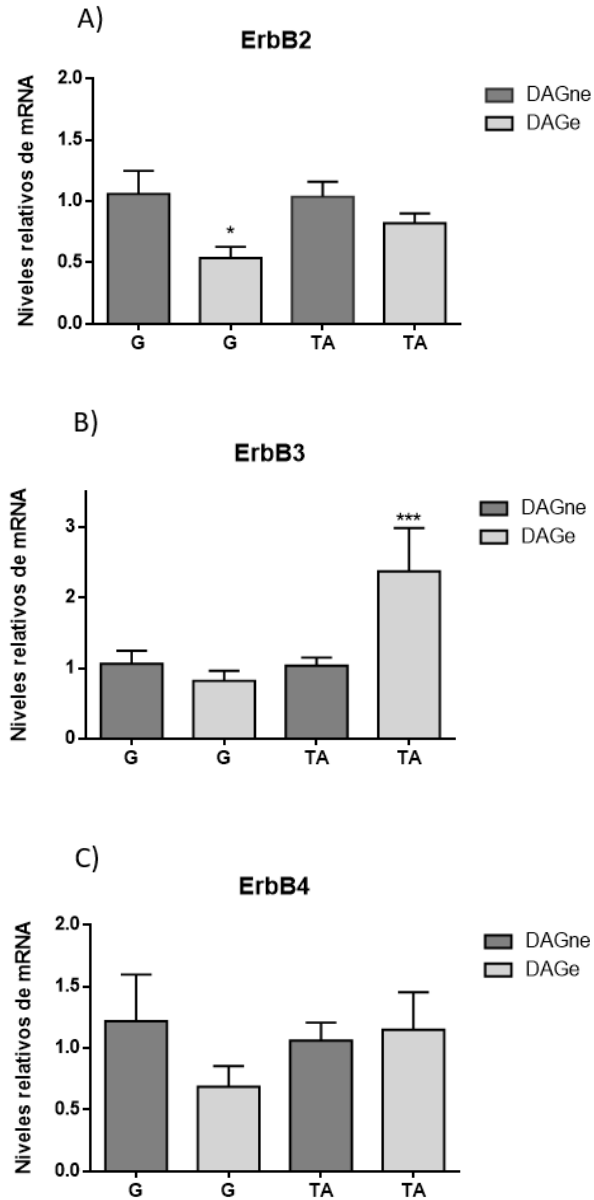


Figura 4: Niveles relativos de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en músculos de ratones DAGne y DAGe.

Los resultados se presentan como el promedio grupal \pm error estándar (SEM). Normalización realizada con respecto a los niveles de mRNA de GAPDH. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$, se determinaron aplicando *Unpaired t-test* utilizando el programa *GraphPad Prism v.6.01*. **A)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB2. DAGne: G (n=5), TA (n=7); DAGe: G (n=7); TA (n=7). **B)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB3. DAGne: G (n=5), TA (n=7); DAGe: G (n=7); TA (n=8). **C)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB4. DAGne: G (n=5), TA (n=7); DAGe: G (n=7); TA (n=8).

DISCUSION

El consumo crónico y excesivo de alimentos altos en grasas y la baja actividad física incrementa el riesgo de padecer obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades cardiovasculares, entre otras (29, 30).

Varios autores han descrito el rol de la vía NRG/ErbBs sobre distintos órganos que regulan el metabolismo, entre ellos se encuentran el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético (6, 7,8).

Bajo condiciones normales, el músculo esquelético es el principal responsable de la captación de glucosa estimulada por insulina en estado de hiperglicemia. Es un órgano que se caracteriza por adaptarse metabólicamente en condiciones no patológicas, ya que puede cambiar la oxidación de lípidos y absorción de ácidos grasos en condiciones de ayuno, a un aumento en la captación y almacenamiento de glucosa en condiciones estimuladas por insulina (19), por lo tanto, una desregulación en el metabolismo del músculo esquelético puede influir fuertemente en la homeostasis de la glucosa y en la aparición de la resistencia a la insulina (33).

