



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DEL AGONISTA L165 DE PPAR $\beta/\delta$  Y  
AICAR EN LA DIFERENCIACIÓN MUSCULAR EN  
LA LÍNEA CELULAR I28 DE MIOBLASTOS DE  
RATÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**ROSALBA NAVA GUERRERO**

**Director de Tesis:**

**Dr. Armando Shimada Miyasaka**

**Comité Tutorial:**

**Dra. Ofelia Mora Izaguirre**

**Dra. Ma. Teresa Viana Castrillón**

**Cuautitlán, Izcalli**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Dedicó esta tesis a mis hijos, por ser la razón de mis esfuerzos, el motivo de querer ser una mejor persona para poder darles un ejemplo.

A mis padres por su apoyo en todos los momentos que los he necesitado.

A mi suegra por su ayuda.

A mi pareja por ayudarme a finalizar este reto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Ma. Teresa Viana Castrillón, por su confianza, ayuda y sugerencias a lo largo de mi tesis.

Al Dr. Armando Shimada Miyasaka, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar mis estudios, además de ser un gran profesor.

A la Dra. Ofelia Mora Izaguirre por darme la oportunidad de aprender, por ser mi maestra, mi guía y mi amiga. Por su paciencia y sus constantes asesorías.

A la M en C. Laura González Dávalos por darme clases, por enseñarme las técnicas necesarias para la realización de esta tesis. Por la paciencia y amistad que me brinda.

A los miembros del H. Jurado: Dra. Anaid Antamirán Salas, Dr. Felipe Ruiz López, Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortes, y Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por sus correcciones y sugerencias durante la revisión de la tesis.

A la Dra. Elisa Tamariz Domínguez, por su asesoría técnica.

Al Dr. Ricardo Miledi y Dau del INB de la UNAM, por contribuir con la línea celular i28.

A la IQB. Ma. Lourdes Palma Tirado de la Unidad de Microscopía del INB por sus servicios.

A la M en C. Adriana González Gallardo, por su ayuda y asesorías técnicas.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por su apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio del INB por brindarme su ayuda, paciencia y compañía.

A todos mis maestros de la maestría, a los cuales les debo mi formación.

A mi familia por su apoyo, comprensión y cariño.

A las siguientes instituciones por su apoyo:

- A la facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Al Laboratorio de Ruménología y Metabolismo Nutricional (RuMeN).
- Al Laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis en el Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Autónoma de México (UNAM).
- A la Unidad de Proteogenómica del INB de la UNAM.

## RESUMEN

El músculo esquelético se caracteriza por su gran plasticidad, ya que dependiendo del estado en el que se encuentra el organismo, este debe de cambiar de sustrato como fuente de combustible. Cuando se encuentra en un estado de ayuno su principal combustible son los ácidos grasos y cuando se alimenta, su principal sustrato es la glucosa.

Existe un mayor número de investigaciones sobre el efecto de AICAR y L165 en el metabolismo del músculo esquelético, sin embargo hay un menor número acerca de su determinación y formación, por lo que en este estudio se midió el efecto de los tratamientos de AICAR y L165 en la diferenciación muscular, seleccionando al factor miogénico miogenina como marcador clave de la miogénesis, donde se observó que ambos tratamientos: AICAR y L165 tuvieron un efecto a las 72hrs. El agonista selectivo del receptor PPAR $\beta/\delta$  L165 a una concentración de 10  $\mu$ M incrementó 4.3 veces la expresión del RNAm de miogenina contra el grupo control con una diferencia estadística de  $P=0.05$ , mientras que AICAR a una concentración de 100 $\mu$ M aumentó 3.6 veces la expresión del RNAm de miogenina con una  $P=0.05$ . Estos resultados permiten concluir que ambos tratamientos tienen un efecto en la diferenciación muscular, al incrementar la expresión del RNAm de un marcador clave en la miogénesis como lo es miogenina, sin embargo es necesario realizar más estudios para conocer los mecanismos. Además de investigar si este incremento en el RNAm de miogenina, promueve un aumento en la masa muscular en animales productores de carne.

## **ABSTRACT**

The skeletal muscle is characterized by its great plasticity since, depending on the organism state the muscle has to change the substrate as a combustible source.

When this muscle is in a fasting state, fatty acid is its main combustible source, while once it has been feed, source changes to glucose.

There is a larger number of investigations about AICAR and L165 effects on the skeletal muscle metabolism, however, there is a smaller number about its determination and formation; that is the reason why in this study, the effect of AICAR and L165 treatments was measured on the muscle differentiation, selecting the myogenic factor myogenina as a key indicator of myogenesis, where it was observed that both treatments, AICAR and L165 had an effect after 72 hours.

The selective agonist of the receptor  $PPAR\beta/\delta$  L165 on a 10Mm concentration , increased on 4.3 times the expression of the myogenina RNAm against the control group, with a statistical difference of  $P=0.05$ , while the AICAR increased on 3.6 times the expression of the myogeninas RNAm on a concentration of 100mM.

These results allow us to conclude that both treatments have an effect in the muscular differentiation, when increasing the expression of the RNAm of a key myogenesis indicator such as myogenina. However, further research is necessary in order to find the mechanisms. It is also necessary to investigate if this increase on the myogenina RNAm promotes a muscular mass increase on meat producer animals.

# ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción   | 11 |
| 1.1 Generalidades   | 11 |
| 1.2 Músculo esquelético   | 12 |
| 1.3 Tipos de fibras musculares                                      | 13 |
| 1.4 Diferenciación muscular   | 14 |
| 1.5 Miogénesis embrionaria  | 15 |
| 1.6 Factores reguladores miogénicos                                 | 15 |
| 1.7 Receptores nucleares  | 17 |
| 1.8 Generalidades de los PPAR's                                     | 18 |
| 1.9 Selectividad de los PPAR's                                      | 20 |
| 1.10 Especificidad de acción de los PPAR's                          | 21 |
| 1.11 Control nutricional de la expresión y activación de los PPAR's | 23 |
| 1.12 Correguladores   | 23 |
| 1.13 Adaptación de los PPAR's a la privación de nutrientes          | 24 |
| 1.14 Agonista L165  | 25 |
| 1.15 AICAR  | 26 |
| 2. Antecedentes   | 30 |
| 3. Hipótesis  | 32 |
| 4. Objetivo general   | 32 |
| 5. Objetivos particulares   | 32 |
| 6. Materiales y métodos   | 33 |
| 6.1 Medios y soluciones   | 33 |
| 6.2 Cultivo celular de la línea i28                                 | 34 |

|   |    |
|---|----|
| 6.3 Expresión de pax7 y miogenina por inmunocitoquímica   | 35 |
| 6.4 Expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$ en la línea celular i28   | 37 |
| 6.5 Dosis óptima para AICAR y L165  | 42 |
| 6.6 Efecto de AICAR y L165 en la expresión del RNAm de miogenina  | 43 |
| 6.7 Efecto de AICAR y L165 en la expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$  | 46 |
| 6.8 Efecto de AICAR y L165 en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  | 47 |
| <br>  |    |
| 7. Resultados   | 49 |
| 7.1 Curva de expresión de la proteína pax7 y miogenina a través de una curva de tiempo                            | 49 |
| 7.2 Validación del gen endógeno MnSOD y miogenina   | 57 |
| 7.3 Determinar la dosis óptima de L165 y AICAR  | 58 |
| 7.4 Medir el efecto de 165 y AICAR en la expresión del RNAm de miogenina en mioblastos de la línea i28            | 60 |
| 7.5 Validación del gen endógeno MnSOD y PGC1 $\alpha$   | 61 |
| 7.6 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$  | 62 |
| 7.7 Validación del gen endógeno MnSOD y PPAR $\beta/\delta$   | 63 |
| 7.8 Medir el efecto de L165 y AICAR en la expresión del ARNm de PPAR $\beta/\delta$ en mioblastos de la línea i28 | 64 |
| <br>  |    |
| 8. Discusión  | 65 |
| 8.1 Curva de expresión de las proteínas pax7 y miogenina  | 65 |
| 8.2 Efecto de L165  | 66 |
| 8.3 Efecto de AICAR   | 68 |
| 8.4 Mecanismo de acción de "AICAR y L165"   | 69 |
| <br>  |    |
| 9. Conclusiones   | 71 |
| <br>  |    |
| 10. Recomendaciones   | 72 |
| 11. Referencias   | 72 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig.1 Gráfica de la balanza comercial de productos cárnicos en México de 1995 a 2008. (ANETIF, 2011) <a href="http://www.anetif.org">www. anetif.org</a> .                     | 11 |
| Fig.2 Clasificación del tipo de fibras musculares por sus características físicas y metabólicas. <a href="http://www.virtual.unal.edu.com">http://www.virtual.unal.edu.com</a> | 14 |
| Fig.3 Diagrama del proceso de diferenciación muscular (Hettmer y Wagers, 2010).  | 16 |
| Fig. 4 Clasificación de los receptores nucleares.  | 18 |
| Fig.5 Dominios funcionales de PPAR.  | 20 |
| Fig.6 Distribución de los PPAR's en los principales órganos involucrados en el metabolismo energético (Moreno et al., 2010).   | 22 |
| Fig.7 Estructura química de L165.  | 25 |
| Fig.8 Planteamiento del efecto de L165 en la transactivación del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$ .  | 26 |
| Fig.9 Estructura química de AICAR.   | 26 |
| Fig.10 Planteamiento del efecto de AICAR <i>in vivo</i> en diferentes órganos y tejidos (Rutter et al., 2003).   | 28 |
| Fig.11 Ensayo de dosis-respuesta de L165.  | 29 |
| Fig.12 Ensayo de dosis-respuesta de AICAR.   | 42 |
| Fig.13 Ensayo de dosis-respuesta de AICAR.   | 43 |
| Fig.14 Dosis utilizadas de los tratamientos: AICAR, L165 y AICAR+L165.   | 43 |
| Fig.15 Fotos del día -2 con medio de crecimiento y 5X10 <sup>4</sup> células por pozo.   | 50 |
| Fig.16 Fotos del día cero con medio de diferenciación y 5X10 <sup>4</sup> células por pozo.  | 51 |
| Fig.17 Fotos del día 2 con medio de diferenciación y 25x10 <sup>3</sup> células por pozo.  | 52 |

|  |    |
|--|----|
| Fig.18 Fotos del día 4 con medio de diferenciación y $1 \times 10^4$ células por pozo.   | 53 |
| Fig.19 Fotos del día 6 con medio de diferenciación y $1 \times 10^4$ células por pozo.   | 54 |
| Fig. 20 Fotos del día 8 con medio de diferenciación y $5 \times 10^4$ células por pozo.  | 55 |
| Fig.21 Curva de expresión de la proteína Pax7 en la línea celular i28 de mioblastos de ratón de los días -2 al 8. El cultivo de las células del día -2 y -1 fue con medio de crecimiento y del día 0 al día 8 con medio de diferenciación.                   | 56 |
| Fig.22 Curva de expresión de la proteína miogenina en la línea celular i28 de mioblastos de ratón de los días -2 a 8. El cultivo de las células del día -2 y -1 fue con medio de crecimiento y del día 0 al día 8 con medio de diferenciación.               | 57 |
| Fig.23 Validación del gen endógeno MnSOD y miogenina en la línea celular i28.  | 58 |
| Fig. 24 La dosis óptima para el tratamiento L165 fue de $10 \mu\text{M}$ , por su incremento en la expresión del RNAm de miogenina en comparación con el grupo control y la concentración de $20 \mu\text{M}$ del mismo tratamiento con una $P \leq 0.001$ . | 59 |
| Fig.25 Efecto de AICAR en la expresión del RNAm de miogenina, donde no se observa una diferencia estadística a las concentraciones de $50 \mu\text{M}$ , $100 \mu\text{M}$ y $200 \mu\text{M}$ .   | 60 |
| Fig.26 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de miogenina en la línea celular i28.   | 61 |
| Fig.27 Validación del gen endógeno MnSOD vs PGC1 $\alpha$ en la línea celular i28.   | 62 |
| Fig. 28 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$ a las 72hrs.  | 63 |

