

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Escuela de Tecnología Médica



## **TESIS PROFESIONAL**

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

*“Estudio de la respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas ( $UPR^{mt}$ ) en  
el músculo esquelético de ratones alimentados con dieta alta en grasa”*

**Alumna: Pía Francisca Victoria Apablaza Muñoz**

**Tutora: PhD. Nevenka Juretić Díaz**

**Cotutora: PhD. Andrea del Campo Sfeir**

**15 de marzo 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA



## TESIS PROFESIONAL

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

*“Estudio de la respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas ( $UPR^{mt}$ ) en el músculo esquelético de ratones alimentados con dieta alta en grasa”*

**Alumna: Pía Francisca Victoria Apablaza Muñoz**

**Tutora: PhD. Nevenka Juretić Díaz**

**Cotutora: PhD. Andrea del Campo Sfeir**

Firma manuscrita de la tutora en tinta azul, con una línea horizontal debajo.

**Firma tutora**

Firma manuscrita de la alumna en tinta azul, con una línea horizontal debajo.

**Firma alumna**

Firma manuscrita de la cotutora en tinta azul, con una línea horizontal debajo.

**Firma cotutora**

**15 de marzo 2022**

## *Dedicatoria*

*A mi mamá y papá*

*A mis abuelos*

*A mis hermanos*

*A mis mascotas Titán, Moro y Roma*

*A una persona especial en mi vida: Abderrahmane*

*“La muerte no es más que un viaje, semejante al que realizan dos amigos al separarse para atravesar los mares. Como aún se necesitan, ellos siguen viviendo el uno en el otro y se aman en una realidad omnipresente... aunque se diga que han muerto, su amistad y su compañía no desaparecen, porque éstas son inmortales”*

*(Harry Potter y las reliquias de la muerte)*

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue llevada a cabo gracias al financiamiento de los proyectos SOCHED 2021-06 y FONDECYT N°11190756. Y, gracias al uso de las instalaciones de los laboratorios del Programa de Biología celular y Molecular (Sector D) de la Universidad de Chile (Facultad de Medicina) y el Laboratorio de Fisiología y Bioenergética Celular de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Facultad de Química y de Farmacia).

Quiero expresar mi enorme gratitud y agradecimientos a mis tutoras Nevenka Juretić y Andrea del Campo, quienes me apoyaron y orientaron durante todo el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer a Fernanda, María José, Andrea, Camila, Katherine, Valeria, José y Alexander, del Laboratorio de Fisiología y Bioenergética Celular de la PUC quienes me enseñaron, me ayudaron y me acogieron con cariño durante el mes de enero.

Quisiera expresar mis agradecimientos a mi familia: a mis padres, abuelos, hermanos, quienes siempre me han apoyado, animado y aconsejado en este largo y difícil proceso, además de estar siempre junto a mí en mis momentos más oscuros y difíciles, y ser las luces que me hacen sonreír.

# Índice

<i>Dedicatoria</i> .....	3
Agradecimientos .....	4
Resumen .....	9
Introducción .....	10
Obesidad.....	10
Obesidad y tejido adiposo .....	11
Músculo esquelético.....	11
Músculo esquelético y obesidad.....	13
Mitocondria.....	14
Obesidad, músculo esquelético y mitocondria .....	15
Respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR <sup>mt</sup> ).....	16
Obesidad y UPR <sup>mt</sup> .....	19
Hipótesis y objetivos .....	21
Materiales y métodos .....	22
Aprobación ética .....	22
Preparación de animales.....	22
Evaluación de la fuerza y capacidad aeróbica en ratones.....	23
Fuerza de agarre .....	23
Velocidad máxima en treadmill (trotadora) .....	23
Obtención de músculos .....	23
Extracción de ARN mensajero.....	24
Síntesis de DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa (RT).....	24
PCR en tiempo real (qPCR) .....	25
Western blot .....	27
Análisis estadístico.....	28
Esquema .....	29
Resultados .....	30
Caracterización de los ratones con dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG) al finalizar el experimento.....	30
Evaluación de la fuerza y capacidad aeróbica mediante la determinación de la fuerza de agarre y velocidad máxima en treadmill .....	32

Expresión de genes de la UPR <sup>mt</sup> en distintos tipos de músculos en ratones DAG y DC mediante RT-qPCR.....	34
Cuantificación de los niveles de proteínas de la UPR <sup>mt</sup> en distintos tipos de músculos en ratones DAG y DC mediante Western blot .....	37
Discusión.....	41
Conclusiones .....	46
Bibliografía .....	47

## Abreviaturas

UPR <sup>m</sup>	Respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización mundial de la salud
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
IMC	Índice de masa corporal
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EROs	Especies reactivas de oxígeno
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1-beta
IL-6	Interleuquina-6
OXPPOS	Fosforilación oxidativa
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
PGC-1 $\alpha$	Proteína 1 $\alpha$ activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
ATF5	Factor de transcripción activador-5
ATF4	Factor de transcripción activador-4
MLS	Señal de localización mitocondrial
NLS	Señal de localización nuclear
JNK	Vía de quinasas c-Jun N-terminal
MURE	Elemento de respuesta a proteínas mal-plegadas mitocondrial
CHOP	Proteína homóloga de proteína de unión a potenciador de CCAAT
CEBP $\beta$	Proteína beta de unión a potenciador CCAAT
Hsp60	Proteína de choque térmico 60 kDA
Hsp10	Proteína de choque térmico 10 kDA
Hsp90	Proteína de choque térmico 90 kDA
mHsp70	Proteína de choque térmico mitocondrial 70 kDA
Lonp1	Proteasa mitocondrial Lon
ClpP	Peptidasa P caseinolítica
SIRT	Vía NAD <sup>+</sup> /sirtuina

<b>FTO</b>	<b>Proteína asociada a la masa grasa y obesidad</b>
------------	---



## Resumen

La obesidad, es definida como la “acumulación anormal y excesiva de grasa” de acuerdo con la organización mundial para la salud (OMS). El músculo esquelético es el órgano encargado de generar la fuerza y el movimiento, su unidad funcional son las fibras musculares y existen dos tipos: las lentas que corresponden a las fibras tipo I, caracterizadas por tener una alta cantidad de mitocondrias. Ejemplo de un músculo con predominio de fibras tipo I es el músculo sóleo; y, las rápidas que corresponden a fibras tipo II, que poseen baja cantidad de mitocondrias. Ejemplo de un músculo con predominio de fibras tipo II es el músculo gastrocnemio. Se ha descrito que la obesidad induce la pérdida de la función muscular debido a una disfunción mitocondrial. Dentro de los mecanismos de respuesta frente al daño mitocondrial se encuentra la respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>), que es una vía de señalización mitocondrial y se ha descrito que la activación de ésta sería un factor protector en una condición de obesidad. En mamíferos, la vía canónica de la UPR<sup>mt</sup> es la mejor descrita hasta ahora, en donde participan los factores de transcripción ATF4, ATF5 y CEBP $\beta$ , las proteasas efectoras Lonp1 y ClpP, y la chaperonina Hsp60. **Hipótesis:** Los ratones obesos presentan una disminución de la UPR<sup>mt</sup>, en forma diferencial en músculos rápidos y lentos. **Objetivo general:** Evaluar la expresión de genes y niveles de proteínas relacionados con la UPR<sup>mt</sup> en músculos rápidos y lentos. **Método:** Ratones machos C57BL/6J con peso inicial de 12-14 gramos fueron divididos en dos grupos (n=7-8). Uno correspondió a ratones alimentados con dieta control (DC; 10% lípidos, 20% proteínas, 70% carbohidratos) y el otro, a ratones alimentados con dieta alta en grasa (DAG; 60% lípidos, 20% proteínas, 20% carbohidratos) por 12 semanas. Además, se midió la fuerza y capacidad aeróbica de los ratones. Posteriormente, los músculos sóleo, cuádriceps y gastrocnemio fueron diseccionados y se evaluó la expresión génica relativa de los genes *ATF4*, *ATF5*, *CEBP $\beta$* , *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60* mediante RT-qPCR y la cuantificación de los niveles de proteínas de ATF5, Hsp60 y ClpP mediante Western blot en músculo cuádriceps y gastrocnemio. Los resultados se analizaron mediante t-student para datos no pareados ( $p \leq 0,05$ ). **Resultados:** Los ratones obesos presentaron una disminución de la fuerza y capacidad aeróbica con respecto a los ratones normopeso. Los niveles relativos de ARNm de *ATF5*, *ATF4*, *CEBP $\beta$* , *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60* disminuyeron significativamente en los músculos sóleo y cuádriceps (músculo oxidativo y mixto, respectivamente) de ratones obesos. Mientras que los niveles relativos de ARNm de *ClpP* aumentaron significativamente en el músculo gastrocnemio (músculo glucolítico) de ratones obesos, mientras en otros genes no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, en los niveles de proteínas no se determinaron diferencias significativas tanto en músculo cuádriceps como en gastrocnemio. **Conclusión:** Los ratones obesos presentan una disminución de la fuerza y capacidad aeróbica, además se sugiere que hay una expresión génica diferencial de la UPR<sup>mt</sup> dependiendo del tipo de músculo frente a la exposición a una dieta alta en grasa.

# Introducción

## Obesidad

La obesidad es considerada actualmente una pandemia de acuerdo a las definiciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según esta entidad la obesidad se define como una “acumulación anormal y excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”, siendo un desequilibrio entre las calorías ingeridas y las calorías gastadas (1). Para su medición se utiliza el método del índice de masa corporal (IMC), que indica la relación entre el peso y la talla, y se calcula dividiendo el peso en kilogramos por la talla expresada en metros y elevada al cuadrado. En adultos, un IMC igual o superior a  $25 \text{ kg/m}^2$  es indicio de sobrepeso y un IMC igual o mayor  $30 \text{ kg/m}^2$  es indicio de obesidad (1). De acuerdo con las últimas cifras de la OMS, que datan del año 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 años o más presentaron sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos (1). Este incremento de la obesidad a nivel mundial se atribuye al aumento en la ingesta de alimentos con un alto contenido calórico, además por el descenso de la actividad física debido al creciente sedentarismo en el estilo de vida actual del hombre (1). En el caso de Chile, de acuerdo con las cifras del año 2019 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), 1 de cada 3 adultos son obesos, y el 44,5% de los niños chilenos presentan sobrepeso u obesidad (2). En el actual contexto de pandemia, una encuesta publicada en enero del 2021 por la empresa Ipsos Group S.A (3), el 51% de los chilenos declara haber subido de peso durante la cuarentena, liderando como el segundo país con el porcentaje más alto en este tema, después de Brasil (52%) a nivel mundial. Además, un 33% de los consultados manifiesta haber reducido su actividad física, superando el promedio mundial de 23%, en contraste, sólo el 26% de los consultados declara haber aumentado su actividad física. Estas cifras son alarmantes debido a que la obesidad aumenta el gasto sanitario al ser un factor predisponente a múltiples enfermedades no transmisibles como enfermedades cardiovasculares (ECV), trastornos del aparato locomotor, cáncer y diabetes tipo 2 (DM2) (1). Además, en la actual pandemia se ha descrito que la obesidad concede un mayor riesgo de infección por el virus SARS-CoV-2, de hospitalización y de mayor gravedad por COVID-19 con respecto a individuos normopeso (4).

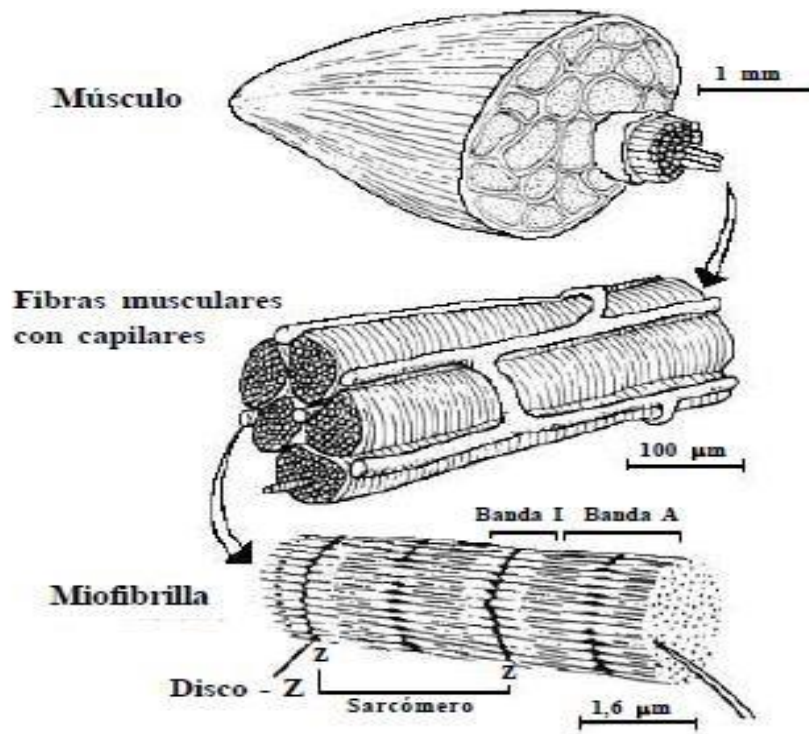
## **Obesidad y tejido adiposo**

El tejido adiposo es el principal órgano de almacenamiento de energía en forma de grasa, se encuentra constituido por un estroma y por adipocitos, además de otras células tales como preadipocitos, pericitos, fibroblastos, mastocitos y leucocitos (5). Entre sus principales funciones se encuentran: el mantenimiento del balance energético; termorregulación; modulación de la función hormonal y reproductiva; regulación de la presión arterial y coagulación, entre otras (6). Los adipocitos, son los encargados de transformar el exceso de energía en forma de triglicéridos en sus cuerpos lipídicos y así liberarlos en una situación de demanda energética (7). Se ha descrito que en obesidad, ocurre tanto un desbalance estructural como funcional en el tejido adiposo, dada por la lipoinflamación y por la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos (6,7). En este contexto, la sobresaturación de triglicéridos en el adipocito conduce a un aumento de la lipólisis en el tejido. Es así que, en tales condiciones, los ácidos grasos que no pueden seguir depositando en el tejido adiposo, lo hacen ectópicamente en otros órganos, tales como el músculo, hígado, corazón, páncreas; produciendo de esta manera lipotoxicidad y acumulación de especies reactivas de oxígenos (EROs) (8).