Antecedentes en la literatura indican que las NRGs están involucradas en la regulación del consumo y transporte de glucosa por parte del músculo esquelético (6, 11, 34). Se ha descrito que el ejercicio crónico (contracción muscular) podría estimular la actividad de ADAM17 (metaloproteasa que hace un corte proteolítico a NRG1), promoviendo el clivaje de NRG1 y su unión a ErbB4 (12). ErbB4 por su parte, está involucrado en la regulación del transporte de glucosa en músculo esquelético mediante la activación de la traslocación de los transportadores GLUT4 a la membrana plasmática (6,11,12). Por otro lado, se ha demostrado que al tratar crónicamente miocitos L6E9 y C2C12 con una isoforma de NRG1 (Hrg), aumenta la capacidad oxidativa mitocondrial de los miocitos y el contenido celular de los transportadores GLUT4, sin verse afectado el consumo de glucosa basal de estas células (34). Todo lo mencionado sugiere que la vía NRG/ErbBs estimulada por la contracción

muscular, actuaría como un modulador clave de la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio señalan que el músculo TA presenta una disminución significativa de los niveles de mRNA del receptor ErbB4 en el grupo de ratones alimentados con DAG respecto al grupo alimentado con DC (16). Dado que la vía de NRG/ErbB4 se ha relacionado con el consumo y transporte de glucosa (6,11,34), estos resultados sugieren que al existir una resistencia a la insulina por parte del músculo, una menor cantidad de glucosa es captada y transportada por los GLUT4. Además, al existir una baja actividad física y sumando la condición de obesidad de los ratones, esta vía estaría menos activa en relación a las condiciones normales, lo que podría explicar de alguna manera esa disminución en la expresión de los receptores en este tipo de músculo.

Antecedentes han demostrado que el ejercicio ayuda a mejorar la sensibilidad a la insulina tanto en condiciones de obesidad/resistencia a la insulina, como en condiciones no patológicas; la contracción muscular aumenta la captación y consumo de glucosa por una mayor activación en la traslocación de los transportadores GLUT4 (12). También se ha descrito que la contracción muscular aumenta la biogénesis mitocondrial, lo que mejora la capacidad oxidativa del músculo y permite que aumente la oxidación de ácidos grasos que se encuentran acumulados en el músculo esquelético (35). Estudios también indican que el ejercicio presenta un efecto más beneficioso frente a la resistencia a la insulina cuando se cambia la dieta, desde una DAG hacia una dieta balanceada (35,38). Por lo cual, también será necesario realizar estudios posteriores acerca del rol que cumple la vía NRG/ErbBs mediante la contracción muscular o ejercicio frente a situaciones no patológicas y observar los cambios en la expresión de los receptores ErbBs en músculos esqueléticos de ratones cuando son alimentados con una dieta balanceada.

Debido a que en estudios previos de nuestro laboratorio (16) se observó una disminución en los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en músculo esqueléticos rápidos (FDB, TA) de ratones alimentados con DAG, se esperaba que, al someter a ejercicio crónico a estos ratones, los niveles de mRNA de los receptores ErbB se vieran aumentados.

Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que en el músculo G (mixto glicolítico) se observó una disminución significativa de los niveles de mRNA de ErbB2 en los animales DAGe respecto al grupo DAGne (**Figura 4A**). En tanto, en el músculo TA (rápido glicolítico) se observó un aumento significativo de los niveles de mRNA de ErbB3 en el grupo DAGe en comparación al grupo DAGne. (**Figura 4B**). Con respecto a ErbB4, no se observaron cambios en los niveles de mRNA en ninguno de los 2 músculos y condiciones analizadas (**Figura 4C**).

El músculo TA es considerado un músculo glicolítico rápido y debido a que presenta una mayor proporción de fibras de tipo IIB (las cuales son ricas en enzimas glicolíticas), debería ser el músculo que presente mayor sensibilidad frente a un cambio en el consumo de glucosa por parte del músculo (por ejemplo, mediante contracción muscular o en estado de hiperglicemia/resistencia a la insulina), ya que de esta forma aumentaría la actividad de vías glicolíticas en este tipo de músculo (23,26). Por otro lado, el músculo G es considerado un músculo glicolítico mixto, ya que presenta fibras musculares tipo I, las cuales poseen alta capacidad oxidativa y una mayor cantidad de mitocondrias, y también presenta fibras tipo IIB, las cuales, como ya se mencionó, poseen características glicolíticas y también se esperaba una respuesta frente a cambios en el metabolismo de la glucosa (23, 24, 25, 26).