|  |    |
|--|----|
| Fig.29 Validación del gen endógeno MnSOD vs PPAR $\beta/\delta$ en la línea celular i28.   | 64 |
| Fig.30 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$ a las 72hrs.   | 65 |
| Fig.31 Efecto de L165 a 10 $\mu$ M en el aumento de la expresión del RNAm de miogenina y PGC1 $\alpha$ , en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.   | 68 |
| Fig.32 Efecto de AICAR a 100 $\mu$ M en el aumento de la expresión del RNAm de miogenina, en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.  | 69 |
| Fig.33 Efecto de "AICAR + L165" a 100 $\mu$ M y 10 $\mu$ M respectivamente en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$ , miogenina y PGC1 $\alpha$ , en la línea celular i28 de mioblastos de ratón. | 70 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro I.- Especificidad de acción de los subtipos de PPAR                                 | 21 |
| Cuadro II. Densidad de siembra para la curva de expresión de la proteína Pax7 y miogenina. | 36 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES

Actualmente México se encuentra en una balanza comercial negativa en la producción de carne, como se muestra en la Fig.1 donde las importaciones superan en gran medida a las exportaciones.

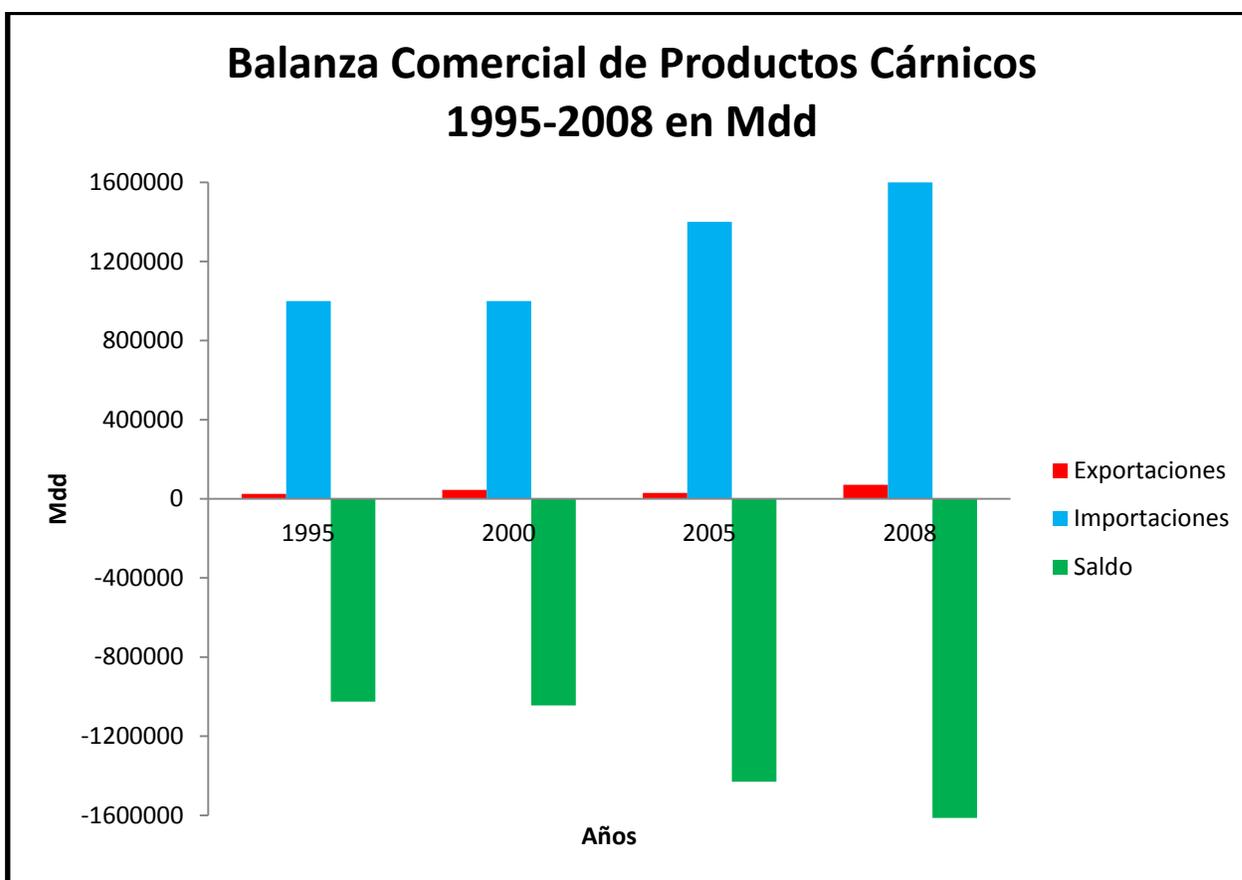


Fig.1 Gráfica de la balanza comercial de productos cárnicos en México de 1995 a 2008. (ANETIF, 2011) [www.anetif.org](http://www.anetif.org).

Una de las alternativas para disminuir dichas importaciones es aplicar y desarrollar nuevas tecnologías que permitan hacer eficiente la producción de carne como son: la elaboración de alimentos balanceados con mejores índices de conversión alimenticia, el desarrollo de especies transgénicas, uso de subproductos de la industria alimentaria que permitan bajar costos y la aplicación de fármacos que promuevan un aumento en el desarrollo de la masa muscular.

## **1.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Debido a lo anterior este trabajo de investigación pretende contribuir en el estudio del efecto de los fármacos L165 y AICAR *in vitro*, para en un futuro poderse suministrar a animales productores de carne de tal forma que les permita tener un mayor número de células musculares y/o hipertrofiadas lo que podrá promover un aumento en la masa muscular y por lo tanto en una mejor canal.

Este estudio se realizará con la línea celular i28 de mioblastos de ratón como modelo, derivado del cultivo primario de mioblastos del músculo cuádriceps de ratón macho, de siete días de edad después de la expansión de más de dos a seis pasajes.

Debido a su gran volumen, el metabolismo del músculo esquelético afecta a todo el organismo, ya que constituye el 50% de la masa total del organismo, por lo que es el órgano más grande del cuerpo. Es el lugar donde existe una mayor oxidación de ácidos grasos (Rennie et al., 2004). El requerimiento energético del músculo esquelético es muy variable, ya que el trabajo de contracción muscular consume grandes cantidades de ATP. El músculo esquelético está bajo el control hormonal, cuando se encuentra en estado basal (ayuno y descanso) cerca del 80% de la glucosa en sangre es metabolizada de manera independiente a la insulina (por el cerebro, intestinos y glóbulos rojos) en donde los tejidos sensibles a insulina (músculo esquelético y tejido

adiposo) sólo requieren pequeñas cantidades (De Lange et al., 2007). Sin embargo, después de la estimulación de la insulina, el músculo esquelético utiliza hasta un 75% de la glucosa (Fluck et al., 2003).

### **1.3 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES**

El músculo esquelético está tradicionalmente clasificado por su apariencia física (en roja o blanca), o por sus características contráctiles (lenta o rápida) (Spangenburg y Booth, 2003). La velocidad de movimiento del músculo depende principalmente de la isoforma de la cadena pesada de miosina (MHC) (del inglés myosin heavy chain) que se expresa (Harridge, 2007).

Se conocen principalmente cuatro tipos de fibras musculares, las tipo I son las lentas de color rojo, que poseen un gran número de mitocondrias y prefieren como combustible a los ácidos grasos sobre la glucosa. Los tipos de fibra muscular IIa, IIx y IIb tienen una mayor capacidad por la utilización de la glucosa, con una mayor velocidad contráctil y un menor contenido mitocondrial (Fig.2).

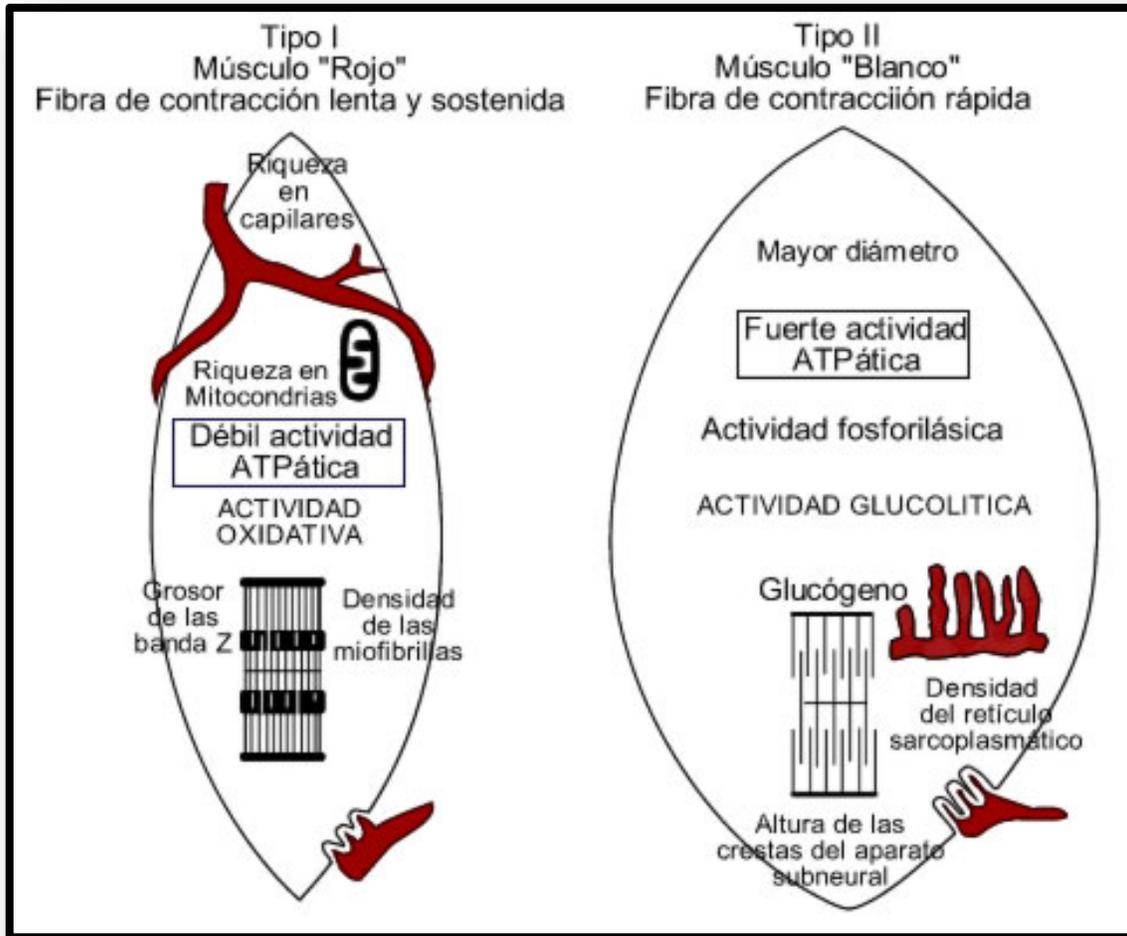


Fig.2 Clasificación del tipo de fibras musculares por sus características físicas y metabólicas. <http://www.virtual.unal.edu.com>