## **Músculo esquelético**

El músculo esquelético es el órgano más grande del cuerpo y es el encargado de generar la fuerza y el movimiento, debido a sus propiedades de excitabilidad, contractibilidad, elasticidad, etc. Está compuesto por fibras musculares, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Su unidad funcional son las fibras musculares, las cuales resultan de la unión de varias células no diferenciadas con un núcleo único denominado mioblasto (**Figura 1**). Estas células son las responsables de generar la fuerza mecánica y la contracción muscular (9). Se ha establecido que existen dos tipos de fibras musculares, las lentas que corresponden a las fibras tipo I y las rápidas que corresponden a fibras musculares tipo II.

Estas fibras se pueden diferenciar no tan sólo por la rapidez de contracción, sino que también a través del color, características metabólicas, resistencia a la fatiga, composición enzimática e isoforma de la cadena pesada de miosina (10). Cabe mencionar que todos los músculos del organismo están conformados por ambos tipos de fibras, con un predominio de fibras lentas o rápidas (11).



**Figura 1:** *Esquema de la composición de un músculo.* Se muestran los paquetes de fibras musculares envueltos en tejido conectivo, las miofibrillas dentro de las fibras y la estructura de los sarcómeros (10).

Las fibras tipo I de contracción lenta se caracterizan por estar presentes en alto número en los músculos rojos, estas son de diámetro pequeño y vascularizadas, se encuentran inervadas por fibras nerviosas más pequeñas, contienen una gran cantidad de mioglobina, mitocondrias y poco glucógeno. Debido a lo anterior, las fibras tipo I se caracterizan por ser resistentes a la fatiga, siendo utilizadas principalmente en ejercicios de bajo requerimiento energético y de larga duración (12, 13). Un ejemplo de músculo con predominio de fibras tipo I, es el músculo sóleo (10). Las fibras tipo II de contracción rápida o también denominadas fibras blancas por su bajo contenido de mioglobina, son de un mayor diámetro que las fibras tipo I, presentan un bajo número de mitocondrias, son poco vascularizadas, pero contienen un alto contenido de glucógeno y por ende una gran cantidad de enzimas glucolíticas. Debido a estas características, las fibras tipo II son poco resistentes a la fatiga, aunque presentan mayor fuerza que las fibras tipo I. Las fibras tipo II se pueden a su vez subclasificar en fibras IIa, IIX y IIb. Las fibras IIa tienen características oxidativas, es decir el metabolismo provoca una acumulación de EROs. Un ejemplo

de músculo que contiene fibras tipo IIa es el músculo flexor digital de los dedos (FDB) y el cuádriceps (C). En tanto, las fibras IIb y IIX se caracterizan por tener un predominio del metabolismo glucolítico. Los músculos que contienen este tipo de fibras son, por ejemplo, el músculo gastrocnemio (G), tibial anterior (TA) y extensor largo de los dedos (EDL) (12).

## **Músculo esquelético y obesidad**

La obesidad tiene un impacto negativo sobre la función del músculo esquelético. La insulinoresistencia, que es una condición prevalente en los individuos obesos, está relacionada con la infiltración de tejido adiposo en el músculo esquelético y/o con la aparición de tejido adiposo intramuscular. A nivel fisiológico, estas características están asociadas con una disminución de la potencia y fuerza muscular (14). Asimismo, se ha descrito en modelos de ratones obesos alimentados con una dieta alta en grasa, dos fases en el desarrollo de la obesidad. La primera fase, que es la inicial, se caracteriza por un aumento progresivo del peso corporal y masa muscular. Mientras que la segunda fase, conocida como fase crónica, se caracteriza por una estabilización del peso y por una pérdida de la masa muscular (14). Esto sugiere que la obesidad, en la etapa inicial induce mecanismos anabólicos en el músculo esquelético, debido al aumento del peso corporal y por la exposición a mayores cargas mecánicas, en conjunto con la hiperinsulinemia (14). Sin embargo, al perpetuarse esta condición en el tiempo, las sobrecargas lipídicas parecen ser perjudiciales para el músculo esquelético.

A nivel molecular, diferentes estudios (15, 16) sugieren que una dieta alta en grasas impide la hipertrofia muscular, lo que ocasiona una pérdida de la fuerza muscular; disminuye la capacidad de captar y oxidar glucosa; aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias tales como el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleuquina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e Interleuquina-6 (IL-6); e incrementa la oxidación de ácidos grasos y producción de EROs, debido a una disfunción mitocondrial (17).

Estudios han propuesto que la susceptibilidad del tejido muscular por EROs depende del tipo de fibra muscular, dado por el contenido mitocondrial, la capacidad de generación de EROs y porque la capacidad antioxidante varía significativamente entre los músculos esqueléticos oxidativos y glucolíticos (15). En

este contexto, se ha descrito que, en una condición de obesidad, el músculo esquelético aumenta la hiperplasia de fibras musculares glucolíticas tipo II o se induce una hipertrofia de éstas, para mantener su capacidad funcional y a su vez se presenta una disminución de las fibras tipo I (18, 19, 20).

## **Mitocondria**

La mitocondria es un organelo subcelular constituido por una doble membrana, es decir, por una membrana externa e interna que rodean dos subcompartimentos los cuales son el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (21). La mitocondria cumple una variedad de funciones metabólicas dentro de la célula, tales como, el almacenamiento del calcio, inmunidad innata y síntesis de cofactores, entre otras (22). Además, la mitocondria participa en un gran número de vías de señalización intracelulares como las vías apoptóticas (22). Una de las funciones metabólicas más conocidas es la síntesis de ATP a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Sin embargo, la mitocondria también participa en el ciclo de la urea, la  $\beta$ -oxidación y en la síntesis de lípidos (23). Es por ello, que es esencial controlar estrictamente la función y calidad de las mitocondrias para así garantizar el suministro de componentes metabólicos primordiales para la célula y, a su vez, prevenir la acumulación de agentes dañinos derivados del metabolismo de éstas, como las EROs, las cuales inducen daño mediante alteraciones moleculares en proteínas, DNA y lípidos. Estas alteraciones generan una disfunción mitocondrial que, al ser sostenida en el tiempo, puede inducir la transcripción de genes proapoptóticos que conllevan a la apoptosis de la célula (23).

Dentro de los mecanismos de respuesta frente al daño mitocondrial se encuentran la *biogénesis mitocondrial*, caracterizado por el aumento de la masa mitocondrial. la *dinámica mitocondrial*, relacionada con los procesos de fisión, fusión y motilidad del organelo, cuya función es mantener la cantidad, calidad y morfología mitocondrial, es decir, el tamaño, forma y distribución mitocondrial; la *mitofagia*, relacionada con la autofagia de mitocondrias dañadas (24); y la *respuesta mitocondrial a las proteínas mal-plegadas (UPR<sup>m</sup>)* relacionada con la proteostasis en la matriz mitocondrial.

## **Obesidad, músculo esquelético y mitocondria**

Se ha evidenciado que en el músculo esquelético de sujetos obesos existe una menor masa mitocondrial, cambios morfológicos y una función deteriorada de la mitocondria, ya que la sobrecarga lipídica en el músculo conlleva a una disfunción mitocondrial, debido principalmente a la sobreproducción de EROs, y lipotoxicidad (14), esto se observa en las mitocondrias musculares a través de una beta oxidación reducida, que conlleva a la acumulación de diacilglicerol (DAG) y ceramidas, los cuales son causantes de lipotoxicidad y están involucrados en el desarrollo de la insulinoresistencia (25). Por otra parte, hay una reducción de enzimas oxidantes y de OXPHOS en la mitocondria (25).

Entre los mecanismos de respuesta molecular de la mitocondria frente al estrés oxidativo y lipotoxicidad en el músculo esquelético por una dieta obesogénica, se ha descrito el aumento de la biogénesis mitocondrial, lo que involucra un mayor número de mitocondrias dado por la inducción de Proteína 1 $\alpha$  activadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ), lo cual incrementa la sensibilidad a insulina y la oxidación de ácidos grasos (14, 26, 27). Por otra parte, se ha descrito que los cambios morfológicos en la mitocondria estarían directamente relacionados con alteraciones en la dinámica mitocondrial en donde se presenta un aumento de la fisión de las mitocondrias y una reducción de la fusión de éstas, lo cual estaría vinculado con la insulinoresistencia (28). Sin embargo, estudios de humanos obesos han propuesto que el ejercicio invierte esta relación, es decir, favorece la fusión mitocondrial y disminuye las proteínas implicadas con el proceso de fisión, de tal forma que causa una mejoría en el metabolismo mitocondrial, aumentando por ejemplo la beta oxidación (21,28,29). Por otra parte, debido a la acumulación de EROs, se alterarían vías de señalización relacionadas con la mitofagia aumentando de esta forma la autofagia mitocondrial y se ha propuesto que esto conduciría a la sarcopenia y la atrofia muscular (21).

Diversos estudios han descrito que la adaptación mitocondrial es dependiente del tipo de fibra muscular en una condición de obesidad (16,26). Sin embargo, dada a la disminución de OXPHOS, se ha propuesto que los músculos oxidativos son los más afectados en comparación con los músculos glucolíticos, ya que dependen principalmente de la producción de ATP por las mitocondrias (14). De esta forma, las

alteraciones mitocondriales que ocurren en obesidad podrían contribuir a la reducción de las capacidades contráctiles y metabólicas en el músculo. Sin embargo, cabe aclarar que aún no están del todo dilucidados los mecanismos subyacentes a la disfunción mitocondrial en una condición obesogénica.

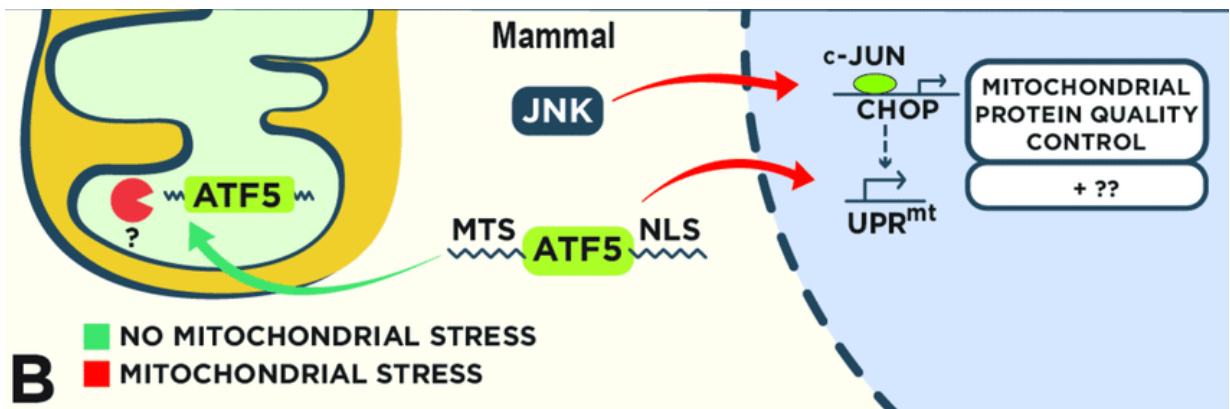
### **Respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>)**

La respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>) se define como una vía de señalización mitocondrial activada frente a las agresiones ambientales que provocan alteraciones en el plegado de las proteínas y/o acumulación de proteínas plegadas defectuosamente en la matriz mitocondrial (23). Se ha descrito que esta vía participa en diversas condiciones patológicas tales como el cáncer, síndromes metabólicos y trastornos neurodegenerativos (30). Dentro de las condiciones a nivel molecular que aumentan la proteotoxicidad en la mitocondria y que por ende activan la UPR<sup>mt</sup> está la producción de EROs, daños en el DNA mitocondrial o la expresión descoordinada de proteínas mitocondriales codificadas por el DNA mitocondrial y el genoma nuclear (31). Esta vía fue inicialmente descrita en *C.elegans* dada por la facilidad de realizar estudios genéticos en este organismo (32).