Ratones obesos sometidos a DAG, en condiciones de prediabetes y con una tolerancia a la glucosa alterada, exhiben una disminución en la cantidad de mitocondrias, y un menor potencial de membrana y producción de ATP en musculo esquelético. Además, se ha descrito que los miocitos

en el músculo esquelético de estos ratones no se diferencian, lo que aumentaría la atrofia muscular y ayudaría a potenciar la resistencia a la insulina (37). Por otra parte, estos ratones presentan una degeneración muscular caracterizada por un cambio en el tipo de fibra muscular, de una predominancia de fibras oxidativas tipo I a fibras glicolíticas tipo II (35,36,37), lo cual demuestra la capacidad adaptativa del músculo, ya que también cambia el tipo de combustible metabólico que consume para la obtención de ATP (de ácidos grasos a uno que predomine la glucosa) (35,36, 38). Esto indica también que los músculos esqueléticos con fibras de tipo I y IIA (músculos G y sóleo), serían los más afectados frente a estas condiciones, ya que cambiaría o disminuiría la función que tienen de soporte y resistencia a la fatigabilidad (36).

Todo lo anterior, podría explicar los cambios en la composición y metabolismo del músculo G provocados por la resistencia a la insulina periférica inducida por DAG.

Por otro lado, al estimular la contracción en el músculo TA, el aumento significativo en los receptores ErbB3 podría explicarse por un aumento en el metabolismo de la glucosa debido a la contracción muscular por el ejercicio crónico, lo cual concuerda con descripciones de estudios previos en donde la expresión del receptor ErbB3 se ve aumentada durante la contracción muscular (40). En el caso del receptor ErbB4 no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de ningún músculo al someter a ejercicio ratones alimentados con DAG en comparación al grupo no entrenado (**Figura 4C**). Esto sugiere que para observar cambios significativos en los niveles de expresión génica de este receptor en ambos músculos quizás es necesario un entrenamiento más prolongado, un cambio de dieta o cambiar el tipo de entrenamiento al que se someten los ratones.

Si bien se ha descrito un aumento en la actividad de la vía NRG/ErbB2 durante la contracción muscular (39), no hay antecedentes que relacionen o expliquen la expresión diferencial de cada receptor entre una condición y otra con los distintos fenotipos o fibras musculares.

Dado que se ha descrito que el ejercicio crónico mejora el manejo de la glicemia en ratones alimentados con DAG (27), y en base a nuestros resultados que muestran que el ejercicio afecta la expresión de los receptores ErbBs en el músculo esquelético de ratones alimentados con DAG de forma diferencial, podríamos sugerir que dependiendo del tipo de músculo, el ejercicio podría tener un rol protector frente a los efectos o condiciones provocadas por la DAG (como la resistencia a la insulina), por ejemplo, mediante la activación de la vía NRG/ErbBs. Será necesario realizar más experimentos orientados en este sentido para comprobar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado, se puede concluir que:

Una rutina de ejercicio crónico en ratones alimentados con DAG por 10 semanas

- Disminuyó la expresión génica de ErbB2 en un músculo mixto glicolítico (G).
- Aumentó la expresión génica de ErbB3 en un músculo rápido glicolítico (TA).

Esto sugiere que, dependiendo del tipo de fibra muscular, el ejercicio tiene un efecto diferencial en la expresión génica de los receptores ErbBs, lo que podría estar relacionado con la función de cada músculo y el rol protector del ejercicio frente a la obesidad.

En base a lo anterior, será necesario realizar estudios posteriores sobre la posible expresión diferencial de los receptores ErbBs en los tipos de fibras musculares, ya que esto podría ayudar a dilucidar o explicar los cambios en la expresión de estos receptores en las condiciones estudiadas (DAG y DAG + ejercicio).