#### 1.4 DIFERENCIACIÓN MUSCULAR

La diferenciación muscular es una etapa en la formación y determinación de las fibras musculares, conocida como **miogénesis** (Dodson et al.,2010). Este proceso sucede durante el desarrollo embrionario y posteriormente en el músculo maduro se activa para su formación, mantenimiento y reparación; en el caso de sufrir una lesión el músculo tiene una respuesta inicial de proliferación que se da como respuesta a la señalización de los IGF´s (factores de crecimiento insulínicos) y

produce hipertrofia (Shavlakadze et al., 2010). Durante la etapa de crecimiento la activación de síntesis de proteína va acompañada por la tasa de recambio celular, en donde las células satélite son involucradas en el crecimiento de nuevas fibras musculares, en el adulto esta tasa de recambio es reducida drásticamente

### **1.5 MIOGÉNESIS EMBRIONARIA**

Durante el desarrollo embrionario la miogénesis puede subdividirse en varias etapas: en la **primera etapa** las células se determinan por inducción de las células del dermomiótomo del somita dorsal que se encuentra debajo del ectodermo, en esta región se determinan las células que serán los futuros mioblastos de dos poblaciones una epiaxial y una hipoaxial (Buckingham, 2001).

En la **segunda etapa** los mioblastos ya formados pueden dividirse, proliferar o migrar. Dependiendo la señalización de los diferentes factores miogénicos (Costa et al., 2010).

En la **tercera etapa**, aumentan los niveles de las N-Cadherinas y las integrinas. La proliferación se detiene, los mioblastos se agregan y algunos se diferencian en miocitos maduros y otros quedan inactivos en lo que serán las células satélite en el músculo esquelético maduro (Lu y Krauss, 2010).

La determinación del tipo de fibra muscular sucede en una **cuarta etapa**, la fibra muscular tipo II, es la formación predeterminada, y la tipo I es una variación del tipo II (Perry y Rudnick, 2000).

### **1.6 FACTORES REGULADORES MIOGÉNICOS**

La determinación y formación de fibras musculares está controlada por los factores reguladores miogénicos. El músculo maduro formado por miles de miofibrillas, contiene miotubos multinucleados. Estos miotubos contienen células progenitoras conocidas como células satelitales las

cuales expresan los factores reguladores miogénicos Pax3 y Pax7, que al iniciar la diferenciación muscular disminuyen su expresión (Lepper y Fan, 2010), mientras que aumenta la expresión de otros factores miogénicos ( Mif5, MioD, Miog y Mif6;) los cuales regulan el balance entre la proliferación y diferenciación de las células musculares, Los factores miogénicos que promueven la formación del músculo maduro son MioD, Mif6 y Miog (Yokoyama y Asahara, 2011) (Fig.3).

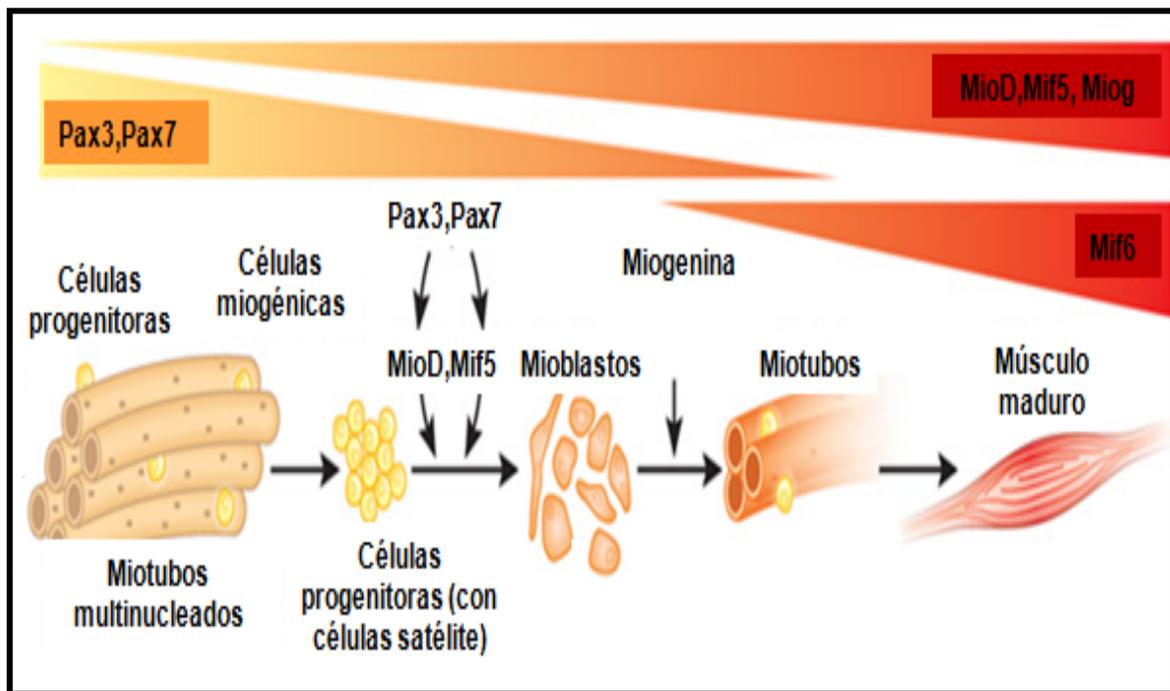


Fig.3 Diagrama del proceso de diferenciación muscular (Hettmer y Wagers, 2010).

En este trabajo de investigación se seleccionó al factor miogénico miogenina como el marcador de la miogénesis, ya que este factor está involucrado en varias de las etapas de la miogénesis como en la fusión de los mioblastos en miotubos y en la formación del músculo maduro.

## 1.7 RECEPTORES NUCLEARES

El compuesto L165 es un derivado del ácido fenoxiacético, el cual es un agonista selectivo del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$ , los receptores nucleares (NR's, del inglés nuclear receptors), son miembros de la superfamilia de receptores huérfanos y receptores activados por ligandos, cuya función radica en regular la expresión de genes como respuesta a estímulos nutricionales y fisiológicos. Los NR's son divididos en dos diferentes clases: la primera, constituye a los receptores de hormonas que unen de manera específica a hormonas, como glucocorticoides, hormonas tiroideas y estrógenos. La segunda clase de los NR's son los que funcionan como sensores metabólicos, uniendo substratos y productos finales de vías metabólicas como los lípidos y ácidos grasos. Siendo algunos ejemplos de estos los PPAR's (receptores activados por proliferadores peroxisomales), LXR's (liver X receptor, receptores X del hígado) y BAR (receptor de ácido biliar), todos estos receptores forman heterodímeros con RXR (receptor X de retinoide), y su función es regular la homeostasis de la glucosa y lípidos en respuesta a estímulos nutricionales y fisiológicos (Kota et al., 2004). (Fig.4)

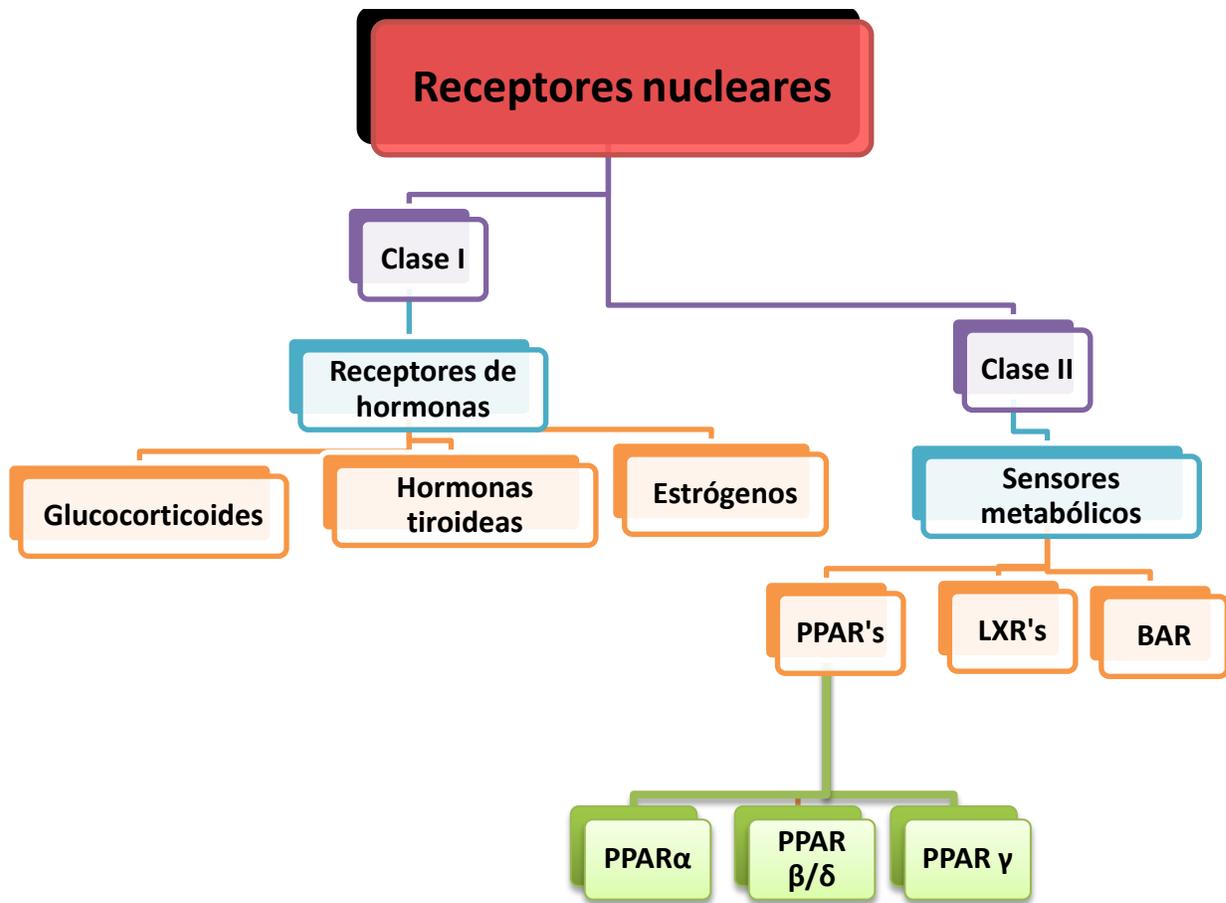


Fig. 4 Clasificación de los receptores nucleares.

### 1.8 GENERALIDADES DE LOS PPAR'S

Los PPAR's (receptores activados por proliferadores peroxisomales, por sus siglas en inglés) son proteínas de un tamaño aproximado de 56 kD que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares. Se conocen 3 subtipos de PPAR, denominadas "α", "β/δ" y "γ" (Germain et al., 2006). Los tres subtipos son codificados por diferentes genes localizados en diferentes cromosomas (Bugge y Mandrup, 2010). Los PPAR's se activan al unirse con su ligando, lo cual promueve un cambio en su conformación para formar heterodímeros, que generalmente son con el factor X de retinoide (RXR), una vez formado el heterodímero se reclutan los coactivadores, donde PGC1α, es uno de los principales (Moreno et al., 2010).