Con respecto a la UPR<sup>mt</sup> en mamíferos, la vía de señalización mejor descrita es la vía canónica (33) (**Figura 2**). Los factores de transcripción que inducen esta vía de señalización son el factor de transcripción activador-5 (ATF-5); la proteína homóloga de proteína de unión a potenciador de CCAAT (CHOP); y el factor de transcripción activador-4 (ATF-4). El factor de transcripción más importante en la vía canónica es ATF-5. Éste contiene dos secuencias en sus extremos, la señal de localización mitocondrial (MLS), que lo transporta hacia la mitocondria en condiciones fisiológicas para su posterior degradación. Y, la señal de localización nuclear (NLS), que lo transporta hacia el núcleo en condiciones de estrés, induciendo de este modo la expresión de genes relacionados con la UPR<sup>mt</sup> (33). Por otra parte, a través de la vía de quinasas c-Jun N-terminal (JNK) se activa el factor de transcripción c-jun, el cual a su vez induce la expresión del factor de transcripción CHOP y la proteína beta de unión a potenciador CCAAT (CEBP $\beta$ ), que se unen a elementos de la UPR<sup>mt</sup> en tándem MURE1 y -MURE2 (del inglés *Mitochondrial unfolded protein response element* (MURE)). Estos elementos a su vez se unen a



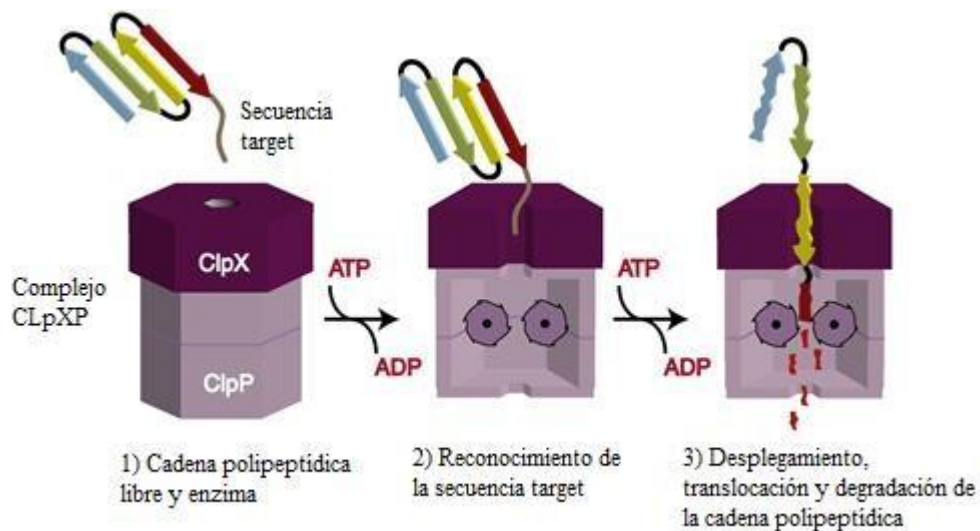
promotores de genes de chaperonas y proteasas, estimulando del mismo modo que ATF-5, la expresión de genes relacionados con la UPR<sup>mt</sup>. En cualquiera de los mecanismos de activación de la UPR<sup>mt</sup> mencionados anteriormente, el objetivo es aumentar la capacidad de plegamiento de proteínas, disminuir la carga de plegado (es decir, disminuir la traducción de proteínas) y la remoción de proteínas malplegadas, a través del aumento de la expresión de chaperoninas, chaperonas y proteasas con el fin de restaurar la homeostasis proteica dentro de la mitocondria e incrementar la posibilidad de supervivencia de este organelo frente al estrés (33).



**Figura 2:** UPR<sup>mt</sup> en mamíferos. Las líneas rojas indican las vías señaladoras activadas frente al estrés mitocondrial y en verde las vías señaladoras activadas en condiciones fisiológicas, adaptado de (23).

Las chaperonas, son las encargadas del correcto importe y plegamiento de las proteínas que ingresan a la mitocondria a través del complejo de translocasas TOM/TIM ubicados en la membrana externa e interna respectivamente. Entre las proteínas chaperonas mitocondriales más importantes se encuentran la proteína Hsp60 del inglés *Heat shock protein 60 kDa*; la proteína Hsp90 (*Heat shock protein 90 kDa*); la proteína Hsp10 (*Heat shock protein 10 kDa*) y mtHsp70 (*Mitochondrial heat shock protein 70 kDa*) (34). En el caso de mtHsp70 está es una proteína localizada en la matriz mitocondrial y tiene por función tanto el transporte de proteínas desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial como del plegamiento de proteínas (35).

Por otra parte, la activación de la UPR<sup>mt</sup> induce la expresión de proteasas tales como la proteasa mitocondrial Lon (Lonp1); y el complejo CLpXP, el cual está constituido por oligómeros compuestos por subunidades de la peptidasa P caseinolítica (ClpP) y por 6 subunidades idénticas de la chaperona hexamérica AAA+ ClpX, formando un poro central en donde se reconocen secuencias peptídicas. Tanto Lonp1 como el complejo CLpXP son las principales proteasas de la matriz mitocondrial y están encargadas de la degradación de proteínas mal-plegadas, tóxicas o dañadas (35). La proteasa Lonp1 actúa a nivel de la matriz mitocondrial, degradando proteínas oxidadas principalmente frente a un estrés agudo (36) e interactúa directamente con las chaperonas Hsp60 y mtHsp70 (37). Mientras que el hexámero ClpXP, a través de un mecanismo dependiente de ATP, en su poro axial reconoce secuencias de reconocimiento de cadenas polipeptídicas mal-plegadas, para luego ser translocadas y degradadas en el compartimiento proteolítico constituido por ClpP (38), obteniendo de esta forma aminoácidos que pueden ser reciclados. Todo esto es ilustrado en la **Figura 3**.



**Figura 3: Modelo de reconocimiento y degradación de proteínas mal-plegadas por el complejo ClpXP.**

De izquierda a derecha: Reconocimiento de la cadena polipeptídica mal-plegada por el hexámero ClpX y posterior degradación por ClpP en el compartimiento proteolítico, modificado de (38).

## Obesidad y UPR<sup>mt</sup>

Debido a la importancia de las mitocondrias en el metabolismo energético y por la evidencia del daño mitocondrial generado por mecanismos moleculares subyacentes en la obesidad y del rol de los mecanismos de respuesta mitocondrial frente a esta condición, recientemente los investigadores han examinado la relación entre la obesidad y la UPR<sup>mt</sup>, en estos estudios se sugiere que la activación de la UPR<sup>mt</sup> sería un factor protector en una condición de obesidad o la exposición a una dieta alta en grasa, al aumentar el gasto energético debido a la regulación del metabolismo aumentando la glicolisis y suprimiendo la fosforilación oxidativa (39). Tal como se señala en estudios de ratones knock-out de *surfl*, una proteína que forma parte del complejo IV de la citocromo C oxidasa (parte de la cadena OXPHOS), se ha descrito que presentan un menor IMC, almacenamiento de grasa, aumento de sensibilidad a insulina y de oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo (38). Junto a esto, se ha observado un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con la UPR<sup>mt</sup> tales como Hsp60, ClpP y Lonp1 tanto en músculo esquelético como en corazón (40).

La vía NAD<sup>+</sup>/sirtuina (SIRT), es una vía activada frente a un desbalance en el metabolismo, donde se produce un aumento de las concentraciones de NAD<sup>+</sup>, que es un importante cofactor para enzimas deacetilasas NAD<sup>+</sup> dependientes llamadas sirtuinas, las cuales son encargadas de promover la homeostasis mitocondrial, aumentando la biogénesis mitocondrial y OXPHOS (41). Se ha descrito que esta vía contrarresta los efectos negativos de la sobrenutrición debido al aumento del metabolismo y la función mitocondrial. Además, el incremento de algunas sirtuinas, tales como SIRT1 y SIRT3 induce la expresión de proteínas relacionadas con la UPR<sup>mt</sup> (41). Al evaluar la expresión de la vía NAD<sup>+</sup>/SIRT en gemelos homocigotos con diferentes IMC se ha observado una disminución de la expresión de genes relacionados con la UPR<sup>mt</sup> tales como *ClpP*, *Lonp1* y *Hsp60* en tejido adiposo, posiblemente debido a una disminución de la activación de la vía NAD<sup>+</sup>/SIRT (41). Por otra parte, se ha sugerido que la presencia de la proteína FTO (*Fat mass and obesity-associated protein*), implicada en el metabolismo de lípidos y de la sobrevivencia de los adipocitos, reduciría la expresión génica de *Hsp60* y *Lonp1* (42).

En ratones alimentados con una dieta baja en grasas saturadas, se ha descrito que hay un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con la UPR<sup>mt</sup>, tales como ClpP y Hsp60 en tejido adiposo, mientras que en los ratones alimentados con una dieta alta en grasas saturadas se observa una disminución de la expresión proteica de ClpP, lo que sugiere que la activación de la UPR<sup>mt</sup> ayudaría a preservar la función mitocondrial y la eficiente utilización de grasas (39). En este contexto, se ha descrito en ratones knockout del gen *ClpP*, que codifica para una proteasa dependiente de ATP ampliamente distribuida tanto en células procariotas como en los organelos presentes en células eucariotas, y que es un importante efector de la UPR<sup>mt</sup>, presentan una menor prevalencia del fenotipo obeso frente a ratones wild-type *ClpP*. Además, los ratones knock-out comparados con ratones wild-type, presentan una baja en la resistencia a la insulina, conjunto a una mejora en la homeostasis de la glucosa tanto en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (43, 44).

Dado que la UPR<sup>mt</sup> es una vía de señalización recientemente descrita, poco se sabe acerca de su regulación en el músculo esquelético en una condición de estrés crónico como la obesidad. Y, del mismo modo, debido a que el músculo es un órgano constituido por diversos tipos de fibras musculares (con propiedades funcionales y metabólicas distintas), es importante dilucidar si es que se presentan diferencias en la expresión de la UPR<sup>mt</sup>, en un contexto de obesidad por una dieta alta en grasa y si está activación es dependiente del tipo de fibra muscular.

# Hipótesis y objetivos

## Hipótesis

Los ratones obesos presentan una disminución en la activación de la respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>) de forma diferencial en músculos rápidos y lentos.

### Objetivo general

Evaluar la expresión de genes y niveles de proteínas relacionados con la respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>) en músculos rápidos y lentos.

### Objetivos específicos

1. Evaluar parámetros generales en los ratones obesos y normopeso.
2. Evaluar la expresión de genes implicados en la cascada de señalización de la UPR<sup>mt</sup> en músculo sóleo, cuádriceps y gastrocnemio de ratones obesos y normopeso.
3. Cuantificar los niveles de proteínas implicadas en la cascada de señalización de la UPR<sup>mt</sup> en músculo sóleo, cuádriceps y gastrocnemio de ratones obesos y normopeso.

## **Materiales y métodos**

Esta investigación fue realizada en el Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina (Universidad de Chile) y en el Laboratorio de Fisiología y Bioenergética Celular del Departamento de Farmacia en la Facultad de Química y de Farmacia (Pontificia Universidad Católica de Chile).

### **Aprobación ética**

El trabajo con los animales se realizó con la responsabilidad y cuidados necesarios exigidos por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, de acuerdo con el “protocolo de manejo y cuidado de animales” con Código Comité Facultad PT-2020-RT-AdC, asociado con el proyecto FONDECYT de Iniciación N°11190756 (**Anexo 1**). Durante todo el proceso experimental, se cumplió con los requerimientos básicos de bioseguridad para ser desarrollado, de acuerdo con los siguientes 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 (OMS, Ginebra 2005).

### **Preparación de animales**

Se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J con un peso inicial de 12-14 gramos. Estos ratones fueron mantenidos en un ambiente controlado de temperatura constante de 21°C con libre acceso al agua y alimentación controlada. Los ciclos de luz y oscuridad fueron de 12 horas.

Se establecieron dos grupos con un tamaño de la muestra igual a 7 u 8 por grupo. El grupo A correspondió a ratones alimentados con una dieta control (DC) compuesta por 10% de lípidos, 20% de proteínas y 70% de carbohidratos. El grupo B se conformó por ratones alimentados con una dieta alta en grasa (DAG) compuesta por 60% de lípidos, 20% de proteínas y 20% de carbohidratos. Ambos grupos, se alimentaron con la respectiva dieta durante doce semanas.

## **Evaluación de la fuerza y capacidad aeróbica en ratones**

Para medir la fuerza y la capacidad aeróbica en los ratones, se realizaron la prueba de fuerza de agarre y la prueba de velocidad máxima en trotadora. Éstas se realizaron al finalizar las doce semanas, previo a la obtención de los músculos sóleo, cuádriceps y gastrocnemio.

### **Fuerza de agarre**

La prueba de fuerza de agarre consistió en colocar a los animales en una plataforma acoplada a un dinamómetro, generando que el animal se agarrará a la plataforma por medio de sus patas delanteras. Luego, se realizó la tracción del animal por la cola hasta que se desprendiera de la plataforma. Este procedimiento se repitió tres veces con descansos de un minuto por medición. La fuerza de agarre máxima aplicada por cada animal quedó registrada en el equipo Force Gauge (China) y fue medida en Newtons, después estos valores fueron normalizados de acuerdo al peso del animal. Este experimento se llevó a cabo en la duodécima semana en ambos grupos.

### **Velocidad máxima en treadmill (trotadora)**

La prueba de velocidad máxima en trotadora consistió en colocar a correr a los animales en una trotadora especializada. Primero, el ratón corrió en la trotadora con una intensidad de 0,5 km/hr durante 5 minutos por tres días consecutivos. Después, para medir la velocidad máxima se aumentó la velocidad a 0,2 km/hr cada 2 minutos, hasta que el animal no pudo mantener el ritmo por un período de 10 segundos. El tiempo fue registrado con un cronómetro. Este experimento se llevó a cabo en la duodécima semana en ambos grupos.

### **Obtención de músculos**

Los ratones se sacrificaron por medio de una dislocación cervical. Luego, se realizó la disección de los músculos sóleo, cuádriceps y gastrocnemio; se extrajo el complejo gastrocnemio-sóleo para su posterior pesaje. Finalmente, se abrió la pared abdominal y se extrajo con mucho cuidado la grasa contenida en los testículos (grasa epididimal) y se pesó.