También estudios de los efectos que tiene una dieta balanceada o una dieta control en conjunto con una rutina de entrenamiento, sobre la expresión de los receptores ErbBs, para poder comprender y comparar los efectos de las distintas condiciones (dietas control, DAG y ejercicio) sobre el músculo esquelético y, así sugerir la activación de la vía NRG/ErbBs como un posible tratamiento no farmacológico de la resistencia a la insulina periférica mediante el ejercicio.

BIBLIOGRAFIA

1. OMS | Obesidad [Internet]. Consultado Viernes 30 de octubre de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/topics/obesity/es/>
2. OMS | Estrategia mundial sobre el régimen alimentario, actividad física y salud. [Internet]. Consultado Viernes 30 de octubre de 2020. Disponible en: https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_why/es/
3. Organización Panamericana de la Salud | Obesidad en Chile. Consultado Viernes 30 de octubre de 2020. Disponible en: https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=179:obesidad&Itemid=1005
4. OMS | Consecuencias de los modos de vida poco saludables durante la infancia. [Internet]. Consultado Viernes 30 de octubre de 2020. Disponible en: https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_consequences/es/
5. OMS | Actividad Física [Internet]. Consultado Viernes 30 de octubre de 2020. Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>
6. Gumà, A., Martínez-Redondo, V., López-Soldado, I., Cantó, C., & Zorzano, A. (2010). Emerging role of neuregulin as a modulator of muscle metabolism. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 298(4), E742–E750. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00541.2009>
7. Li, M., Chen, Y., Jiang, J., Lu, Y., Song, Z., Zhang, S., Sun, C., Ying, H., Fan, X., Song, Y., Yang, J., & Zhao, L. (2019). Elevated serum neuregulin 4 levels in patients with hyperthyroidism. Endocrine connections, 8(6), 728–735. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0175>

8. Chen, Z., Wang, G. X., Ma, S. L., Jung, D. Y., Ha, H., Altamimi, T., Zhao, X. Y., Guo, L., Zhang, P., Hu, C. R., Cheng, J. X., Lopaschuk, G. D., Kim, J. K., & Lin, J. D. (2017). Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Molecular metabolism*, 6(8), 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.016>

9. Seroogy K., Dickerson J. 2006 “Neuregulins” *Handbook of Biologically Active Peptides*. Chapter 223: 1633-1638.

10. Buonanno, A., & Fischbach, G. D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 11(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00210-5](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00210-5)

11. Cantó, C., Chibalin, A. V., Barnes, B. R., Glund, S., Suárez, E., Ryder, J. W., Palacín, M., Zierath, J. R., Zorzano, A., & Gumà, A. (2006). Neuregulins mediate calcium-induced glucose transport during muscle contraction. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), 21690–21697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600475200>

12. Ennequin, G., Boisseau, N., Caillaud, K., Chavanelle, V., Gerbaix, M., Metz, L., Etienne, M., Walrand, S., Masgrau, A., Guillet, C., Courteix, D., Niu, A., Li, Y. P., Capel, F., & Sirvent, P. (2015). Exercise training and return to a well-balanced diet activate the neuregulin 1/ErbB pathway in skeletal muscle of obese rats. *The Journal of physiology*, 593(12), 2665–2677. <https://doi.org/10.1113/JP270026>

13. Caillaud, K., Boisseau, N., Ennequin, G., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., Denis, P., Dardevet, D., Lacampagne, A., & Sirvent, P. (2016). Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats. *Diabetes & metabolism*, 42(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2015.08.003>

14. Wang, G. X., Zhao, X. Y., Meng, Z. X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., Cozacov, Z., Zhou, D., Okunade, A. L., Su, X., Li, S., Blüher, M., & Lin, J. D. (2014). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nature medicine*, 20(12), 1436–1443. <https://doi.org/10.1038/nm.3713>

15. Escobedo Zamora K. “Expresión de los receptores ErbBs en hígado y tejido adiposo de ratones normopesos y obesos” [Tesis profesional para optar a título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico]. Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina. Universidad de Chile; 2019.