Los tres subtipos de PPAR pueden ser activados por una gran variedad de ácidos grasos y metabolitos de ácidos grasos, como eicosanoides hidrolizados y un gran número de compuestos sintéticos (Schug et al., Gervois et al., 2007) PPAR $\alpha$  es activado específicamente por fibratos y PPAR $\gamma$  por fármacos antidiabéticos y sensibilizadores a la insulina como las tiazolidinedionas (Bugge y Mandrup, 2010).

Debido a las funciones específicas de los PPAR's, PPAR $\alpha$  y PPAR $\beta/\delta$  son altamente expresadas en tejidos con altos índices de  $\beta$ -oxidación como el hígado, músculo, corazón y tejido adiposo café. En contraste PPAR $\gamma$  es mayormente expresado en el tejido graso (Yessoufou y Wahli, 2010).

Como la mayoría de los receptores nucleares (NR's), la estructura de las proteínas de los PPAR'S consiste en cuatro dominios: el dominio **A/B** N-terminal el cual contiene la función de activación independiente al ligando 1 por sus siglas en inglés activation function se abrevia (AF-1), el dominio **C** es el dominio (DBD) del inglés DNA-binding domain, donde el receptor se une al DNA, el dominio **D**, también conocido como la región de anillo o bisagra, el dominio **E** comúnmente referido como el dominio de unión al ligando (LBD) del inglés ligand binding domain. El dominio **E** contiene el grupo funcional de activación dependiente de ligando 2 (AF-2). Mientras los dominios **A/B** y **D** son muy poco conservados entre los tres subtipos de PPAR (" $\alpha$ ", " $\beta/\delta$ " y " $\gamma$ "), los dominios **C** y **E** tienen secuencias similares y estructuras más homólogas. De hecho el dominio **C** es completamente intercambiable entre los subtipos de PPAR por lo que este dominio no tiene efecto en la especificidad de cada subtipo (Calber y Seuter, 2010) (Fig.5).

Para que los PPAR's se unan al elemento de respuesta del DNA (ácido desoxirribonucleico) es necesario que formen heterodímeros con la

familia del receptor X de retinoide (RXR), este elemento de respuesta es una repetición directa (DR1) con la secuencia consenso 5' AACTAGGNCA A AGGTCA 3' (Bugge y Mandrup, 2010).



Fig.5 Dominios funcionales de PPAR.

### 1.9 SELECTIVIDAD DE LOS PPAR's

Los PPAR's mantienen un alto grado de especificidad en cada subtipo cuando se agregan agonistas en niveles similares en una determinada línea celular. Esto indica que, aunque la conformación de la cromatina sea la que determina la accesibilidad a los elementos de respuesta de PPAR, existen propiedades intrínsecas en los subtipos de PPAR que son determinantes en la activación de genes (Bugge y Mandrup, 2010). Como lo es el sitio de unión al ligando de los PPAR's que es hidrofóbica y une una gran cantidad de diferentes ligandos con baja afinidad. El sitio de unión al ligando de PPAR $\beta/\delta$  es más estrecha que el de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y esto es un factor determinante en la afinidad por sus ligandos, que no permite la unión de las TZD (Tiazolidinedionas) y disminuye en gran medida la afinidad por los fibratos por su alto contenido de ácidos y grupos alquilo. PPAR $\alpha$ , contiene el sitio de unión de ligando más lipofílica, lo que podría explicar porque PPAR $\alpha$ , es opuesto a PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ , ya que se une a una gran variedad de ácidos grasos saturados.

### 1.10 ESPECIFICIDAD DE ACCIÓN DE LOS PPAR'S

Cada subtipo de PPAR tiene una función órgano/tejido específica, que se describe a continuación en la Tabla I (Yassoufou y Wahli, 2010).

|                       | <b>PPAR<math>\alpha</math></b>   | <b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>  | <b>PPAR<math>\gamma</math></b>   |
|-----------------------|--|---|--|
| <b>Hígado</b>         | ↑entrada de AG<br>↑oxidación de AG<br>↑HDL<br>apolipoproteínas<br>↓producción de VLDL                  | ↓producción de glucosa  | ↑lipogénesis<br>↑sensibilidad a la insulina                                |
| <b>Músculo</b>        | ↑ expresión PPAR $\alpha$<br>Cambio de consumo de glucosa por AG<br>↑entrada de AG<br>↑oxidación de AG | PPAR $\beta/\delta$ es el subtipo más expresado.<br>↑oxidación de AG<br>↑transporte de AG | ↑sensibilidad a insulina   |
| <b>Tejido Adiposo</b> | ↑lipólisis en ayuno  | ↑oxidación de AG<br>↑transporte de AG   | ↑diferenciación de adipocitos<br>↑ lipogénesis<br>↑sensibilidad a insulina |
| <b>Páncreas</b>       | ↑ oxidación de AG  | ↓secreción de insulina en roedores  | ¿?   |

Cuadro I.- Especificidad de acción de los subtipos de PPAR.

De los tres subtipos, PPAR $\beta/\delta$  es el más versátil, su rol principal es la regulación del uso del combustible entre los diferentes órganos y tejidos. Existe una comunicación cruzada entre los PPAR's, y se ha observado que PPAR $\beta/\delta$  no ligado reprime la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  (Moreno, et al 2010) (Fig.6)

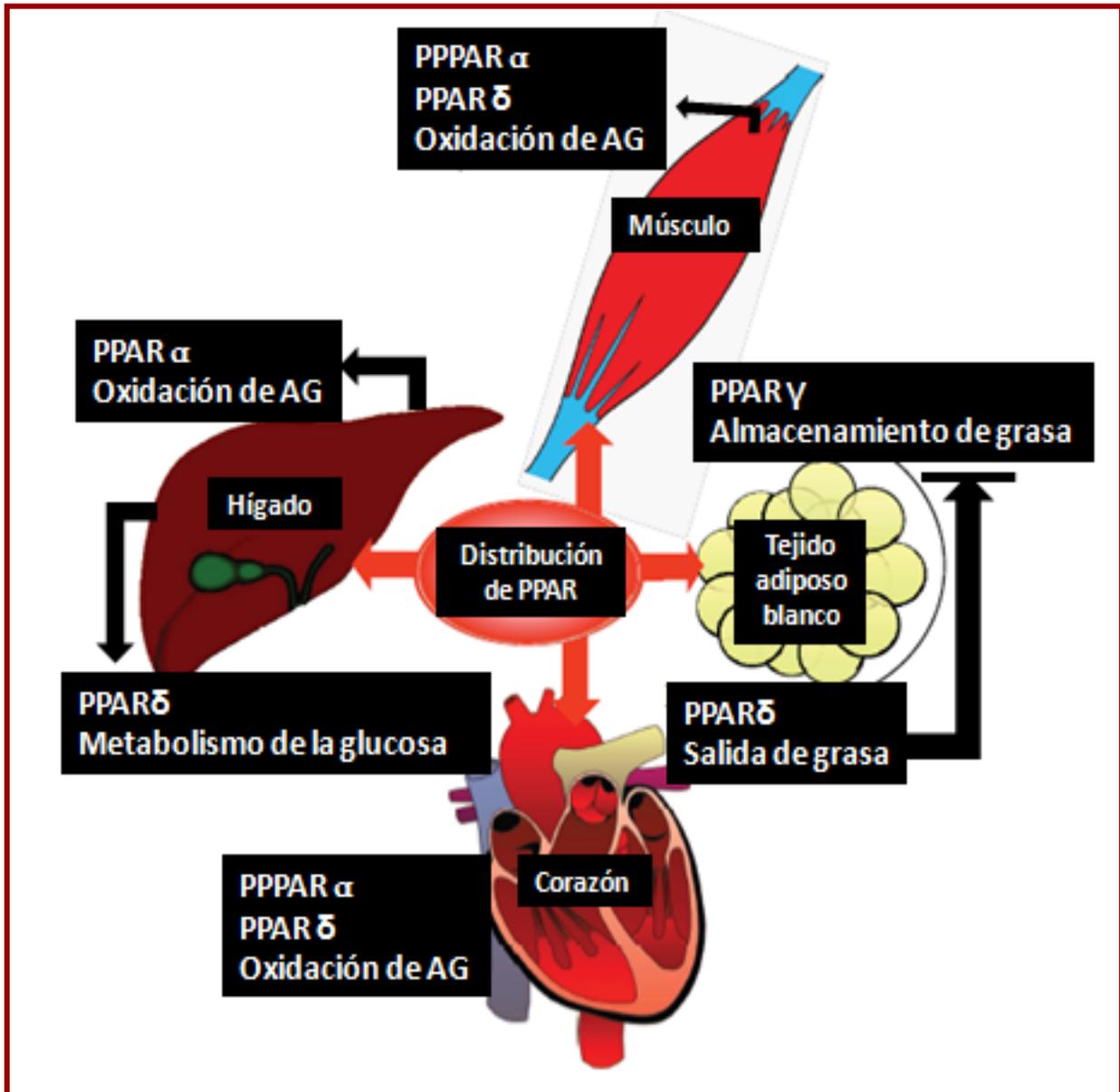


Fig.6 Distribución de los PPAR's en los principales órganos involucrados en el metabolismo energético (Moreno et al., 2010).

### **1.11 CONTROL NUTRICIONAL DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE LOS PPAR'S**

Se ha demostrado que la actividad de los PPAR's está controlada directamente por los nutrientes provenientes de la dieta, sus derivados y/o los derivados de ácidos grasos (AG) **durante la privación de alimentos, estos activan a los PPAR's por ser sus ligandos naturales.** Los PPAR's muestran una gran preferencia hacia los AG poliinsaturados y monoinsaturados (PUFA's MUFA's, respectivamente) (Moreno et al., 2010).

La unión de los ligandos promueve un cambio conformacional que permite la interacción con proteínas coactivadoras de manera específica en cada tejido, permitiendo la remodelación de los nucleosomas y la activación de la transcripción de genes específicos al tipo celular, es posible que la unión del ligando al LBD en los diferentes subtipos de PPAR den un cambio conformacional distinto, por lo que la actividad transcripcional inducida por este cambio sea específico al tipo celular (Moreno et al., 2010).

### **1.12 CORREGULADORES**

Los correguladores son proteínas que tienen un efecto en la transcripción de genes. Estos correguladores son llamados correpresores cuando suprimen y coactivadores cuando aumentan la transcripción de los genes blanco. También existen las asociaciones de coactivadores con otras proteínas que interactúan directamente con los coactivadores y no con los receptores nucleares. Se han identificado más de 200 correguladores de receptores nucleares entre coactivadores, correpresores y coactivadores-asociados con proteínas (Ehrenborg y Krook, 2009). La manera en que un corregulador selecciona de manera específica a un receptor nuclear no está totalmente claro (Feige y

Auwerx, 2007; Yu y Reddy 2007). Uno de los correguladores mejor descritos es PGC1 $\alpha$  (Liu and Lin, 2009).