## **Extracción de ARN mensajero**

Para la extracción del ARN a partir de músculos enteros, se usó el reactivo de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras musculares junto al reactivo Trizol se homogeneizaron mediante el homogeneizador Tissue Master 125 Homogenizer (OMNI) a máxima potencia durante 10 seg. Para luego ser colocadas en hielo por 30 segundos. En 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. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.483g 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 ARN.

Las muestras fueron tratadas con 0,2 ml de cloroformo, agitándolas vigorosamente por 15 segundos y dejándolas reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 10.483g por 15 minutos a 4°C. El ARN contenido en el sobrenadante precipitó con 0,5 ml de isopropanol, se dejó a temperatura ambiente por otros 10 min y luego se centrifugó a 10.483g por otros 15 minutos a 4°C.

Una vez lavado con etanol al 80%, el precipitado fue resuspendido en 20 µl de H<sub>2</sub>O sin nucleasas.

Con el fin de eliminar los residuos de DNA genómico, se utilizó el kit TURBO DNA-free<sup>™</sup> (Invitrogen). Este consistió en primero hacer un Mix 1 para cada muestra con las siguientes concentraciones: 1,2 µl de Buffer DNAsa 10x y 1 µl de la enzima Turbo DNAsa. Luego, las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos en un Thermoblock. Posteriormente, a cada muestra se le agregó 1,2 µl de inactivador de DNAsa y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se procedió a una centrifugación por 2 minutos a 7280g y se recuperó aproximadamente 10 µl del sobrenadante. Finalmente, la concentración de ARN total se midió a partir de estas muestras tratadas, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

## **Síntesis de DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa (RT)**

Para la obtención de cDNA, se utilizó el protocolo del kit RT-PCR de la enzima SuperScript II (Invitrogen). Éste consiste en obtener cDNA a partir de 1 µg de RNA total como mínimo. Primero, se



hizo un tubo mix 1 con las siguientes concentraciones para cada muestra: 1 µl de dNTP 10 mM, 1 µl oligo dT primer 0,5 µg/ µl, X µl de RNA correspondiente a 1 µg y X µl de agua sin nucleasas. El volumen final de cada tubo fue de 10 µl. La mezcla se dejó en un Thermoblock a 65°C por 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo durante 1 minuto y se agregó a cada tubo, la mezcla del tubo mix 2 con los siguientes componentes para cada muestra: 4 µl de Buffer 5X First, 2 µl DTT 0,1 M, 0,25 µl RNAsin, 3,5 µl agua sin nucleasas, 0,25 µl de SuperScript II. Para el caso del tubo de RNA sin transcriptasa reversa (-RT), se procedió a hacer el siguiente mix: 4 µl de Buffer 5X First, 2 µl DTT 0,1 M, 0,25 µl RNAsin, 3,5 µl agua sin nucleasas.

Luego, los tubos se incubaron en un baño termostático nuevamente a 42°C por 50 minutos y la reacción se detuvo por calentamiento a 70°C durante 15 minutos, nuevamente en un Thermoblock.

### PCR en tiempo real (qPCR)

En esta tesis se estudió la expresión génica de *ATF5*, *ATF4*, *CEBPβ*, *Hsp60*, *Lonp1* y *ClpP*. Se utilizó *Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* como gen constitutivo, porque antecedentes de la literatura han descrito que su expresión no se ve alterada con nuestro estímulo (51). La secuencia de primarios correspondientes se describe en la siguiente tabla.

Partidor	Secuencia
ATF5	(S) 5'- TGGAGCGGGAGATCCAGTA-3' (AS) 5'-GACGCTGGAGACAGACAGACGTACA-3'
ATF4	(S) 5'- GGGTTCTGTCTTCCACTCCA-3' (AS) 5'- AAGCAGCAGAGTCAGGCTTTC-3'
CEBPβ	(S) 5'- AACCTGGAGACGCAGCAC-3' (AS) 5'- ACAGCTGCTCCACCTTCTTC-3'
Hsp60	(S) 5'-CACTGGTATATGGCTCTTGAC -3' (AS) 5'-ACTGCTGTCATTGTCCATGC -3'

Lonp1	(S) 5`- CCGGCTGATGTGAATCCTTCT-3` (AS) 5`- AGCCCTATGTTGGCGTCCTTC-3`
ClpP	(S) 5`- CATTCACTGCCCAATTCCAG -3` (AS) 5`- TGATTCCTCTGCCTGGATG-3`
GAPDH	(S) 5`-TCCGCCCTTCCGCTGATG-3` (AS) 5`-CACGGAAGGCCATGCCAGTGA-3`

**Tabla 1: Secuencia de partidores a utilizar.** Se describen las secuencias de partidores a utilizar y las pares de base correspondientes a cada partidor. (S)= Sentido; (AS) = Antisentido.

El qPCR se realizó en el Termociclador Stratagene Mx3000p QPCR System (Agilent Technologies), utilizando el reactivo 5X HOT FIREPol EvaGreen QPCR Mix Plus (Solis BioDyne), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se preparó una mezcla compuesta por 2  $\mu$ L partidores 5uM (mezcla de partidor sentido y antisentido), 13  $\mu$ L H<sub>2</sub>O sin nucleasas y 4  $\mu$ L EvaGreen. A cada tubo se le agregó 19  $\mu$ L de esta mezcla y 1  $\mu$ L 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 relativa del cDNA tanto de los genes de interés como del gen constitutivo, se utilizó el programa Mxpro Software (Comparative quantification) de Stratagene y se utilizó el siguiente protocolo de temperatura para la amplificación de todos los genes: 95°C por 15 minutos, luego 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C durante 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Posteriormente, el análisis de los resultados se efectuó a través del algoritmo Delta-Delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (52). Se utilizaron los siguientes controles internos: un blanco (19  $\mu$ L de la mezcla y 1  $\mu$ L de agua sin nucleasa) y un control - RT (19  $\mu$ L de la mezcla y 1  $\mu$ L ARN mensajero). Los productos de la PCR fueron verificados por análisis de la curva de disociación.

## Western blot

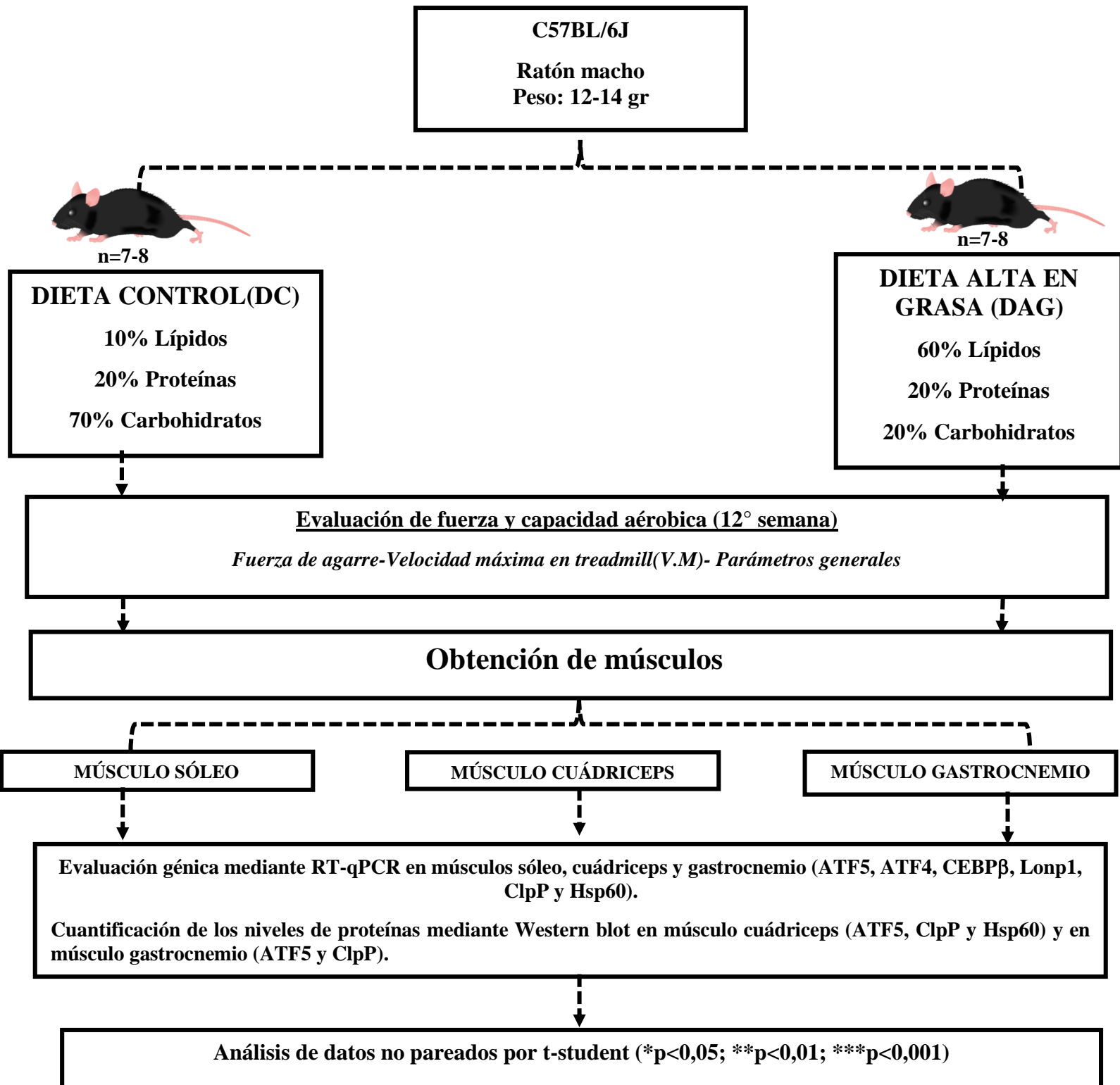
En esta tesis se cuantificó los niveles de proteínas de ATF5, ClpP y Hsp60 a través de la técnica de Western blot y se utilizó GAPDH como control de carga. Primero, se realizó la extracción de proteínas. Luego, se cuantificó la concentración a través de espectrofotometría a 600 nm utilizando el kit BCA (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, para obtener la concentración proteica de cada muestra, el valor de la absorbancia fue interpolado en una curva que utiliza BSA (albúmina de suero bovino) como estándar. A continuación, las proteínas fueron suspendidas en una solución buffer denaturante que contiene: TrisHCl pH 6,8 (62,6 mM), SDS (Sodio dodecil sulfato) (2%), azul de bromofenol (0,01%) y DTT (100 mM) para ser posteriormente denaturados a 100°C por 2 minutos. Luego, se cargaron y separaron 40 ug de proteínas mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE (TXCTM FastCastTM Acrylamide Kit 7.5, 12%, BioRad, USA) a un voltaje constante de 110 V por 4 horas y media. Al finalizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Merck Millipore, USA) por 90 minutos con amperaje constante de 400 mA. Las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo (leche al 5% en TBS-tween 20 0,1%) por una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (Anti-ATF5, Anti-Hsp60, Anti-ClpP y Anti-GAPDH) se diluyeron con la solución de bloqueo (1:1000) y luego estos anticuerpos se incubaron en la membrana durante toda la noche por 4°C en agitación. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces en TBS-T y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa cruz, anti-Mouse IgG-HRP y anti-Rabbit IgG-HRP), Thermo Fischer Scientific, USA) (1:5000) por una hora a temperatura ambiente.

Para visualizar la quimioluminiscencia, se utilizó el kit sustrato HRP quimioluminiscente Lumisensor™ (GenScript Biotech Corporation) y la detección digital se realizó en el escáner C-Digit para quimioluminiscencia (Loncotec, S.A), utilizando el software image studio para C-Digit. Las imágenes digitalizadas de los Western Blot se analizaron mediante el software ImageJ utilizando la herramienta de mediciones densimétricas.

## **Análisis estadístico**

Los resultados de los experimentos fueron analizados utilizando t-student, con el fin de evaluar la significancia de los resultados y se expresaron como el valor promedio  $\pm$  error estándar (SEM). Siendo el nivel de significancia a considerar  $p < 0,05$ .