16. Ramirez Qüinlan X. “Estudio de la expresión de los receptores ErbBs en músculos rápidos y lentos en ratones normopesos y obesos” [Tesis profesional para optar a título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico y Medicina Transfusional]. Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina. Universidad de Chile; 2019.

17. Suárez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacin, M., Zorzano, A., & Gumá, A. (2001). A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(21), 18257–18264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008100200>

18. Dai, Y. N., Zhu, J. Z., Fang, Z. Y., Zhao, D. J., Wan, X. Y., Zhu, H. T., Yu, C. H., & Li, Y. M. (2015). A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(12), 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.08.013>

19. Kelley, D. E., & Goodpaster, B. H. (2001). Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes care*, 24(5), 933–941.
<https://doi.org/10.2337/diacare.24.5.933>
20. Haskins, J. W., Zhang, S., Means, R. E., Kelleher, J. K., Cline, G. W., Canfrán-Duque, A., Suárez, Y., & Stern, D. F. (2015). Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake. *Science signaling*, 8(401), ra111.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aac5124>
21. Nugroho, D. B., Ikeda, K., Kajimoto, K., Hirata, K. I., & Emoto, N. (2018). Activation of neuregulin-4 in adipocytes improves metabolic health by enhancing adipose tissue angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 504(2), 427–433.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.08.197>
22. Fernando, P., Bonen, A., & Hoffman-Goetz, L. (1993). Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 71(10-11), 854–857. <https://doi.org/10.1139/y93-128>
23. Qaisar, R., Bhaskaran, S., & Van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free radical biology & medicine*, 98, 56–67.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>
24. Gardetto, P. R., Schluter, J. M., & Fitts, R. H. (1989). Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 66(6), 2739–2749. <https://doi.org/10.1152/jappl.1989.66.6.2739>
25. Widrick, J. J., Romatowski, J. G., Norenberg, K. M., Knuth, S. T., Bain, J. L., Riley, D. A., Trappe, S. W., Trappe, T. A., Costill, D. L., & Fitts, R. H. (2001). Functional properties of slow and fast

gastrocnemius muscle fibers after a 17-day spaceflight. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 90(6), 2203–2211. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.6.2203>

26. Nader, G. A., & Esser, K. A. (2001). Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 90(5), 1936–1942. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.5.1936>

27. Uribe Opazo E. “Efecto anti inflamatorio del ejercicio crónico en el músculo esquelético de ratones alimentados con dieta alta en grasa” [Tesis profesional para optar al Grado de Licenciado en Biología]. Carrera de Biología, Facultad de Ciencias de la Vida. Universidad Andrés Bello; 2019.

28. Oh, Y. S., Shin, S., Lee, Y. J., Kim, E. H., & Jun, H. S. (2011). Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PloS one*, 6(8), e23894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023894>

29. Williams, L. M., Campbell, F. M., Drew, J. E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W. D., Kamolrat, T., Thi Ngo, H., Steffensen, I. L., Gray, S. R., & Tups, A. (2014). The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PloS one*, 9(8), e106159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106159>

30. Haley, M. J., Krishnan, S., Burrows, D., de Hoog, L., Thakrar, J., Schiessl, I., Allan, S. M., & Lawrence, C. B. (2019). “Acute high-fat feeding leads to disruptions in glucose homeostasis and worsens stroke outcome”. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(6), 1026–1037. <https://doi.org/10.1177/0271678X17744718>