### **1.13 ADAPTACIÓN DE LOS PPAR'S A LA PRIVACIÓN DE NUTRIENTES**

Los PPAR's son factores de transcripción nuclear, los cuales están involucrados en la regulación del metabolismo del organismo, principalmente el de los lípidos y de la glucosa. Por ejemplo una situación de ayuno incrementa la señalización de PPAR $\alpha$  en el hígado, a través del aumento de los niveles del coactivador PGC-1 $\alpha$ , el cual está relacionado en la regulación de la gluconeogénesis hepática y oxidación de AG. (Sanderson et al., 2009).

Mientras que PPAR $\beta/\delta$  juega un papel muy importante en el control de la utilización de lípidos en el músculo esquelético, por lo que una situación de ayuno en la que existe una gran dependencia por los AG, resulta en un aumento del nivel de RNAm de PPAR $\beta/\delta$ ; esto se observó en el músculo gastrocnemio de rata (De Lange et al., 2006). En el músculo esquelético, PPAR $\beta/\delta$  y PGC-1 $\alpha$  interactúan físicamente dentro del núcleo y esta interacción puede aumentar la expresión de algunos genes como: la cadena pesada de miosina I (MHC I), tioesterasa I (MTE I) (Stavinoha et al., 2004), carnitina palmitoil transferasa I (CPT1) y la proteína desacopladora 3 (UCP 3), los cuales son genes clave como reguladores para el cambio del tipo de fibra muscular y el metabolismo de AG.

### 1.14 AGONISTA L165

El compuesto L165 es un agonista selectivo de PPAR $\beta/\delta$ , el cuál es un derivado del ácido graso Fenoxiacético, su fórmula molecular es: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>, su peso molecular es de 402.44 y su estructura química es como se muestra en la fig.7

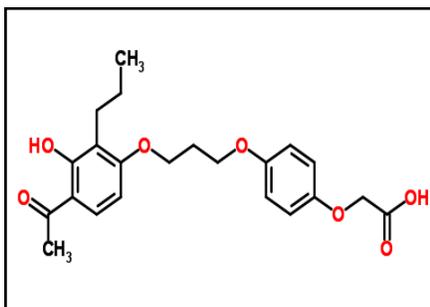


Fig.7 Estructura química de L165.

El efecto de L165 en la transactivación de miogenina es como se muestra en la fig.8; donde se inicia con el transporte de L165 por medio de la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5) al núcleo, donde se une al dominio de unión al ligando del receptor PPAR $\beta/\delta$ , formando un heterodímero con RXR y reclutando las proteínas coactivadoras promoviendo así la transactivación del gen Miogenina y aumentando la expresión de RNAm (Kota et al., 2004).

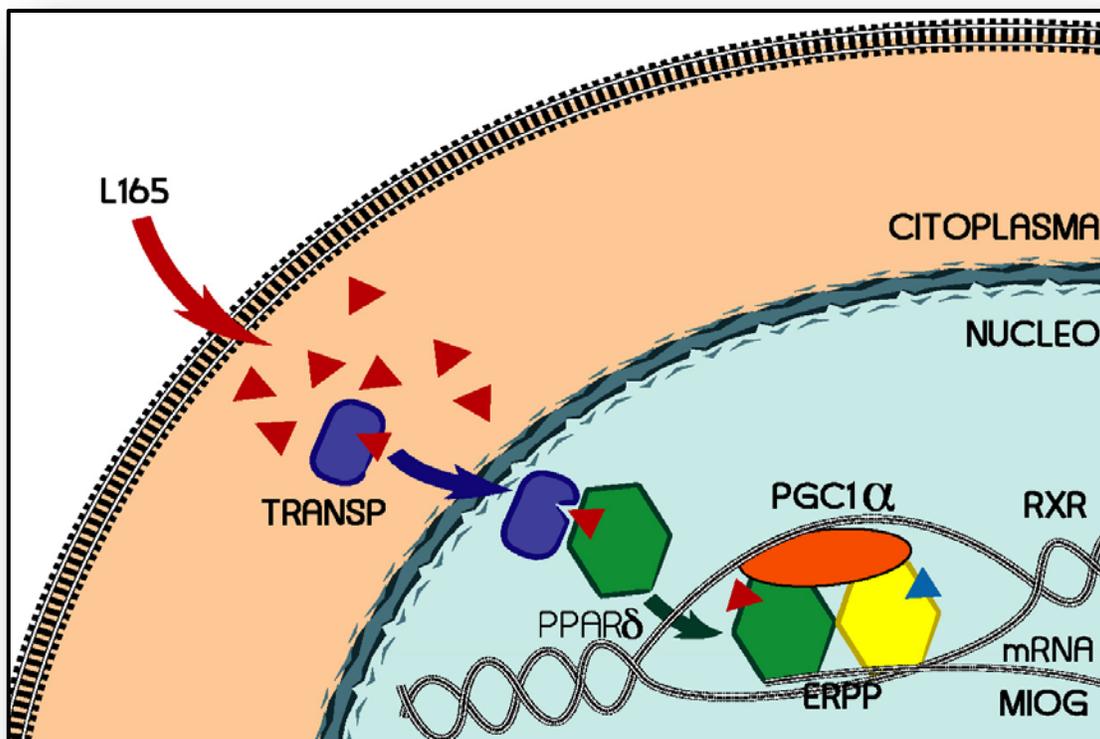


Fig.8 Planteamiento del efecto de L165 en la transactivación del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$ .

### 1.15 AICAR

Aicar es un activador de AMPK (adenosina monofosfato proteína cinasa). Su nombre es 5-Aminoimidazol-4-carboxamida, 1- $\beta$ -D-ribofuranosida, Acadesina, N<sup>1</sup>-( $\beta$ -D-Ribofuranosil)-5-aminoimidazol-4-carboxamida. Su fórmula molecular es C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> y su peso molecular 255.23. Su estructura química se observa en la fig.9.

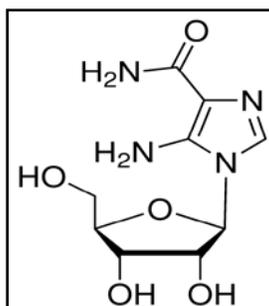


Fig.9 Estructura química de AICAR.

AMPK es un regulador metabólico importante que se activa en situaciones de baja disponibilidad de energía por los altos niveles celulares del ratio AMP: ATP. *In vivo* la activación farmacológica de AMPK con AICAR mimetiza al ejercicio, desencadenando la entrada de glucosa al músculo esquelético (Giri et al., 2004).

En la fig.10 podemos observar los diferentes efectos de AICAR *in vivo*. En el **músculo esquelético** (1) AICAR estimula el consumo de glucosa a través del transportador de glucosa 4 (Glut4); en el **hígado** (2) se inhibe la salida de glucosa y síntesis de triacilglicerol; en el **tejido adiposo** (3) se inhibe el consumo de glucosa y la lipólisis; en el **páncreas** (4) suprime de manera aguda la liberación de insulina de los islotes pancreáticos y en el **hipotálamo** (5) puede estimularse el apetito (Rutter et al., 2003).

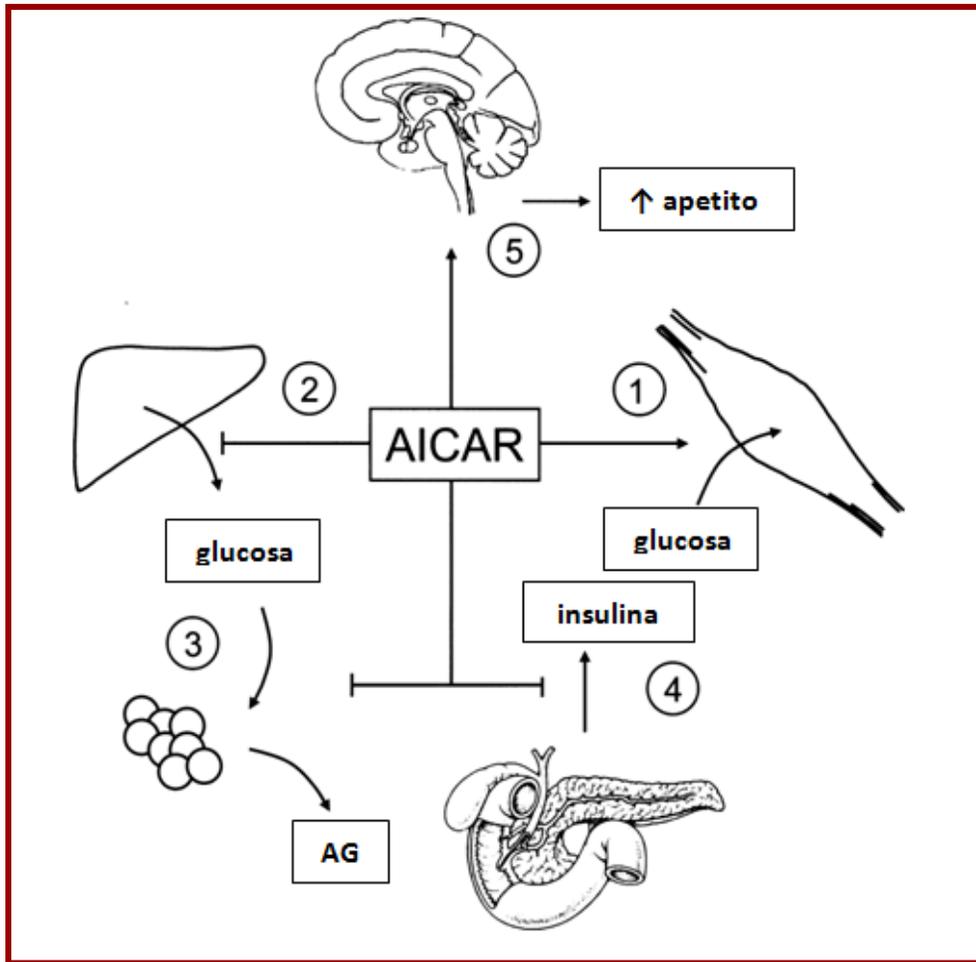


Fig.10 Efecto de AICAR *in vivo* en diferentes órganos y tejidos (Rutter et al., 2003).

Uno de los efectos de AICAR sobre la expresión del RNAm de miogenina podría ser por la vía de de p38MAPK al ser un sensor metabólico de estrés, AICAR atraviesa la membrana y en el citoplasma activa a p38MAPK, el cuál fosforila al factor de transcripción MEF2, transcribiendo RNAm de miogenina entre otros (fig.11) (Gundersen et al., 2010).