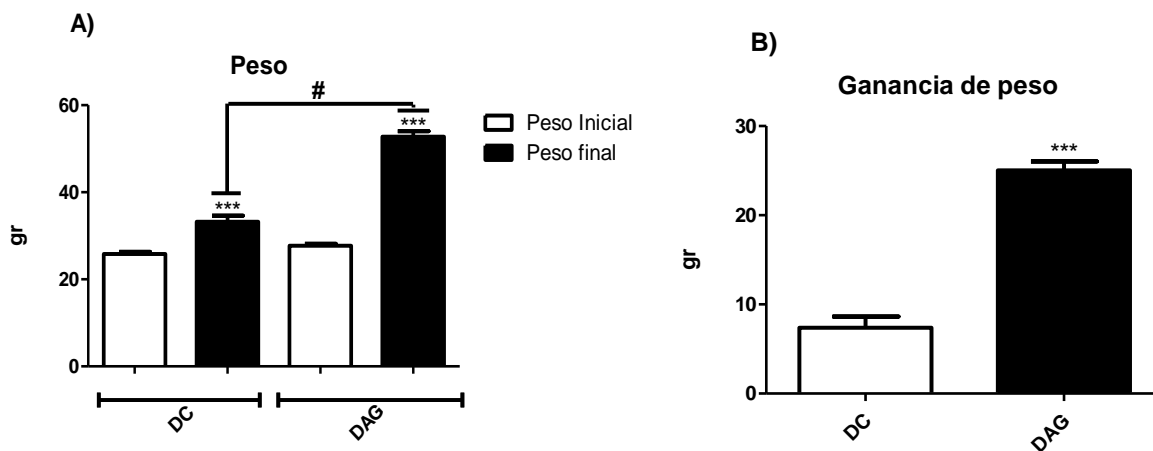
## Esquema



# Resultados

## Caracterización de los ratones con dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG) al finalizar el experimento

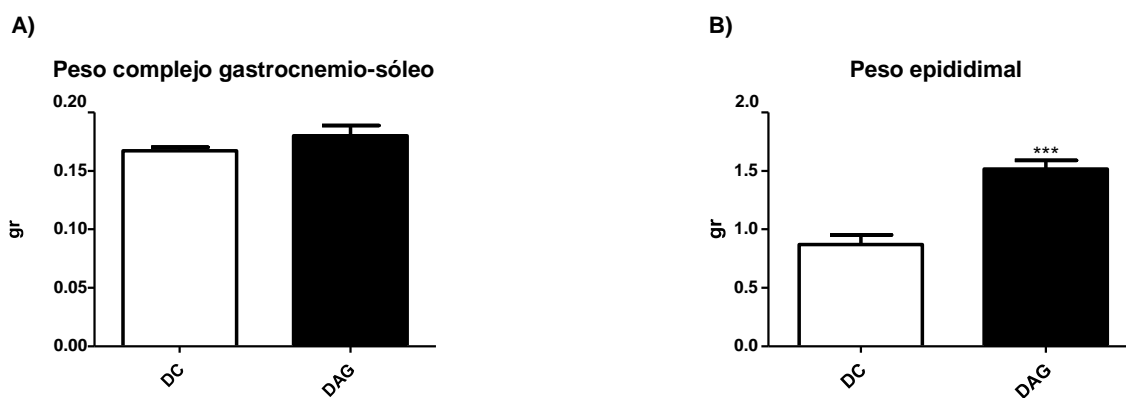
En la caracterización física de los ratones con DC y DAG, se observa que en ambos grupos hubo un aumento significativo de peso al finalizar el experimento ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4A**), además, los ratones DAG presentan un peso final de aproximadamente 2 veces el peso final de los ratones DC ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4A**). La ganancia de peso en los ratones DC fue de aproximadamente de 7,396 gramos, mientras que en el grupo de ratones con DAG fue de 25,04 gramos, lo cual es estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) (**Figura 4B**).



**Figura 4:** *Peso y ganancia de peso en ratones con dieta control (DC) y ratones con dieta alta en grasa (DAG).* A) Peso inicial y final de ambos grupos de ratones, se midió el peso en ambos grupos, tanto al inicio como al final del experimento. Los asteriscos corresponden al análisis estadístico entre el peso inicial (barras blancas) versus el peso final (barras negras) de los ratones DC y de los ratones DAG, según corresponda. El signo gato corresponde al análisis estadístico entre el peso final de los ratones DC versus el peso final de los ratones DAG (barras negras). B) Ganancia de peso de ambos grupos de ratones. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar (DC:  $n=7$ ; DAG:  $n=7$ ). Los datos fueron

analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01. (\*\*\*)  $p < 0,001$ , (\*\*\*)  $\# < 0,001$ .

Para establecer la influencia de la masa muscular y del tejido adiposo en el peso corporal, se midió el peso del complejo gastrocnemio-sóleo y el peso del tejido epididimal, respectivamente. Con respecto al peso del complejo gastrocnemio-sóleo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Figura 5A**), por ende, esto nos sugiere que tanto el grupo DC como el grupo DAG tuvieron una masa muscular similar, al finalizar las 12 semanas. No así con el peso epididimal en donde sí se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,001$ ) (**Figura 5B**), por lo tanto, esto indicaría que hubo un aumento considerable del tejido adiposo en los ratones DAG con respecto a los ratones DC al término del experimento.



**Figura 5:** *Peso complejo gastrocnemio-sóleo y peso epididimal en ratones con dieta control (DC) y ratones con dieta alta en grasa (DAG).* A) Peso complejo gastrocnemio-sóleo de ratones con DC y ratones con DAG. B) Peso epididimal de ratones con DC y ratones con DAG. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar (DC:  $n=7$ ; DAG:  $n=7$ ). Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01. (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

El aumento del tejido adiposo en el grupo DAG se correlaciona con el incremento de los parámetros pertenecientes al perfil lipídico tales como el colesterol, c-HDL, LDL y triglicéridos, en donde también

se observan diferencias significativas con respecto al grupo DC ( $p < 0,001$ ) en todos los parámetros del perfil lipídico. En relación a los parámetros bioquímicos, tales como glucosa sanguínea y GOT, también se observaron diferencias significativas entre ambos grupos: GOT ( $p < 0,01$ ) y glucosa ( $p < 0,001$ ), siendo los ratones DAG los que presentaron un aumento de estos parámetros con respecto a los ratones DC. Esta elevación relevante de la glucosa nos puede decir que los ratones DAG desarrollaron insulinoresistencia en comparación con los ratones DC al término de las doce semanas (**Tabla 2**).

<i>Parámetro</i>	<i>DC</i>	<i>DAG</i>
Glicemia (mg/dL)	153,1 ± 12,90	240,9 ± 13,22 (***)
Área bajo la curva (AUC)	1517 ± 73,77	2874 ± 180,8 (***)
Transaminasa Glutámico Oxalacética (GOT) (UI/L)	14,43 ± 1,395	34,14 ± 4,906 (**)
Colesterol (mg/dL)	107,9 ± 4,206	163,1 ± 3,481 (***)
C-HDL(mg/dL)	61,57 ± 4,353	92,57 ± 2,114 (***)
Triglicéridos (mg/dL)	33,00 ± 5,278	60,14 ± 2,165 (***)
LDL (mg/dL)	39,69 ± 1,045	58,54 ± 3,578 (***)

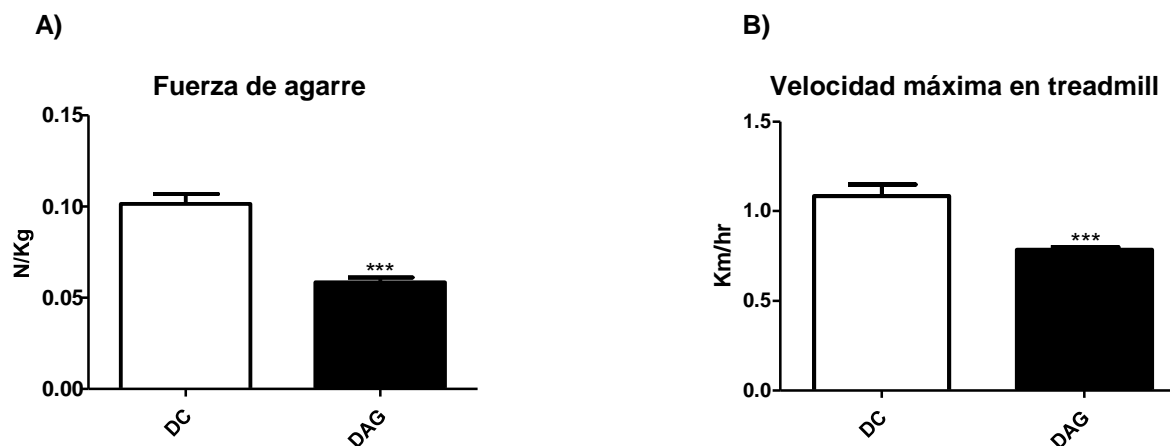
**Tabla 2: Parámetros generales de ratones con dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG).** Los valores están expresados como la media ± error estándar (DC: n=7; DAG: n=7). Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados. (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

## **Evaluación de la fuerza y capacidad aeróbica mediante la determinación de la fuerza de agarre y velocidad máxima en treadmill**

Para determinar la fuerza muscular en los animales, a la duodécima semana se realizó la prueba de fuerza de agarre, en donde se colocó al animal en una plataforma conectada a un dinamómetro, de forma que el animal se agarrará por medio de sus patas. Luego, se traccionaba al animal por la cola hasta que el animal



se soltara. La fuerza de agarre quedo registrada en el dinamómetro y el resultado se normalizo de acuerdo con el peso de los ratones. Como se observa en los resultados, la fuerza de agarre de los ratones DAG disminuye significativamente con respecto a los ratones DC en la duodécima semana ( $p<0,001$ ) (**Figura 6A**). Estos resultados indicarían que en los ratones DAG presentaron una disminución de la fuerza muscular.



**Figura 6:** *Fuerza de agarre y velocidad máxima en treadmill (trotadora) a la 12<sup>o</sup> semana en ratones con dieta control (DC) y ratones con dieta alta en grasa (DAG).* A) Se midió la fuerza de agarre en ambos grupos, utilizando un dinamómetro y se determinó la fuerza de agarre, B) Se midió la velocidad máxima en trotadora en ambos grupos en la duodécima semana. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar (DC: n=7; DAG: n=7). Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01. (\*\*\*)  $p<0,001$ .

Para evaluar la capacidad aeróbica, en la duodécima semana se realizó la prueba de velocidad máxima en trotadora, la cual consistió en colocar a correr el animal en una trotadora. Primero, se hizo correr con una velocidad de 0,5 km/hr durante 5 minutos por 3 días consecutivos. Luego, para calcular la velocidad máxima se aumentó la velocidad 0,2 km/hr cada 2 minutos hasta que el ratón no pudiera mantener el ritmo por más de 10 segundos. Los resultados indican que los ratones DAG tuvieron una menor velocidad máxima con respecto a los ratones DC, siendo esto significativamente estadístico ( $p<0,001$ ). Estos

resultados nos sugieren que los ratones DAG presentan una disminución de la resistencia física y por ende de la capacidad aeróbica.

## **Expresión de genes de la UPR<sup>mt</sup> en distintos tipos de músculos en ratones DAG y DC mediante RT-qPCR**

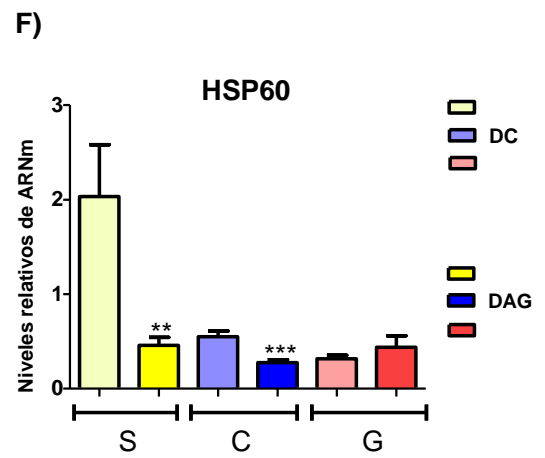
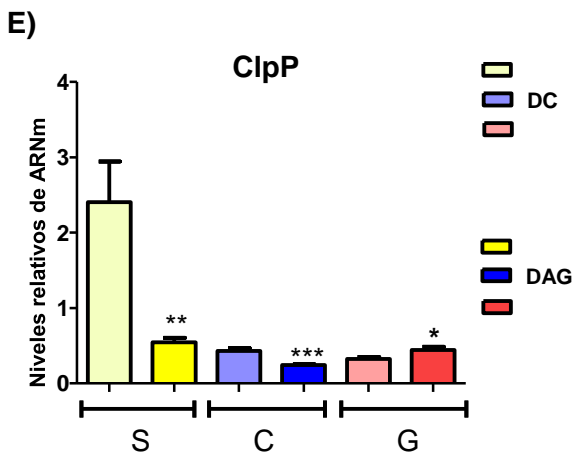
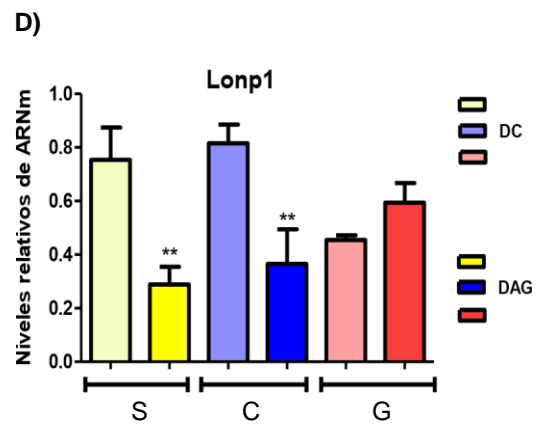
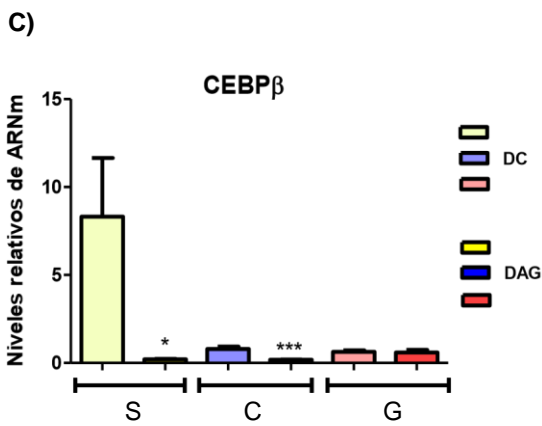
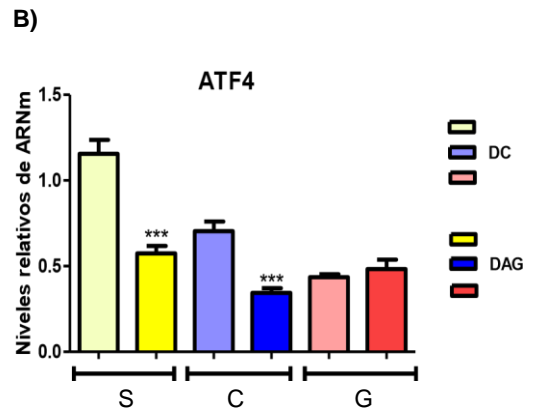
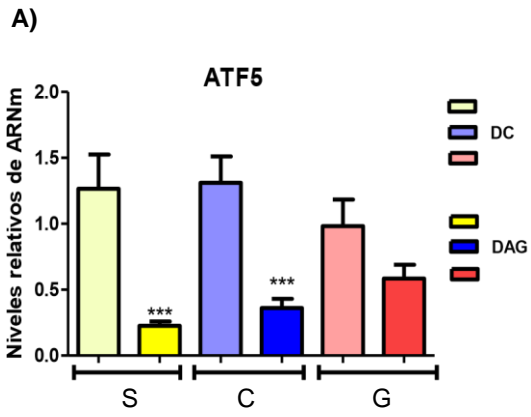
Para cuantificar los distintos genes implicados en la cascada de señalización de la UPR<sup>mt</sup> en diferentes tipos de músculos aislados desde ratones DC y ratones DAG, se utilizó la metodología de RT-qPCR. Los músculos analizados fueron: Sóleo (S), que se caracteriza por ser un músculo con predominio de fibras lentas (tipo I) u oxidativas; Cuádriceps (C), caracterizado por ser un músculo mixto de fibras oxidativas y glucolíticas (tipo IIa); y Gastrocnemio (G), que se caracteriza por tener predominio de fibras rápidas (tipo IIb) o glucolíticas. Para estudiar la UPR<sup>mt</sup>, se evaluó la expresión génica de los factores de transcripción *ATF5*, *ATF4* y *CEBPβ*; las proteasas *Lonp1* y *ClpP*; y la chaperonina *Hsp60*.