31. Zhang, P., Kuang, H., He, Y., Idiga, S. O., Li, S., Chen, Z., Yang, Z., Cai, X., Zhang, K., Potthoff, M. J., Xu, Y., & Lin, J. D. (2018). NRG1-Fc improves metabolic health via dual hepatic and central action. *JCI insight*, 3(5), e98522. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98522>
32. Ma, Y., Gao, M. & Liu, D. Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer. *Sci Rep* 6, 26242 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep26242>
33. Wu, H., & Ballantyne, C. M. (2017). Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 127(1), 43–54. <https://doi.org/10.1172/JCI88880>
34. Cantó, C., Pich, S., Paz, J. C., Sanches, R., Martínez, V., Orpinell, M., Palacín, M., Zorzano, A., & Gumà, A. (2007). Neuregulins increase mitochondrial oxidative capacity and insulin sensitivity in skeletal muscle cells. *Diabetes*, 56(9), 2185–2193. <https://doi.org/10.2337/db06-1726>
35. Goodpaster, B. H., He, J., Watkins, S., & Kelley, D. E. (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(12), 5755–5761. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8075>
36. Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annual review of biochemistry*, 75, 19–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142622>
37. Xu, D., Jiang, Z., Sun, Z., Wang, L., Zhao, G., Hassan, H. M., Fan, S., Zhou, W., Han, S., Zhang, L., & Wang, T. (2019). Mitochondrial dysfunction and inhibition of myoblast differentiation in mice with high-fat-diet-induced pre-diabetes. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 7510–7523. <https://doi.org/10.1002/jcp.27512>

38. Pattanakuhar, S., Sutham, W., Sripetchwandee, J., Minta, W., Mantor, D., Palee, S., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. (2019). Combined exercise and calorie restriction therapies restore contractile and mitochondrial functions in skeletal muscle of obese-insulin resistant rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 62, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.11.031>

39. Lebrasseur, N. K., Coté, G. M., Miller, T. A., Fielding, R. A., & Sawyer, D. B. (2003). Regulation of neuregulin/ErbB signaling by contractile activity in skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 284(5), C1149–C1155. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00487.2002>

40. LeBrasseur, N. K., Mizer, K. C., Parkington, J. D., Sawyer, D. B., & Fielding, R. A. (2005). The expression of neuregulin and erbB receptors in human skeletal muscle: effects of progressive resistance training. *European journal of applied physiology*, 94(4), 371–375. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-1333-4>

Anexo N°1: Certificado de aprobación del Comité de Bioética sobre investigación en animales.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE BIOÉTICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado “La pérdida de la interacción entre el DHPR y el canal de panexina en el sarcolema del músculo esquelético de ratones obesos contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina”, cuyo Investigador Responsable es el Dr. Gonzalo Jorquera Olave y su Patrocinante es el Dr. Enrique Jaimovich, del Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, Programa Disciplinario de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA 0929 FMUCH).

Ambos investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 522 ratones machos de la especie *Mus musculus*, cepa C57BL6, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por 36 meses, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado con fondos FONDECYT POSTDOCTORADO PROYECTO 3170194.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 19 de mayo de 2017.

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales
Facultad de Medicina - Universidad de Chile
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile
Fono: 2 978 6923, Email: cba@med.uchile.cl

Anexo N°2.

Estudio adicional

Efecto de la duración de la DAG sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en los músculos TA y G.

OBJETIVO

Estudiar y comparar el efecto de la duración de la DAG (10 semanas vs 12 semanas) sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 de los músculos esqueléticos G y TA.

Para estudiar el efecto de la duración de la DAG en la expresión génica de los receptores ErbBs, se utilizaron los datos de los resultados de qPCR de los niveles de mRNA de ErbB 2, 3 y 4 de los músculos G y TA de ratones alimentados con DAG por 12 semanas (16). Estos animales (n=5-9 ratones) fueron alimentados con DAG a partir del día 21 de vida (destete) por 12 semanas. Al terminar la semana 12 de DAG los ratones fueron anestesiados y eutanasiados. Para los procesos de obtención de los músculos, la extracción de RNA, síntesis de cDNA y qPCR, se siguieron los mismos protocolos que los experimentos realizados en esta tesis (16).

Se realizó una comparación entre los niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 de ratones que fueron alimentados con DAG por 10 semanas (resultados obtenidos en esta tesis), y los niveles de mRNA de los receptores ErbBs de ratones que fueron alimentados con DAG por 12 semanas (resultados obtenidos en tesis de TM Ximena Ramírez) (18). Se estudiaron y compararon los resultados en los músculos G y TA.

RESULTADOS

En la **Figura 5A** se puede observar que existe un aumento significativo en los niveles de mRNA para el receptor ErbB2 en el músculo G cuando los ratones fueron alimentados con DAG por 12 semanas

($1,54 \pm 0,12$; n=9), respecto al grupo que fue alimentado con DAG por 10 semanas ($1,06 \pm 0,19$; n=5).