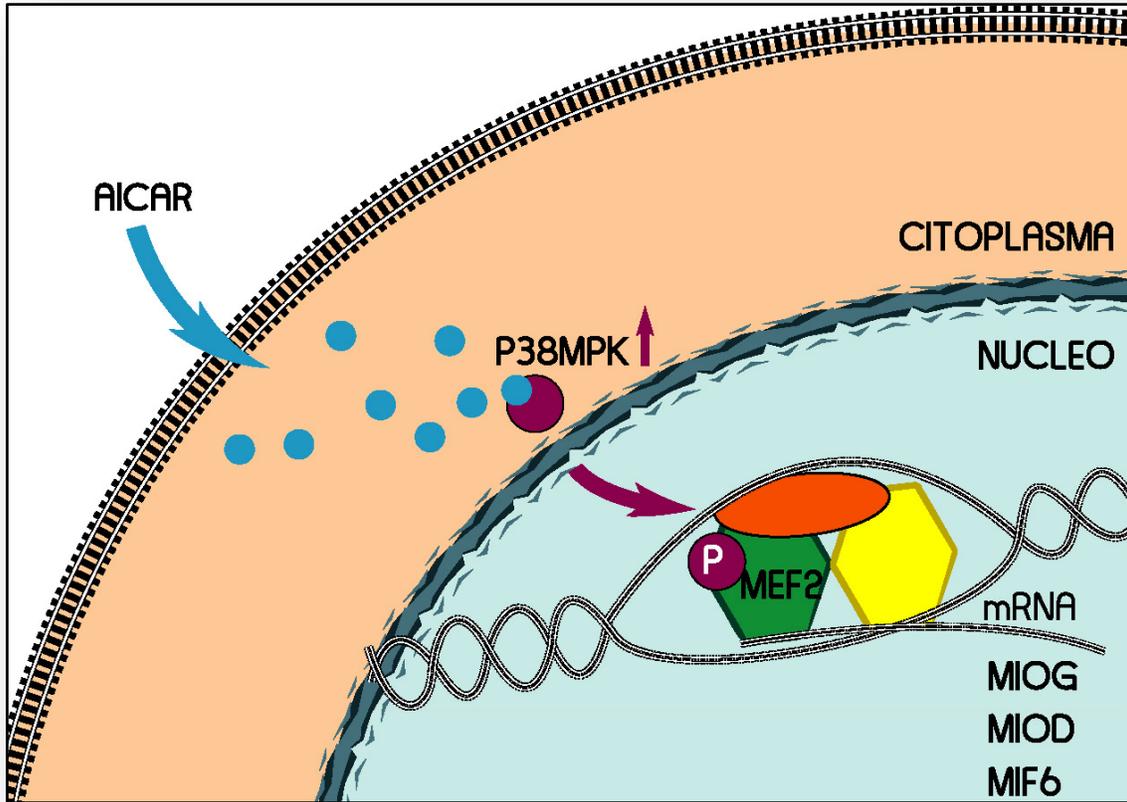


Fig. 11 Planteamiento del efecto de AICAR en el RNAm de miogenina, por la activación de p38MAPK.

## 2. ANTECEDENTES

Existe un mayor número de investigaciones sobre el efecto de AICAR y L165 en el metabolismo del músculo esquelético (Jucker et al., 2007; Krämer et al., 2007; Sprecher et al., 2007; Narkar et al., 2008; Risérus et al., 2008 y Kleiner et al., 2009), sin embargo hay un menor número de estudios acerca de su determinación y formación (Gaudel et al., 2008, Park et al., 2009).

El músculo esquelético tiene una gran capacidad de adaptarse a diferentes sustratos metabólicos dependiendo del estado en el que se encuentra el organismo. Cuando el organismo está en ayuno; el músculo esquelético se adapta para utilizar como sustrato a los lípidos sobre la glucosa, esto se debe a que al activarse AMPK, promueve un aumento en los niveles de ácidos grasos y un aumento en su captación por la mitocondria como combustible (Wessel et al., 2010).

El aumento celular del ratio AMP/ATP inducido por el ayuno, en el músculo esquelético, activa a AMPK, el cual inicia un rápido proceso de señalización, resultando en el reclutamiento de factores estructurales y metabólicos que realizan el cambio del uso de combustible. Estos factores incluyen a PGC1 $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , y sus genes blancos los cuales están envueltos en la formación de la fibra muscular oxidativa. Los AG además de empezar a ser el combustible oxidativo para la mitocondria, son identificados como moléculas de señalización que regulan la transcripción y/o la actividad de los genes o productos de los genes envueltos en el metabolismo de los AG durante la privación de los alimentos (De Lange et al., 2007).

Ensayos de expresión han revelado que las alteraciones ocurridas en los niveles del RNAm del músculo esquelético durante la privación de alimentos son consistentes con la supresión de las rutas anabólicas y la activación de las rutas catabólicas involucradas en la salida de glucosa y oxidación de AG, estos eventos restauran los niveles intracelulares del ATP (Pilegaard et al., 2003).

### **3. HIPÓTESIS**

1. El agonista selectivo de PPAR $\beta/\delta$  L165, afectará la expresión del RNAm de: miogenina, PPAR $\beta/\delta$  y PGC1 $\alpha$ .
2. El compuesto AICAR tendrá un efecto en la expresión del RNAm de: miogenina, PPAR $\beta/\delta$  y PGC1 $\alpha$ .
3. La mezcla de los dos compuestos AICAR y L165 promoverá el aumento en la expresión del RNAm de: miogenina, PPAR $\beta/\delta$  y PGC1 $\alpha$ .

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Conocer el efecto de L165 y AICAR sobre la expresión del RNAm de miogenina en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Conocer el comportamiento de la expresión de miogenina y Pax7 a través de una curva de tiempo en la línea celular de i28 por medio de la técnica de inmunocitoquímica.
2. Determinar la dosis óptima de L165 y AICAR, por medio de ensayos de dosis respuesta.
3. Medir el efecto de L165 y AICAR sobre la expresión del RNAm de miogenina mediante PCR de tiempo real.

# 6. MATERIALES Y MÉTODOS

## 6.1 MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio de Crecimiento (MC)

DMEM 76.9% (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose 1x, *Invitrogen*, Carlsbad, CA).

Suero fetal bovino 20% (*Invitrogen*).

Anfotericina B 1% (*Gibco*, Fungizona 250 µg/ml).

Glutamax 1% (*Gibco*, 100X).

Penicilina-Estreptomicina 1% (*Gibco*, Penicilina 10,000 U/ml, Estreptomicina 10,000 µg/ml).

Gentamicina 0.1% (*Gibco*, 50 mg/ml).

Medio de Diferenciación (MD)

DMEM 56.9% (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose 1x, *Invitrogen*, Carlsbad, CA).

Suero fetal bovino 40% (*Invitrogen*).

Anfotericina B 1% (*Gibco*, Fungizona 250 µg/ml).

Glutamax 1% (*Gibco*, 100X).

Penicilina-Estreptomicina 1% (*Gibco*, Penicilina 10,000 U/ml, Estreptomicina 10,000 µg/ml).

Gentamicina 0.1% (*Gibco*, 50 mg/ml).

PBS 1x

NaCl 8 gramos

KCl 0.2 gramos

Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.15 gramos

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 gramos

Medio de Montaje

Hoechst 1% (*Invitrogen*)

DABCO 1% (*Sigma*)

PBS 1x 10%

Glicerol 88% (*Baker*)

Gelatina al 0.1% (gelatina Tipo A de piel de puerco, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO).

## **6.2 CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA i28**

La línea celular de mioblastos i28, obtenida del músculo esquelético de ratón (Wernig A. et al., 2000) fue donada por el Dr. Ricardo Miledi (Instituto de Neurobiología UNAM, Querétaro, México). Para su estandarización se preparó una matriz de gelatina al 0.1%, esterilizada la cual se incubó por lo menos 5hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El vial de la línea celular i28 con 1X10<sup>6</sup> células se transportó en hielo del tanque de nitrógeno líquido al baño maría para descongelar a 37°C. Una vez descongeladas se resuspendieron en 2 ml de medio de crecimiento (MC) y se sembraron en una caja de 3.5 cm de diámetro. Cuando las células alcanzaron una confluencia del ≈60% se tripsinizaron (Tripsina al 0.05%, *Invitrogen*), este procedimiento se repitió para una caja de 6cm y 10 cm, las veces que fueron necesarias para destinar un porcentaje de las células a las inmunocitoquímicas y otro porcentaje para la aplicación de los tratamientos.

### 6.3 EXPRESIÓN DE PAX7 Y MIOGENINA POR INMUNOCITOQUÍMICA

Con el objetivo de conocer el comportamiento de la expresión Pax7 y miogenina, los cuales son unos de los principales marcadores de la miogénesis, se utilizó la técnica de inmunocitoquímica a los: -2, 0, 2, 4, 6 y 8 días, donde el día -2 se mantuvo con medio de crecimiento (MC) y a partir del día 0 con medio de diferenciación (MD).

Se utilizaron cajas de 4 pozos de 1.5 cm de diámetro cada uno con un cubre objeto previamente esterilizado y una matriz de gelatina al 0.1% la cual se dejó incubando por lo menos 5 hrs antes de la siembra.

La densidad de siembra fue de acuerdo a lo descrito en el Cuadro II. En cada punto de la curva de expresión, a las células se les retiró el medio de cultivo y lavaron 2 veces con 500µL de PBS 1x. Se fijaron las células con 500µL de paraformaldehído al 3.5% por 20 minutos, se lavaron tres veces con PBS 1x por cinco minutos cada uno, se bloqueó por 30 minutos con suero de cabra inactivado al 2% (*Gibco*, Oakland, MS) se lavaron con PBS 1x por una sola vez. Se preparó una mezcla con: Tritón X-100 al 0.1% (*Baker*), anticuerpo primario monoclonal de ratón Pax7 (1:1000, *Abocan*, Cambridge, MI) o el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-miogenina (1:1000, *Mullidora*, Remécela, CA) con PBS 1x, para permeabilizar la membrana nuclear e incubar el anticuerpo primario por toda la noche en el cuarto frío a 4°C, después de toda la noche se lavaron tres veces con PBS 1x por cinco minutos cada uno. El anticuerpo primario se detectó con Alexa-Fluor 488 anticuerpo secundario conjugado (1:600, *Invitrogen*).

Por último se agregaron 40µL del medio de montaje al portaobjetos y con pinzas se tomó el cubre objeto de la caja de 4 pozos y se colocó al portaobjetos con las células hacia el medio de montaje. Se dejaron toda la noche con el medio de montaje y al día siguiente se sellaron con barniz transparente. Las células se observaron y fotografiaron con el

microscopio de epifluorescencia (Olimpus, Melville, NY) equipado con cámara digital a color y el programa de imagen Pro Plus (Media cybernetics, Bethesda, MD).

Para conocer el comportamiento de la expresión de miogenina y Pax7 a través de una curva de tiempo en la línea celular de i28, se realizó un conteo de las células que expresaron la proteína miogenina y Pax7. Primero se fotografiaron los núcleos teñidos con Hoechst, lo cual representaría el 100% de las células, para posteriormente fotografiar las células teñidas con Alexa 488 para miogenina o para Pax7 respectivamente y así calcular el porcentaje de células que expresaron de manera positiva la proteína.

Estos resultados se analizaron con el programa estadístico SAS, por medio de análisis de regresión lineal.

|         |                                   |
|---------|-----------------------------------|
| -2      | $5 \times 10^4$ células por pozo  |
| 0       | $5 \times 10^4$ células por pozo  |
| 2       | $25 \times 10^3$ células por pozo |
| 4       | $1 \times 10^4$ células por pozo  |
| 6       | $1 \times 10^4$ células por pozo  |
| 8       | $5 \times 10^3$ células por pozo  |
| Control | $5 \times 10^3$ células por pozo  |

Cuadro II. Densidad de siembra para la curva de expresión de la proteína Pax7 y miogenina.

#### **6.4 EXPRESIÓN DEL RNAm DE PPAR $\beta$ / $\delta$ EN LA LÍNEA CELULAR i28 DE MIOBLASTOS**

Debido a que no se obtuvo información sobre la expresión del RNAm de PPAR $\beta$ / $\delta$  en la línea celular i28; en la búsqueda realizada en la literatura, fue necesario asegurar su expresión, debido a que L165 es un agonista selectivo del receptor PPAR $\beta$ / $\delta$ . Para lo cual se realizó un ensayo en cajas de cultivo de 3.5 cm de diámetro, con matriz de gelatina al 0.1%, esterilizada e incubada por 5 horas. La densidad de siembra fue de  $3 \times 10^4$  células por caja. Se mantuvieron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, durante todo el ensayo se utilizó MC. El ensayo se realizó a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días.