Con respecto a la expresión génica de los factores de transcripción en los diferentes músculos, se puede observar que la expresión relativa de ARNm de *ATF5* disminuye significativamente en músculo sóleo y cuádriceps en ratones DAG en comparación con ratones DC ( $p < 0,001$ ) (**Figura 8A**). Además, cabe mencionar que la diferencia de los niveles del transcrito entre ratones DC y DAG son similares en ambos músculos (Sóleo: 1.04 veces; Cuádriceps: 0.95 veces). Por otro parte, en músculo gastrocnemio, si bien se observa una menor expresión de ARNm de *ATF5* en ratones DAG comparado con ratones DC (0.4 veces), esta diferencia no es significativa (**Figura 8A**). Por otro lado, en *ATF4* se puede apreciar que los niveles relativos de ARNm disminuyen significativamente en ratones DAG con respecto a ratones DC tanto en músculo sóleo ( $p < 0,001$ ) como en cuádriceps ( $p < 0,001$ ) (**Figura 8B**). Al observar los resultados en músculo sóleo se puede visualizar una disminución de la expresión génica de *ATF4* más pronunciada entre los grupos DC y DAG (0.6 veces), en comparación con el músculo cuádriceps (0.4 veces). En cuanto al músculo gastrocnemio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *ATF4* entre los ratones DC y DAG (**Figura 8B**). Con respecto a *CEBPβ*, se puede visualizar que los niveles relativos de ARNm disminuyen significativamente en ratones DAG en comparación con los DC, tanto en músculo sóleo ( $p < 0,05$ ) como en cuádriceps ( $p < 0,001$ ) (**Figura 8C**), al ver la Figura 8C se puede

apreciar que hay una gran atenuación de los niveles de ARNm en músculo sóleo de ratones DAG con respecto a los DC (8 veces), mientras que en músculo cuádriceps esta tendencia es de 0,6 veces. Por otro lado, en músculo gastrocnemio, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de *CEBPβ* entre los grupos DC y DAG.

En cuanto a la expresión génica de las proteasas, se puede observar que los niveles de ARNm de *Lonp1* disminuyen significativamente en ratones DAG con respecto a los DC tanto en músculo sóleo ( $p < 0,01$ ) como en cuádriceps ( $p < 0,01$ ) (**Figura 8D**). Al visualizar la Figura 8D, se puede apreciar que la disminución de *Lonp1* entre ratones DAG y DC es semejante en ambos músculos ( $\approx 0,5$  veces). Por otro lado, en músculo gastrocnemio de ratones DAG se observa una tendencia al aumento de la expresión génica de *Lonp1* (0,1 veces), sin embargo, no representa una diferencia significativa. Con respecto a los niveles de ARNm de *ClpP*, se puede visualizar que hay una menor expresión en ratones DAG en comparación con los DC, tanto en músculo sóleo ( $p < 0,01$ ) como en cuádriceps ( $p < 0,001$ ) (**Figura 8E**). Al ver los resultados en músculo sóleo se puede observar una atenuación de la expresión génica de *ClpP* más evidente entre los grupos DC y DAG (2 veces), en comparación con el músculo cuádriceps (0.2 veces). En músculo gastrocnemio, al contrario, se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de *ClpP* en ratones DAG con respecto a los DC ( $p < 0,05$ ), con una diferencia de 0,1 veces entre los grupos, esto nos puede sugerir que existe una adaptación mitocondrial en el músculo gastrocnemio, siendo un músculo con predominio de fibras tipo IIb o glucolíticas en una condición de obesidad.

En cuanto a los niveles de ARNm de la chaperona *Hsp60*, se puede observar que hay una disminución significativa en ratones DAG con respecto a los DC, en los músculos sóleo ( $p < 0,01$ ) y cuádriceps ( $p < 0,001$ ) (**Figura 8F**). Siendo la disminución entre los grupos más pronunciada en músculo sóleo (1,6 veces) que en cuádriceps (0,3 veces). Mientras que, en músculo gastrocnemio, se observa una tendencia al aumento de la expresión de *Hsp60* en ratones alimentados con DAG en comparación con los DC (0,12 veces), que no es significativa.



**Figura 8: Expresión génica relativa de genes de la UPR<sup>mt</sup> (ATF5, ATF4, CEBP $\beta$ , Lonp1, ClpP y Hsp60) en músculos sóleo(S), cuádriceps(C) y gastrocnemio(G) de ratones con dieta control (DC) y dieta alta en grasa (DAG).** El músculo sóleo está representado por el color amarillo, el cuádriceps por el color azul y el gastrocnemio por el color rojo. Los ratones DAG corresponden a las tonalidades más oscuras, mientras los ratones DC corresponden a las más claras. A) Niveles relativos de ARNm de ATF5, DC: n=7, DAG: n=7. B) Niveles relativos de ARNm de ATF4, DC: n=7, DAG: n=7. C) Niveles relativos de ARNm de CEBP $\beta$ , DC: n=7, DAG: n=7. D) Niveles relativos de ARNm de Lonp1, DC: n=7, DAG: n=7. E) Niveles relativos de ARNm de ClpP, DC: n=7, DAG: n=7. F) Niveles relativos de ARNm de Hsp60, DC: n=7, DAG: n=7. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar (n=7). Los niveles de ARNm de cada gen fueron normalizados a 1 con respecto a los niveles del gen control GAPDH. Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01. (\*) p<0,05; (\*\*) p<0,01; (\*\*\*) p<0,001.

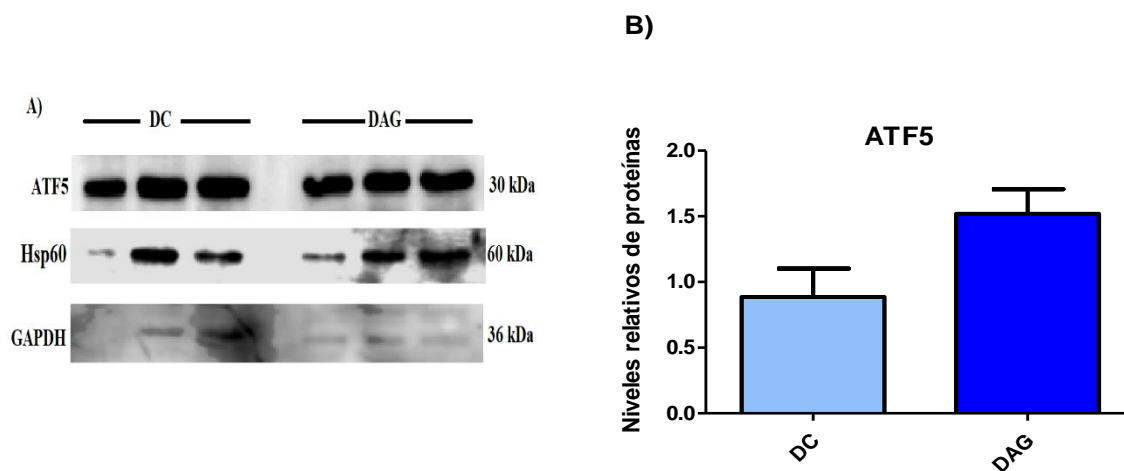
Nuestros resultados sugieren que hay una expresión génica diferencial de los genes *ATF5*, *ATF4*, *CEBP $\beta$* , *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60* dependiendo del tipo de músculo. En donde los músculos con presencia de fibras oxidativas, presentan una disminución general de la expresión génica de la UPR<sup>mt</sup> en ratones DAG. Mientras que, en músculo gastrocnemio con presencia de fibras glucolíticas, sólo se aprecia un aumento significativo de *ClpP* en ratones DAG.

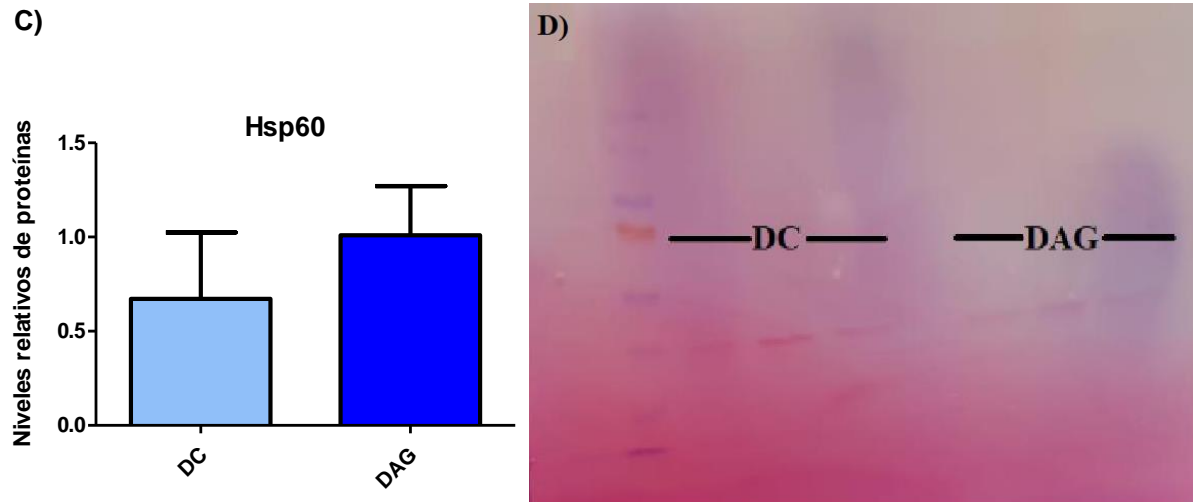
### **Cuantificación de los niveles de proteínas de la UPR<sup>mt</sup> en distintos tipos de músculos en ratones DAG y DC mediante Western blot**

Para cuantificar los niveles de proteínas relacionadas con la UPR<sup>mt</sup> en músculos aislados de ratones alimentados con DAG y DC, se realizó la técnica de Western blot. Los músculos analizados fueron el músculo cuádriceps y el músculo gastrocnemio, no fue posible analizar el músculo sóleo, debido a que la cantidad de éste fue insuficiente para este análisis en ambos grupos. Por otra parte, debido a las circunstancias sólo se analizaron las proteínas ATF5, ClpP y Hsp60. Se utilizó como control de carga la proteína GAPDH.

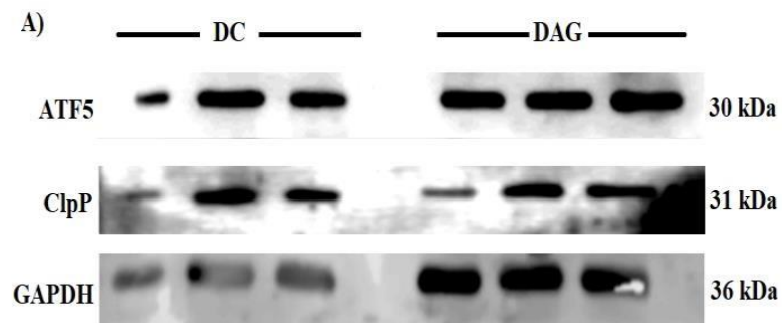
En músculo cuádriceps, se obtuvieron las bandas inmunorreactivas correspondientes a las proteínas ATF5 ( $\approx 30$  kDa), y Hsp60 ( $\approx 60$  kDa) de acuerdo con los pesos esperados para cada proteína (**Figura 9A**). En el análisis densitométrico de las proteínas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos DC y DAG, sin embargo, en las **Figuras 9B** y **9C** se puede apreciar una tendencia al aumento de los niveles proteicos relativos de ATF5 y Hsp60 en ratones DAG con respecto a ratones DC en músculo cuádriceps (ATF5: 0,6 veces y Hsp60: 1,5 veces). Debido a la baja calidad de visualización de la banda ClpP en la membrana, se decidió excluirla para este análisis.