Los niveles de mRNA para el receptor ErbB2 en el músculo TA no presentaron diferencias significativas.

Respecto al receptor ErbB3, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratones alimentados con DAG por 10 semanas y 12 semanas, en ninguno de los dos músculos (**Figura 5B**).

Finalmente, se observó que los niveles de mRNA del receptor ErbB4 en el músculo G de ratones alimentados con DAG por 12 semanas disminuyeron significativamente ($0,37 \pm 0,1$; n=8) respecto al grupo que fue alimentado con DAG por 10 semanas ($1,22 \pm 0,38$; n=7). De la misma manera, los niveles de mRNA del mismo receptor en el músculo TA también disminuyeron significativamente al alimentar los ratones con DAG por 12 semanas ($0,39 \pm 0,11$; n=5), en comparación al grupo que fue alimentado por 10 semanas ($1,06 \pm 0,15$; n=7) (**Figura 5C**).

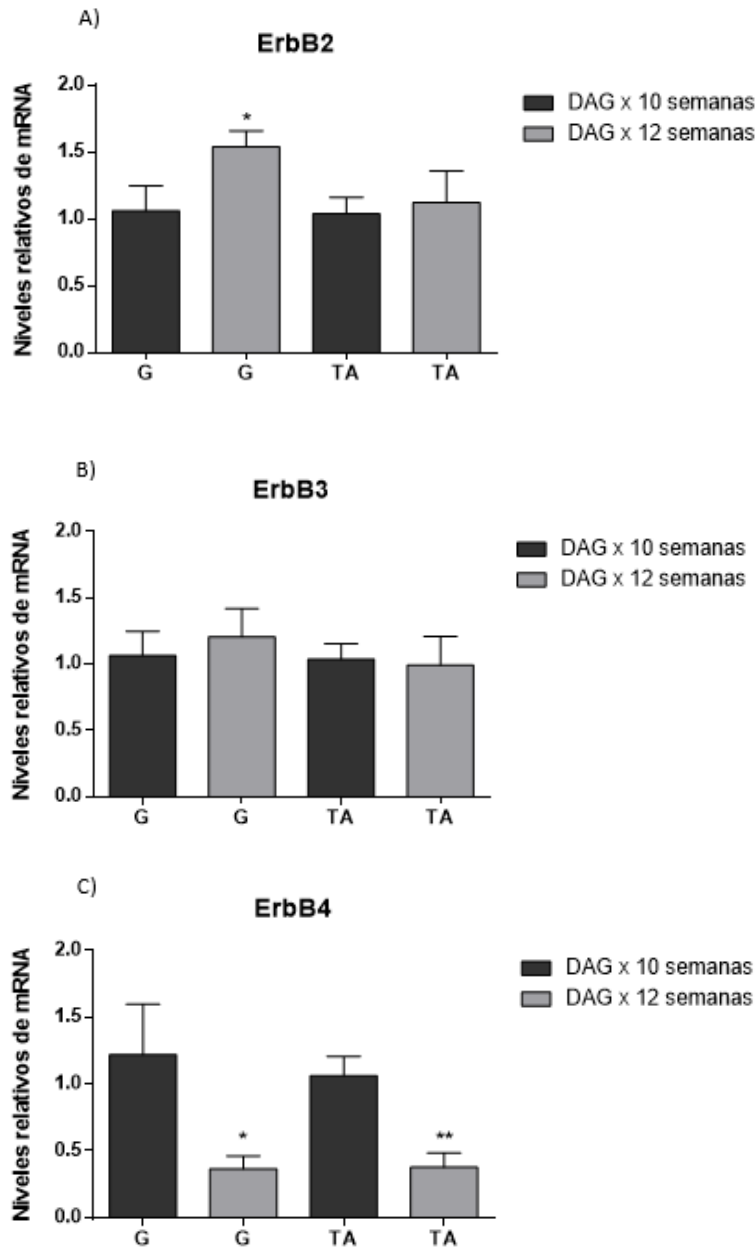


Figura 5: Efecto de la duración de la DAG sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbB 2, 3 y 4 en músculos de ratones obesos. Los resultados se presentan como el promedio grupal \pm error estándar (SEM). Normalización realizada con respecto a los niveles de mRNA de GAPDH. $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ se determinaron aplicando *Unpaired t-test* utilizando el programa *GraphPad Prism v.6.01*. **A)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB2. 10 semanas: G (n=5), TA (n=7); 12 semanas: G (n=9), TA (n=7). **B)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB3. 10 semanas: G (n=5), TA (n=7); 12 semanas: G (n=9); TA (n=7). **C)** Nivel de expresión de mRNA del receptor ErbB4. 10 semanas: G (n=5), TA (n=7); 12 semanas: G (n=8), TA (n=5).

DISCUSION

Una alimentación con DAG prolongada tiene consecuencias como la aparición de resistencia a la insulina y DM2, cambios en el metabolismo y fenotipo del músculo esquelético y su capacidad contráctil (36,37), por lo cual, es relevante estudiar la magnitud de los efectos de la duración de la DAG sobre la funcionalidad del músculo esquelético y sobre la vía NRG/ErbBs.

En base a estos antecedentes, se comparó el efecto que tiene la duración de la DAG (10 semanas vs 12 semanas) sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbBs en los músculos G y TA (**Anexo N°2**). Los resultados obtenidos en el músculo G muestran que los niveles de mRNA para el receptor ErbB2 aumentaron significativamente cuando los ratones fueron alimentados con DAG por 12 semanas respecto al grupo alimentado con DAG por 10 semanas (**Anexo N°2, Figura 5A**). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA del receptor ErbB3 en los ratones que fueron alimentados con DAG por 12 semanas respecto al grupo alimentado por 10 semanas en ninguno de los músculos estudiados (**Anexo N°2, Figura 5B**). Finalmente, se observó que los niveles de mRNA del receptor ErbB4 disminuyeron significativamente, en ambos músculos G y TA, de ratones que fueron alimentados con DAG por 12 semanas respecto al grupo alimentado por 10 semanas (**Anexo N°2, Figura 5C**). Estos resultados sugieren que la duración de la DAG tiene efectos diferenciales sobre la expresión génica de los receptores ErbB2 y ErbB4 de los músculos G y TA respectivamente, lo cual puede estar relacionado con la composición de cada músculo.

En base a estos resultados, se esperaría que, al utilizar el mismo modelo experimental utilizado en esta tesis (**Figura 3**) sobre el grupo DAGne de 12 semanas; con entrenamiento desde la semana 5 hasta la semana 12, el efecto que tendría el ejercicio sobre los niveles de mRNA de los receptores ErbB sea más pronunciado que cuando se mantuvo la DAG por 10 semanas, con entrenamiento las 6 últimas semanas. Esto también se podría observar en la diferencia que existe entre los niveles de mRNA del receptor ErbB4 en el músculo G y en el músculo TA, entre DAGne x 10 semanas vs DAGne

x12 semanas (**Anexo N°2, Figura 5C**), ya que dos semanas más de DAG nos indicó una disminución significativa en éstos, por lo que el ejercicio podría reestablecer o tener un rol importante por lo menos sobre el receptor ErbB4 en ambos músculos; G y TA.

CONCLUSIONES

Respecto a este análisis se puede concluir que:

Dos semanas más de alimentación con DAG en ratones

- Aumentó significativamente los niveles de mRNA del receptor ErbB2 en el músculo G
- Disminuyó significativamente los niveles del receptor ErbB4 en ambos músculos, en comparación al grupo de ratones que fue alimentado con DAG por menos tiempo.

La duración de la DAG tiene efectos diferentes sobre los niveles de expresión génica de los receptores ErbBs en los músculos G y TA, lo cual, en conjunto con los resultados obtenidos en esta tesis, sugiere que una rutina de ejercicio en conjunto con la DAG por un tiempo más prolongado tendría un rol importante sobre los niveles de estos receptores (ErbB2 y ErbB4) y el restablecimiento de las funciones musculares fisiológicas.