**a) Extracción de RNA:** la extracción total de RNA se hizo de acuerdo al protocolo del kit de *Promega*, donde se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizó un lavado con PBS 1x estéril, se añadió 175 $\mu$ L de amortiguador de lisis a cada pozo y se rasparon las células, para promover lisis celular. El lisado se transfirió a un tubo de 1.5mL y se mezcló por 25 seg y se agregó 350 $\mu$ L de solución amortiguadora de dilución del RNA y se mezcló por inversión y centrifugó a 13,000 gravedades por 10 minutos, se formó una pastilla y se decantó la parte líquida a un tubo nuevo de 1.5 ml. Para purificar el RNA se agregaron 200 $\mu$ l de etanol al 95% a ese mismo tubo, se pipeteo 4 veces y se transfirió a la columna. Se centrifugó a 12,000g por un minuto. Se realizó un lavado con 600  $\mu$ l de la solución de lavado de RNA. Se incubó por 15 minutos de 20°C a 25°C con la mezcla de solución amortiguadora amarillo "Yellow Core", MnCl<sub>2</sub> y DNasa. Se suspendió la reacción con la solución de paro DNasa y se centrifugó a 13,000g por un minuto. Se realizaron dos lavados más utilizando el mismo procedimiento. La columna se transfirió a

un tubo nuevo y se agregaron 30µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, se centrifugó y retiró la columna. El RNA se mantuvo en hielo mientras se midió su concentración en el espectrofotómetro Nanodrop 1000, Thermo Scientific. Se almacenó a -70°C.

- b) Obtención del DNAc por la reacción reversa de la transcripción de la cadena de polimerasa (RT-PCR):** para comenzar con la técnica RT-PCR la concentración final del RNA fue de 1,000 ng/µl. Primero se hizo una dilución del RNA con H<sub>2</sub>O a un volumen final de 17.25µl. Se realizó una primera mezcla con: 0.75µl DNAsa + 8µl de solución amortiguadora 5X + (RNA + H<sub>2</sub>O) por cada reacción, se incubó por 15 minutos a T° ambiente y 5min a 70°C para desactivar la DNasa. Se hizo una segunda mezcla con: 1µl Oligo DT (*Sigma*) + 1µl DNTP's + 1µl Super Script II (*Invitrogen*) + 1µl RnasaOut (*Invitrogen*) por cada reacción, esta mezcla se mezcló y añadió 4µl a la primera mezcla, la mezcla final se corrió en el Termociclador Corbett Research con un programa de 50 minutos a 42°C, 15min a 70°C y 3min a 4°C.
- c) Diseño de oligos de PPARβ/δ:** para el diseño de los oligos del receptor PPARβ/δ de *Mus musculus*; se buscó en la base de datos del GenBank del NCBI la secuencia de nucleótidos de PPARβ/δ, la referencia con la que se trabajó fue NM\_011145.3, de esta secuencia se seleccionó la parte codificante y se analizó con el programa Oligo Primer Analysis Software V.7, donde a través del análisis de la secuencia se eligieron los oligos que reunieron las mejores características. Los oligos seleccionados fueron: sentido F5' CATCCTCACCGGCAAGTCCA 3' (*Sigma*) y antisentido R5' CATGGCAAAGATGGCCTCGT 3' (*Sigma*) con un tamaño de 20 nucleótidos cada oligo, la temperatura de separación de la cadena doble del DNA fue de 63°C, el porcentaje de nucleótidos de

guanina y citocina fue del 58.3% y el tamaño del producto de los oligos fue de 283pb.

**d) Diseño de oligos del gen de referencia MnSOD:** el gen endógeno utilizado fue manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), las secuencias de los oligos fueron: oligo sentido 5'GACCCATTGCAAGGAACAA 3' (*Sigma*) y antisentido 5'GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC3' (*Sigma*) con un tamaño de 20 y 21 nucleótidos respectivamente, la temperatura de separación de la cadena doble del DNA fue de 60°C, el porcentaje de nucleótidos de guanina y citocina fue del 57.1% y el tamaño del producto de los oligos fue de 69 pb.

**e) Comprobación de la secuencia del gen PPAR $\beta/\delta$ :** se realizó un PCR de punto final (3 $\mu$ l de DNAC + 2.5 $\mu$ l de solución amortiguadora 10x, 1 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, + 0.5 $\mu$ l DNTP's + 0.5 $\mu$ l Oligo sentido + 0.5 $\mu$ l antisentido + 0.5 $\mu$ l Taq + 16.5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O), el producto se envió a secuenciar a la Unidad de Proteogenómica de Instituto de Neurobiología (UNAM) usando el secuenciador Applied Biosystems 310, la cual se alineó con la de PPAR $\beta/\delta$  *Mus musculus* (NM\_011145.3) por medio de la herramienta Blast, dando como resultado que la secuencia amplificada por los oligos diseñados para PPAR $\beta/\delta$  es 100% homóloga a la secuencia reportada en PubMed para PPAR $\beta/\delta$  de *Mus musculus* NM\_011145.3.

**f) Comprobación de la secuencia del gen de referencia MnSOD:** debido al tamaño del producto de PCR del gen endógeno MnSOD de 69pb fue necesario realizar una ligación y transformación para clonar el fragmento y poder tener un fragmento mayor para secuenciar. Se hizo un PCR de punto final con DNAC sin diluir y con los oligos de MnSOD. La ligación se realizó por medio de la siguiente reacción: 5 $\mu$ l de solución

amortiguadora 2X + 1µl del vector pGEM + 1µl T4 ligasa + 1µl del producto de PCR de punto final de MnSOD a la dilución X. Se incubó por 1 hora a T°C ambiente. Se utilizó como control positivo al vector pUC19 DNA. Se utilizaron tres viales de células competentes XL-azul. Un vial control donde se le añadió 5µl del vector control pUC19, un vial con el PCR sin diluir donde se le añadió 5µl de la ligación y un vial con el PCR 1:10 donde se le añadió de la ligación el choque térmico fue a 42°C por 3min, se le añadió 400µl de LBD a cada vial en el hielo e incubó por 37°C por 30min. Antes de sembrar las células se añadió 20µl de IPTG [100µM] y 20µl de X-Gal a la caja de agar donde se sembraron las células con el vector pGEM. Los viales se centrifugaron por 15seg; el pellet se resuspendió con el líquido restante y se sembró cada vial en una caja, se incuban a 37°C por 16 horas. Cada colonia se tomó y se resuspendió en 5ml de LBD con ampicilina (1µl ampicilina/ml de LB). Se incubaron a 37°C por 16hrs a 250rpm de agitación.

**g) Extracción de DNA (Promega®):** se tomaron 2ml de cada tubo con las bacterias del vector pGEM y centrifugaron a 12,000g X 1min. El pellet resultante se resuspendió con 250µl de solución amortiguadora S1, hasta que el pellet quedó completamente disuelto. Se añadió 250µl de solución amortiguadora S2, se mezcló suavemente por inversión, 350µl de solución amortiguadora S3 e invirtió suavemente. Se centrifugó a 12,000g X 10min. Se colocó la columna a un tubo de 2ml y pasó la fase clara a la columna y centrifugó a 12,000g x 1min. Se agregó 500µl solución amortiguadora W1 y centrifugó a 12,000g X 1min, 700µl de solución amortiguadora W2 y centrifugar a 12,000g X 1min, se descartó el filtrado del tubo y añadió 700µl de solución amortiguadora W2 y centrifugó a 12,000g X 1min, se descartó el

filtrado y centrifugó a 12,000g X 1min. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5ml y diluyó con 100µl del eluyente y se dejó 1min reposando y centrifugó a 12,000g X 1min.

- h) Secuenciación del gen de referencia MnSOD:** el producto de la ligación y transformación del inserto de MnSOD, se envió a secuenciar al Instituto de Neurobiología en la Unidad de Proteogenómica con el secuenciador Applied Biosystems 310, la secuencia resultante se alineó por medio de la herramienta Blast de PubMed, lo que dio como resultado que los oligos diseñados para MnSOD es 100% homóloga a la secuencia NM\_013671.3 de MnSOD de *Mus musculus*.
- i) Expresión del RNAm de PPARβ/δ por qPCR:** para medir la expresión del receptor PPARβ/δ a través del tiempo se hizo una mezcla para PCR de tiempo real: (2µl de H<sub>2</sub>O + 1µl de MgCl<sub>2</sub> + 1µl de oligo sentido y antisentido + 1µl Saber Green I de Roche + 5µl de DNAc a una dilución 1:5); para cada gen PPARβ/δ y MnSOD. La cual se amplificó en el LightCycler® 1.5, Roche Diagnostics; Basel Switzerland con los capilares de 20µl para LightCycler de Roche Applied Science. Las condiciones para el PCR de tiempo real fueron: Desnaturalización: 1 ciclo, 10min a 95°C. Amplificación: 40 ciclos con tres temperaturas: Desnaturalización 10 s a 94°C. Alineación 10 s a 63°C para PPARβ/δ y 60°C para MnSOD. Amplificación a 72°C 12s para PPARβ/δ y 8s para MnSOD. Fusión: 1 ciclo con tres temperaturas: a 95°C, 15 s a 55°C y 95°C con una medición de la fluorescencia cada 0.25 s. Enfriamiento: 1 ciclo a 40°C por 30 s. Por medio del cálculo de la  $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$  se midió la expresión del RNAm de PPARβ/δ a los 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días (Livak y Schmittgen, 2000).

## 6.5 DOSIS ÓPTIMA PARA AICAR Y L165

Se hizo un stock de L165 a 1mM diluido en dimetilsulfóxido (*Baker*) el cual es un solvente orgánico que puede ser miscible tanto en agua como en solventes orgánicos. La densidad de siembra fue de 30,000 células por caja de 3.5 cm de diámetro. Se mantuvieron con MC por 48 horas y a las 72horas se les agregó el MD con el agonista L165 a las siguientes concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  (fig.12) de acuerdo a Schiefelbein et al., 2008.

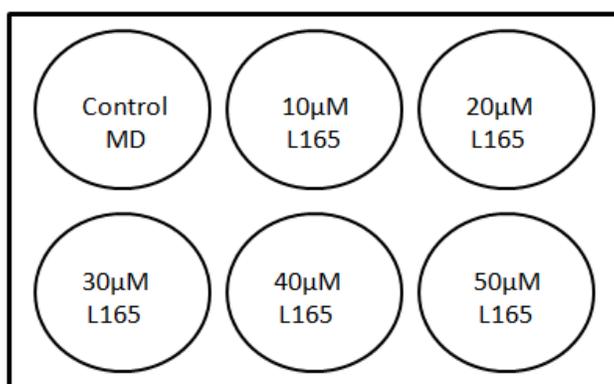


Fig.12 Ensayo de dosis-respuesta de L165.