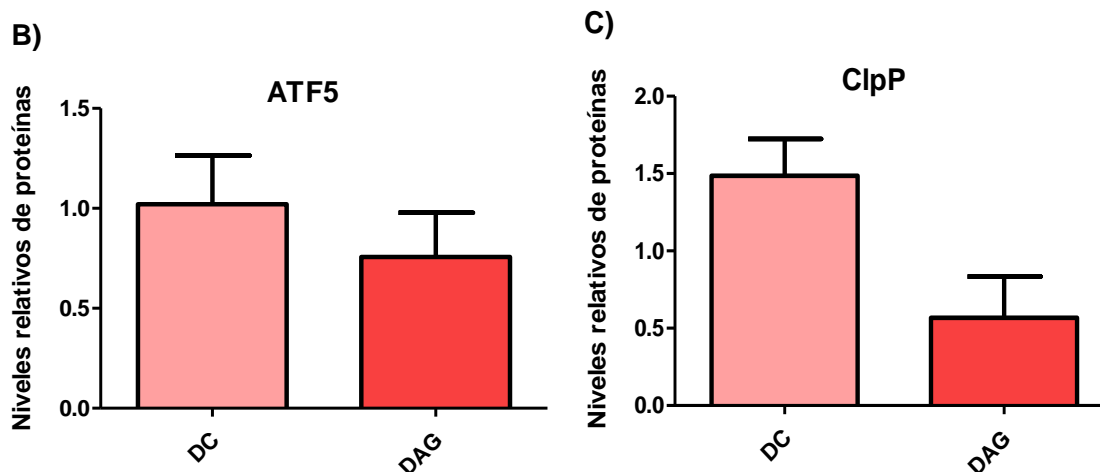
Por otra parte, en músculo gastrocnemio, en la **Figura 10A** se puede observar las bandas inmunorreactivas de las proteínas ATF5 y ClpP, siendo concordantes con sus pesos moleculares correspondientes. Debido al tiempo, no se estudió la expresión de la proteína Hsp60 en músculo gastrocnemio. En los análisis densitométricos de ATF5 y ClpP no se observaron diferencias significativas entre los grupos DC y DAG, sin embargo, se aprecia una tendencia a la disminución de los niveles de proteínas de ATF5 y ClpP en ratones del grupo DAG con respecto al grupo DC (ATF5: 0,3 veces, ClpP: 1,0 veces) tal como se puede observar en las **Figuras 10B** y **10C** respectivamente.





**Figura 9:** Niveles relativos de proteínas de Hsp60 y ATF5 en músculo cuádriceps de ratones con dieta control (DC) y ratones con dieta alta en grasa (DAG). Los ratones DAG corresponden a las tonalidades más oscuras, mientras los ratones DC corresponden a las más claras. A) Se cargaron 40  $\mu$ g de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12%, usando como control de carga GAPDH. B) Niveles relativos de proteínas de ATF5. C) Niveles relativos de proteínas de Hsp60. D) Membrana de músculo cuádriceps teñida con rojo ponceau. DC=dieta control; DAG=dieta alta en grasa. Los valores están expresados como la media  $\pm$  error estándar (DC: n=3 DAG: n=3). Y se normalizaron respecto a los niveles de GAPDH. Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01.





**Figura 10:** Niveles relativos de proteínas de ATF5 y ClpP en músculo gastrocnemio de ratones con dieta control (DC) y ratones con dieta alta en grasa (DAG). Los ratones DAG corresponden a las tonalidades más oscuras, mientras los ratones DC corresponden a las más claras. A) Se cargaron 40 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12%, usando como control de carga GAPDH. B) Niveles relativos de proteínas de ATF5. C) Niveles relativos de proteínas de ClpP. Los valores están expresados como la media ± error estándar (DC: n=3; DAG: n=3). Y se normalizaron respecto a los niveles de GAPDH. Los datos fueron analizados utilizando t-student para datos no pareados mediante el programa GraphPad Prism v.5.01.

Como se puede observar en las **Figura 9 y 10**, se utilizó GAPDH como control de carga, sin embargo, los ratones DC presentan una intensidad de banda menor de esta proteína en comparación con los ratones DAG, lo que podría sugerir que la carga de proteínas no fue efectuada en forma pareja, no obstante, la **Figura 9D** muestra la membrana correspondiente el músculo cuádriceps teñida con rojo ponceau, un colorante con alta afinidad hacia las proteínas y se observa que la distribución de proteínas es pareja. En la membrana correspondiente al músculo gastrocnemio no se efectuó esta tinción.



## Discusión

La obesidad es considerada una pandemia a nivel mundial por la OMS (1) y es un importante factor de riesgo a múltiples enfermedades crónicas tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica y enfermedades musculoesqueléticas, además se ha relacionado con el desarrollo de algunos tipos de cáncer (endometrial, hígado, riñón, entre otros) (45). Se ha propuesto que el aumento de la hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos estaría relacionado con las complicaciones de la obesidad, induciendo de este modo la lipólisis del tejido y por consiguiente la acumulación de ácidos grasos de manera ectópica en órganos como el músculo esquelético, lo que induce diversas alteraciones en este órgano debido a la lipotoxicidad y acumulación de EROs (14). La mitocondria, es un organelo subcelular encargado de funciones metabólicas tales como la síntesis de ATP y de otras vías de señalización intracelular (23). En músculo esquelético, se ha descrito una disfunción de este organelo en una condición de obesidad, lo cual conlleva a una menor producción de ATP y aumento del estrés oxidativo (14). Entre los mecanismos de respuesta molecular de la mitocondria frente a una condición de obesidad en músculo esquelético, se ha sugerido el aumento de la biogénesis mitocondrial (14,26,27), cambios morfológicos relacionados con procesos de fisión y fusión de mitocondrias (28); y cambios en vías de señalización relacionadas con la mitofagia (21). Sin embargo, hay pocos antecedentes acerca del rol del mecanismo de respuesta mitocondrial a proteínas mal-plegadas (UPR<sup>mt</sup>) en una condición de obesidad o por exposición a una dieta alta en grasa en músculo esquelético y, asimismo, hay escasos estudios acerca del rol de esta vía en distintos tipos de fibra muscular.

El objetivo de estas tesis fue evaluar la expresión de genes y cuantificar los niveles de proteínas relacionadas con la UPR<sup>mt</sup> en músculos rápidos y lentos, además de evaluar los parámetros físicos (fuerza y capacidad aeróbica) y bioquímicos en ratones normopeso y obesos. Para ello, se estableció un grupo de ratones alimentados con dieta control (DC) y un grupo de ratones alimentados con dieta alta en grasa (DAG). El tiempo de exposición fue de doce semanas. Al término del experimento se midió la velocidad máxima en trotadora y la fuerza de agarre para evaluar la capacidad aeróbica y la fuerza de los ratones respectivamente. Luego, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a realizar la

dissección de los músculos, los músculos elegidos para el alcance de esta tesis fueron el músculo sóleo (músculo lento con predominio de fibras tipo I), músculo cuádriceps (músculo mixto con predominio de fibras tipo IIa) y músculo gastrocnemio (músculo rápido con predominio de fibras tipo IIb). En cada músculo, se evaluó la expresión génica mediante RT-qPCR de los siguientes genes: *ATF5*, *ATF4*, *CEBPβ*, *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60*. La cuantificación de los niveles de proteína se determinó mediante la técnica de Western blot de las siguientes proteínas: ATF5 y Hsp60 en músculo cuádriceps. Y en músculo gastrocnemio, ATF5 y ClpP.

Con respecto a los parámetros físicos, es decir la fuerza y capacidad aeróbica en ratones normopeso y obesos, nuestros resultados indican que los ratones DAG disminuyeron tanto su fuerza como su capacidad aeróbica en comparación con los ratones DC (**Figura 6**). Esto nos podría sugerir que hubo una pérdida de la función muscular en los ratones con DAG, lo cual se correlaciona con antecedentes de la literatura (14, 45), en donde se ha descrito que en los individuos obesos se produce una pérdida de la fuerza muscular debido a la disminución tanto de la masa muscular como de la función muscular, lo cual es argumentado por la insulinoresistencia, que se caracteriza por ser un estado proinflamatorio que conlleva al aumento de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo en el músculo esquelético. Al observar la caracterización física de los ratones DAG con respecto a los ratones DC (**Figura 4**), se puede sugerir que los ratones DAG aumentaron considerablemente su peso debido a un aumento sustancial del tejido adiposo (**Figura 5B**), y asimismo desarrollaron insulinoresistencia por la hiperglucemia, tal como se puede observar en los parámetros bioquímicos (**Tabla 2**). Por ende, nuestros resultados son consistentes con investigaciones anteriores.

La UPR<sup>mt</sup> es una vía de señalización recientemente descrita y con múltiples ejes de regulación, siendo la vía canónica la mejor descrita en mamíferos (33). Esta vía tiene por objetivo disminuir la proteotoxicidad y aumentar la capacidad de plegamiento en la matriz mitocondrial y es principalmente regulada por los factores de transcripción con dominio bZIP, ATF5 y ATF4. Y, por el factor de transcripción

CHOP/CEBP $\beta$ . Estos factores de transcripción, inducen la transcripción de genes tales como las proteasas ClpP y Lonp1, que clivan las proteínas dañadas o tóxicas y de chaperoninas como Hsp60 y mtHsp70 que aumentan la capacidad de plegamiento de las proteínas (33).

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que hay una expresión génica diferencial dependiendo del tipo de músculo en ratones obesos. En estos, se evidencia una disminución significativa de los niveles relativos de ARNm de *ATF5*, *ATF4*, *CEBP $\beta$* , *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60* en músculo sóleo (músculo oxidativo) y en cuádriceps (mixto), siendo más evidente la disminución de la expresión génica en músculo sóleo (**Figura 8A, 8B, 8C, 8D, 8E y 8F**). Por otro lado, en músculo gastrocnemio (músculo glucolítico), se observa un aumento estadísticamente significativo sólo de la proteína *ClpP* en ratones DAG al comparar con ratones DC (**Figura 8E**), una posible explicación a este fenómeno de acuerdo con la literatura, es que los músculos oxidativos son los más afectados en una condición de obesidad en comparación con los músculos glucolíticos (14,48), lo cual podría deberse a la acumulación de proteínas mal-plegadas en la mitocondria, que superaría la capacidad de plegamiento de chaperonas y proteasas mitocondriales conllevando de esta forma a la disfunción de las mitocondrias musculares (46), siendo los músculos con un predominio de fibras oxidativas los más afectados, ya que presentan mayor cantidad de mitocondrias (13). Esta hipótesis es consistente con un estudio realizado en músculo sóleo de ratones knock-out del gen *Lonp1*, en donde se observó una pérdida tanto de la estructura y función mitocondrial (47) y también con un estudio realizado en ratones alimentados con dieta alta en grasa por 8 semanas, en el que se observó una disfunción mitocondrial sólo en músculos oxidativos (48). Sin embargo, se requieren más estudios y experimentos para apoyar esta hipótesis, tales como estudiar marcadores mitocondriales relacionadas con biogénesis, morfología y mitofagia mitocondrial, además de estudios de respiración mitocondrial en otros músculos oxidativos y glucolíticos, con el fin de dilucidar si se presentan alteraciones en la función, dinámica y masa mitocondrial. Por otro parte, en el músculo gastrocnemio se ha descrito en la literatura un aumento de la expresión génica de *ATF5* y proteica de ClpP en una condición de dieta alta en grasa (49). Mientras que en otro músculo glucolítico como el

tibial anterior, se ha sugerido un aumento de la expresión génica de *Hsp60* y *mtHsp70* (48). Nuestros resultados en músculo gastrocnemio indican que hubo un aumento significativo de la expresión génica sólo de *ClpP* en ratones DAG (**Figura 8E**), en cambio en otros genes como *ATF5*, *ATF4*, *CEBPβ*, *Lonp1* y *Hsp60* (**Figura 8A, 8B, 8C, 8D y 8F**). no se observaron diferencias significativas, no obstante, cabe mencionar que en el caso de *Hsp60* y *Lonp1* se observa una tendencia al aumento en ratones DAG (**Figura 8D y 8F**). Al considerar investigaciones anteriores, puede sugerirse que la adaptación mitocondrial, en una condición de dieta alta en grasa, es dependiente del tipo de músculo, esperando una disminución de la UPR<sup>mt</sup> en músculos oxidativos y un aumento en músculos glucolíticos, sin embargo, es necesario más estudios para aseverar esta hipótesis.

Se ha descrito que la UPR<sup>mt</sup> juega un rol protector en condiciones de estrés fisiológico y que su disminución está asociada con la obesidad en humanos (39), pero la evidencia del comportamiento de la expresión de la UPR<sup>mt</sup> en músculo esquelético, uno de los principales órganos reguladores del metabolismo, es escasa. Sin embargo, nuestros resultados en músculo sóleo y cuádriceps parecen ser consistentes con estudios realizados en tejido adiposo. En un estudio realizado en tejido adiposo de gemelos homocigotos obesos (41) se observó una disminución de la expresión génica de *ClpP*, *Lonp1* y *Hsp60*, posiblemente debido a una disminución del metabolismo y la función mitocondrial (41). Por otra parte, en un estudio comparativo de ratones alimentados con DAG saturadas y no saturadas por catorce semanas (39) se observó una disminución de la expresión génica de *ClpP* en ratones alimentados con dieta alta en grasas saturadas.

Nuestros resultados de la cuantificación de los niveles proteicos mediante la técnica de Western blot, no encontró alguna diferencia significativa en los niveles proteicos de ATF5, ClpP y Hsp60 tanto en músculo cuádriceps y gastrocnemio, lo cual pudo ser debido al pequeño tamaño muestral del experimento (n=3) o por errores procedimentales. En músculo cuádriceps se observa una tendencia al aumento de la expresión proteica de ATF5 y Hsp60 (**Figura 9B y 9C**) en ratones alimentados con DAG en comparación con los ratones alimentados con DC, mientras que en músculo gastrocnemio se observa una tendencia a

la disminución de la expresión proteica de ClpP y ATF5 en ratones alimentados con DAG (**Figura 10B y 10C**). Sumando a esto, los resultados obtenidos tanto en músculo cuádriceps contrastan con la literatura anteriormente mencionada (39,41), ya que lo esperado de acuerdo con la evidencia, era que se presentara una disminución de la expresión proteica de ATF5 y Hsp60 en músculos de ratones alimentados con DAG. No obstante, cabe recalcar que estas diferencias pueden ser debido a errores inherentes al procedimiento ya explicados anteriormente. Por otro lado, los resultados obtenidos en músculo gastrocnemio son concordantes con la literatura expuesta anteriormente (39,41), ya que se observa una disminución de la expresión proteica de ClpP en ratones alimentados con DAG, sin embargo, nuestros resultados tanto en músculo cuádriceps como en gastrocnemio no son extrapolables debido a que no hay diferencias significativas, asimismo como limitación de este estudio, no es posible establecer si es que hay una respuesta diferencial entre músculos rápidos y lentos, ya que por dificultades técnicas las muestras de ambos músculos se cargaron en geles diferentes.

En resumen, en los resultados de la cuantificación de los niveles de proteínas de la UPR<sup>mt</sup> tanto en músculo gastrocnemio como en cuádriceps, si bien no se observaron diferencias significativas entre los ratones DAG y DC para establecer hipótesis tentativas o conclusiones, al considerar nuestros resultados obtenidos mediante la técnica de RT-qPCR podemos sugerir que hay una expresión génica diferencial de la UPR<sup>mt</sup> dependiendo del tipo de músculo y por otra parte, nuestros resultados obtenidos en cuanto a la fuerza y capacidad aeróbica mediante las metodologías de fuerza de agarre y velocidad máxima en trotadora respectivamente, se puede sugerir que los ratones obesos presentaron una pérdida tanto de la capacidad aeróbica como de la fuerza muscular en relación a los ratones normopeso.

## Conclusiones

- Los ratones alimentados con DAG al término de las doce semanas de experimento, subieron considerablemente de peso debido a un aumento significativo del tejido adiposo y además desarrollaron insulinoresistencia.
- En la evaluación de la fuerza y capacidad aeróbica en ratones obesos y normopeso, los ratones obesos presentaron una disminución de la fuerza y capacidad aeróbica con respecto a los ratones normopeso, lo cual fue concordante de acuerdo con la literatura, ya que debido a la condición de insulinoresistencia es esperable la disminución de estos parámetros en ratones obesos, por ende, nuestros resultados en esta materia son apoyados por investigaciones anteriores.
- En la expresión génica de la UPR<sup>mt</sup> en diferentes tipos de músculos en ratones obesos y normopeso, en concordancia con nuestra hipótesis se observa una disminución génica relativa de los genes *ATF5*, *ATF4*, *CEBPβ*, *Lonp1*, *ClpP* y *Hsp60* en músculos que presentan fibras oxidativas (músculo sóleo y cuádriceps) de ratones obesos, mientras que en músculo gastrocnemio con predominio de fibras glucolíticas sólo se observó un aumento significativo del gen *ClpP* en ratones obesos. Esto, nos permite sugerir que hay una expresión génica diferencial dependiendo del tipo de músculo. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos y estudiar el comportamiento de la UPR<sup>mt</sup> en otros músculos oxidativos y glucolíticos.
- En nuestros resultados de la cuantificación de los niveles de proteína ATF5, ClpP y Hsp60 en músculo cuádriceps y gastrocnemio, no se observaron diferencias significativas en ratones obesos comparado con ratones normopeso.

Nuestros resultados son un aporte y antecedente para futuros estudios que tengan por objetivo caracterizar la regulación y expresión génica de la UPR<sup>mt</sup> en diferentes tipos de músculos en una condición de obesidad, de la cual hay pocos antecedentes al día de hoy. Como futura proyección de esta investigación, se recomienda estudiar el comportamiento de esta vía a diferentes tiempos de exposición frente a una dieta obesogénica, con el objetivo de evaluar el comportamiento de esta vía de señalización, tanto en una fase aguda como crónica de exposición.

# Bibliografía

1. OMS. (2021). Obesidad y sobrepeso [Internet]. Citado el 13 de diciembre de 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Colombo F. (2019). Reviews of Public Health: CHILE. OCDE.
3. Ipsos Group S.A. (2021). Dieta & Salud durante la Pandemia [Internet]. Disponible en: [https://www.ipsos.com/sites/default/files/ct/news/documents/2021-01/ipsos\\_dieta\\_salud\\_durante\\_la\\_pandemia\\_.pdf](https://www.ipsos.com/sites/default/files/ct/news/documents/2021-01/ipsos_dieta_salud_durante_la_pandemia_.pdf)
4. Rubio Herrera, Miguel A. Bretón Lesmes I. (2021). Obesity in the COVID era: A global health challenge. *Endocrinol Diabetes y Nutr.* 2021;68(2):2.
5. Izaola O, De Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutr Hosp.* 31(6):2352–8.
6. Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver A. (2017). Pathophysiology of obesity: Current view. *Rev Chil Nutr.* Vol 44, N°3.
7. Bray G. (2004). Medical Consequences of Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(6):2583–2589.
8. Ricote A. (2016). Fisiopatología de la obesidad. Universidad Complutense de Madrid [Trabajo fin de grado].
9. Blanco M. (2003). Capacidad oxidativa de los músculos respiratorios y periféricos en la EPOC. Universidad autónoma de Barcelona.
10. Caputo C. (2011). Compendio histórico de fisiología muscular (Primera edición). Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
11. McDonough K. (2013). Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas (Primera edición). McGraw-Hill interamericana editores, S.A.

12. Ximena R. (2019). Estudio de la expresión de los receptores ErbBs en músculos rápidos y lentos de ratones obesos y normopesos. Universidad de Chile [Tesis].
13. Hall J. (2016). Compendio de fisiología médica (Duodécima edición). Barcelona: Elsevier Health Sciences Spain – T.
14. Walrand S. (2018). Nutrition and Skeletal Muscle (Primera edición).
15. Heo J, No M, Park D, Kang J, et al. (2017). Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Korean J Physiol Pharmacol.* 21(6):567–77.
16. Pinho R, Sepa-Kishi D, Bikopoulos G, et al. (2017). High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med.* 110 (2017) 381–9.
17. Wu H, Ballantyne C. (2017). Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest.* 127(1):43–54.
18. Sinha I, Sakthivel D, Varon D. (2017). Systemic regulators of skeletal muscle regeneration in obesity. *Front Endocrinol.* 8:29.
19. Tanner C, Barakat H, Lynis Dohm G, et al. (2002). Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:1191–6.
20. Maltin C. (2008). Muscle development and obesity Is there a relationship? *Organogenesis.* 4:158–69.
21. Pileggi CA, Parmar G, Harper ME. (2021). The lifecycle of skeletal muscle mitochondria in obesity. *Obesity Reviews.* 22(5):e13164.
22. Tatsuta T, Langer T. (2008). Quality control of mitochondria: Protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* 27(2):306–14.



23. Qureshi MA, Haynes CM, Pellegrino MW. (2017). The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *J Biol Chem.* 292(33):13500–6.
24. Sica V, Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Zamzami N, et al. (2016). Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Elsevier Inc. 91–104 .
25. Miotto PM, Holloway GP. (2019). Role of mitochondria in the skeletal muscle metabolism in obesity and type 2 diabetes. *Mitochondria Obes Type 2 Diabetes Compr Rev Mitochondrial Funct Involv Metab Dis.* 155–72.
26. Ciapaite J, van den Berg SA, Houten SM, et al. (2015). Fiber-type-specific sensitivities and phenotypic adaptations to dietary fat overload differentially impact fast- versus slow-twitch muscle contractile function in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem.* 26(2):155–64.
27. Wessels B, Van Den Broek NMA, Ciapaite J, et al. (2015). Carnitine supplementation in highfat diet-fed rats does not ameliorate lipid-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309:670–8.
28. Fealy CE, Grevendonk L, Hoeks J, Hesselink MKC. (2021). Skeletal muscle mitochondrial network dynamics in metabolic disorders and aging. *Trends Mol Med.* 27(11):1033–44.
29. Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. (2014). Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 117:239–45.
30. Zhu L, Zhou Q, He L, Chen L. (2021). Mitochondrial unfolded protein response: An emerging pathway in human diseases. *Free Radic Biol Med.* 163:125–34.
31. Naresh NU, Haynes CM. (2019). Signaling and regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 11(6):1–18.

32. Castillo N. (2020). UPR mitocondrial y mitofagia en músculo esquelético (Seminario de investigación). Pontificia Universidad Católica de Chile.
33. Münch C. (2018). The different axes of the mammalian mitochondrial unfolded protein response. *BMC Biol.*16(1):1–9.
34. Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM. (2012). Signaling the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Biochim Biophys Acta.* 1833(2): 410–16.
35. Kobayashi M, Nezu Y, Tagawa R, Higami Y. (2021). Mitochondrial unfolded protein responses in white adipose tissue: Lipoatrophy, whole-body metabolism and lifespan. *Int J Mol Sci.* 22(6):1–12.
36. Yi HS, Chang JY, Shong M. (2018). The mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis: A perspective on metabolic diseases. *Journal of Molecular Endocrinology.* BioScientifica Ltd. 6(3): R91–105.
37. Szczepanowska K, Trifunovic A. (2021). Mitochondrial matrix proteases: quality control and beyond. *FEBS J.* 2021;1–19.
38. Baker TA, Sauer RT. (2012). ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 1823(1):15–28.
39. Bhaskaran S, Unnikrishnan A, Ranjit R, et al. (2017). A fish oil diet induces mitochondrial uncoupling and mitochondrial unfolded protein response in epididymal white adipose tissue of mice. *Free Radic Biol Med.* 108:704–14.
40. Pulliam DA, Deepa SS, Liu Y, et al. (2014). Complex IV-deficient *Surf1*<sup>-/-</sup> mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem J.* 462(2):359–71.

41. Jukarainen S, Heinonen S, Rämö JT, et al. (2016). Obesity Is Associated With Low NAD<sup>+</sup>/SIRT Pathway Expression in Adipose Tissue of BMI-Discordant Monozygotic Twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 101:275–83.
42. Shen Z, Liu P, Sun Q, Li Y, et al. (2021). FTO inhibits UPRmt-induced apoptosis by activating JAK2/STAT3 pathway and reducing m6A level in adipocytes. *Apoptosis.* 26(7–8):474–87.
43. Becker C, Kukat A, Szczepanowska K, et al. (2018). CLPP deficiency protects against metabolic syndrome but hinders adaptive thermogenesis. *EMBO Rep.* 19(5):1–15.
44. Bhaskaran S, Pharaoh G, Ranjit R, Murphy A, et al. (2018). Loss of mitochondrial protease ClpP protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance. *EMBO Rep.* 19(3):1–17.
45. Choi KM. (2016), Review Article Sarcopenia and Sarcopenic Obesity. *Korean J Intern Med.* 31(6):86–9.
46. Richards BJ, Slavin M, Oliveira AN (2022). Mitochondrial protein import and UPRmt in skeletal muscle remodeling and adaptation. *Semin Cell Dev Biol.*
47. Xu Z, Fu T, Guo Q, Zhou D, Sun W, Zhou Z, et al (2022). Disuse-associated loss of the protease LONP1 in muscle impairs mitochondrial function and causes reduced skeletal muscle mass and strength. *Nat Commun* 13(1).
48. Li Can, Li Nan, Zhang Yong. (2018). UPRmt and mitophagy are selectively activated depending on muscle fiber types in insulin resistant rats. *Exercise Biochemistry Review.*
49. Lee H, Ha TY, Jung CH, Sukma Nirmala F, Park S-Y, Huh YH, et al (2021). Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle contributes to the development of acute insulin resistance in mice. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2021;12: 1925–1939
50. Urbina-Varela R, Castillo N, Videla LA, Del Campo A. (2020). Molecular Sciences Impact of Mitophagy and Mitochondrial Unfolded Protein Response as New Adaptive Mechanisms

Underlying Old Pathologies: Sarcopenia and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7704):27.

51. Deldicque L, D. Cani, P, Philp A, et al. (2010). The unfolded protein response is activated in skeletal muscle by high-fat feeding: potential role in the downregulation of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E695–E705.
52. Livak Kenneth, Schmittgen Thomas D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25(4): 402-408.

## Anexo

### 1. Certificado -Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)



Santiago, 22 de diciembre de 2020

Certificado N°: 20431 – INT – UCH

#### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo PT-2020-RT-AdC del Proyecto de Investigación titulado *"Morfología mitocondrial como regulador de sarcopenia a través del mecanismo de respuesta a proteínas mal plegadas mitocondrial"* de los Investigadores Dra. Andrea del Campo, Profesora Asistente, Pontificia Universidad Católica de Chile y de Francisco Diaz, Asistente de Investigación, Licenciado en Educación Física, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile, ambos patrocinados por el Académico Dr. Rodrigo Troncoso, Profesor Asociado, INTA, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas 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.


Los Investigadores se han 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 111 ratones, especie *Mus musculus*, de la cepa C57Bl/6, provenientes del Instituto de Salud Pública, desde enero del 2021 a septiembre del 2022, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto FONDECYT de Iniciación N° 11190756.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (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 las investigadoras 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  
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>  
email: [coordinador.cicua@uchile.cl](mailto:coordinador.cicua@uchile.cl)