Para AICAR se hizo un stock a 10mM diluido en el MD ya que es un compuesto hidrosoluble. La densidad de siembra fue de 30,000 células por caja de 3.5 cm de diámetro. Se mantuvieron con medio de cultivo por 48 horas y a las 72horas se les agregó el MD con AICAR a las siguientes concentraciones como se muestran en la fig.13

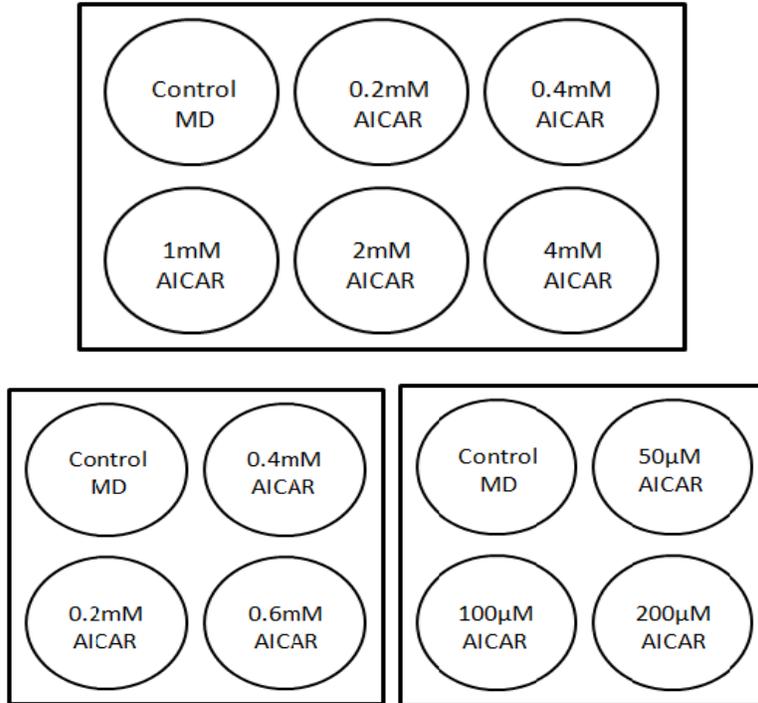


Fig.13 Ensayo de dosis-respuesta de AICAR.

## 6.6 EFECTO DE AICAR Y L165 EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE MIOGENINA.

La densidad de siembra fue 30 mil células por caja de 3.5 cm de diámetro. El cambio de medio fue cada 48hrs. Se mantuvieron en incubadora 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. En el tercer cambio, se aplicaron los diferentes tratamientos como se observa en la fig.14

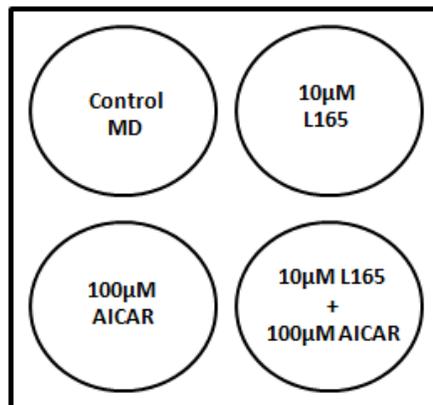


Fig.14 Dosis utilizadas de los tratamientos: AICAR, L165 y AICAR+L165.

El RNA se extrajo con Trizol® de invitrogen a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. A las 0 horas no se aplicó tratamiento.

- I. **Extracción de RNA** Homogenización. La extracción total de RNA se hizo de acuerdo al protocolo de Trizol® de *Invitrogen*, donde se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizó un lavado con PBS 1x estéril, se añadió 1ml de Trizol® a cada pozo y se rasparon las células, para promover lisis celular. El lisado se vertió a un tubo de 1.5ml, y se centrifugó a 12,000g por 10min. La fase acuosa se cambió a un tubo nuevo y se le agregó 1µl RNasa Out (*Invitrogen*). Se incubó por 5min a T° ambiente, se le añadieron 200µl de cloroformo y agitó por 15", se incubó por 2min y centrifugó a 12,000g por 15min.
- II. Precipitación del RNA. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, y se precipitó el RNA con 500µl de alcohol isopropílico, se invirtió e incubó por 10min a T° ambiente y se centrifugó por 10min a 12,000g.
- III. Lavado del RNA. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con 1ml de etanol al 75%, se agitó por medio de un mezclador de vórtice y centrifugó a 7,200 gravedades por 5min. Las muestras se lavaron dos veces más bajo el mismo procedimiento. Secado y mezclado. Se escurrió el pellet por 5min y añadió 60µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa y se disolvió en el termomixer (Heidolph unima, 2010) a 55°C a 650 rpm. El RNA se mantuvo en hielo mientras se midió su concentración en el espectrofotómetro Nanodrop 1000, Thermo Scientific. Se almaceno a -70°C.
- IV. **Obtención del DNAc por la reacción reversa de la transcripción de la cadena de polimerasa (RT-PCR):** después de medir el RNA se obtuvo el DNA complementario (DNAc) por

medio de la reacción reversa de la transcripción de la cadena de polimerasa (RT-PCR) como se describe en el punto (6.4).

- V. **Diseño de oligos para miogenina:** para el diseño de los oligos del gen de miogenina de *Mus musculus*; se buscó en la base de datos del GenBank del NCBI la secuencia de nucleótidos de miogenina, que fue NM\_031189 de esta secuencia se seleccionó la parte codificante y se analizó con el programa Oligo Primer Analysis Software V.7, donde a través del análisis de la secuencia se eligieron los oligos que reunieron las mejores características. Los oligos seleccionados fueron: sentido 5' AAGAGGAAGTCTGTGTCGGT 3' y antisentido 5' GTAGGCGCTCAATGTACTGG 3' (Sigma) con un tamaño de 20 nucleótidos cada oligo, la temperatura de separación de la cadena doble del DNA fue de 63°C, el porcentaje de nucleótidos de guanina y citocina fue del 60% y el tamaño del producto de los oligos fue de 178pb. El gen endógeno utilizado fue manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), como se describe en el punto (6.4).
- VI. **Secuenciación de miogenina:** la secuenciación de miogenina se hizo igual que en el punto 6.4, donde se validó que la secuencia amplificada por los oligos diseñados para miogenina es 100% homóloga a la secuencia NM\_031189.9 de miogenina de *Mus musculus* reportada en PubMed.
- VII. **Validación del gen endógeno y miogenina:** para conocer la expresión relativa del gen en estudio contra un gen de referencia es necesario hacer una curva de eficiencia para cada uno y correlacionar las dos pendientes; cuando el valor de la pendiente es más cercano a cero, significa que existe una mayor correlación entre los genes, de esta manera se valida el uso del gen de

referencia. La curva de eficiencia del gen miogenina y del gen de referencia MnSOD se realizó a las diluciones 1:5, 1:50 y 1:500.

El método empleado para medir la eficiencia de los genes fue el de:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (Livak y Schmittgen, 2001).

- VIII. **Medición del RNAm de miogenina por qPCR:** para medir el efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de miogenina en los mioblastos de la línea i28, se sembraron 30 mil células por caja de 3.5 cm de diámetro. A las cuales se les cambió el medio de crecimiento cada 48hrs y en el tercer cambio, se aplicaron los tratamientos de: a) **L165 a 10 $\mu$ M**, b) **AICAR a 100 $\mu$ M** y c) **L165 10 $\mu$ M + AICAR 100 $\mu$ M**. El RNA se extrajo a partir de las 0 horas donde no se aplicó tratamiento, posteriormente se extrajo el RNA de las células tratadas a las 24, 48, 72 y 96hrs. Después de extraer el RNA se obtuvo el DNAc por la técnica de transcripción reversa, para poder medir la expresión del RNAm por PCR de tiempo real descrita en el punto 6.4 (Livak y Schmittgen, 2001).

## **6.7 EFECTO DE AICAR Y L165 EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE PGC1 $\alpha$**

Para medir el efecto de AICAR y L165 en la expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$ , se utilizaron las mismas células del ensayo del punto 6.15, el RNA del punto 6.16 y el DNAc del punto 6.6.

- I. **Diseño de oligos para PGC1 $\alpha$ :** para el diseño de los oligos del gen de PGC1 $\alpha$  de *Mus musculus*; se buscó en la base de datos del *NCBI* la secuencia de nucleótidos de PGC1 $\alpha$ , que fue NM\_008904 de esta secuencia se seleccionó la parte codificante y se analizó con el programa Oligo Primer Analysis Software V.7, donde a

través del análisis de la secuencia se eligieron los oligos que reunieron las mejores características. Los oligos seleccionados fueron: sentido 5' CCTGCCATTGTTAAGACCGA 3' y antisentido 3' TTTTCTGTGGGTTTGGTGTG 5' (*Sigma*) con un tamaño de 20 nucleótidos cada oligo, la temperatura de separación de la cadena doble del DNA fue de 61°C, el porcentaje de nucleótidos de guanina y citocina fue del 46.6% y el tamaño del producto de los oligos fue de 146pb. El gen endógeno utilizado fue manganeso su peróxido dismutasa (MnSOD), como se describe en el punto 6.4

- II. **Secuenciación de PGC1 $\alpha$** : la secuenciación de PGC1 $\alpha$  se hizo igual que en el punto 6.4, dando como resultado que la secuencia amplificada por los oligos diseñados para PGC1 $\alpha$  es 98% homóloga a la secuencia NM\_008904 de PGC1 $\alpha$  de *Mus musculus* reportada en PubMed.
- III. **Validación del gen endógeno y PGC1 $\alpha$** : para validar el gen endógeno, se hizo una curva de eficiencia del gen PGC1 $\alpha$  y una del gen endógeno MnSOD a las diluciones 1:3, 1:30 y 1:300.
- IV. **Expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$  por qPCR**: para medir el efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PGC1 $\alpha$  a través del tiempo se hizo bajo las mismas condiciones que para el PCR de tiempo real del punto 6.4; pero con una temperatura de alineación de 60°C.

## **6.8 EFECTO DE AICAR Y L165 EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE PPAR $\beta/\delta$**

Para medir el efecto de AICAR y L165 en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$ , se siguió la misma metodología utilizada para medir el efecto de los tratamientos en la expresión del RNAm de miogenina del punto 6.4 utilizando el mismo DNAc.

- I. **Diseño de oligos para PPAR $\beta/\delta$ :** para el diseño de los oligos del gen de PPAR $\beta/\delta$  de *Mus musculus*; se buscó en la base de datos del *NCBI* la secuencia de nucleótidos de PPAR $\beta/\delta$ , que fue NM\_011145.3 de esta secuencia se seleccionó la parte codificante y se analizó con el programa Oligo Primer Analysis Software V.7, en donde a través del análisis de la secuencia se eligieron los oligos que reunieron las mejores características. Los oligos seleccionados fueron: sentido F5' CATCCTCACCGGCAAGTCCA 3' y antisentido R5' CATGGCAAAGATGGCCTCGT 3' (*Sigma*) con un tamaño de 20 nucleótidos cada oligo, la temperatura de separación de la cadena doble del DNA fue de 60°C, el porcentaje de nucleótidos de guanina y citocina fue del 58.3% y el tamaño del producto de los oligos fue de 283pb. El gen endógeno utilizado fue manganeso su peróxido dismutasa (MnSOD), como se describe en el punto 6.4
- II. **Secuenciación de PPAR $\beta/\delta$ :** la secuenciación de PPAR $\beta/\delta$  se hizo igual que en el punto 6.4, dando como resultado que la secuencia amplificada por los oligos diseñados para PPAR es 100% homóloga a la secuencia NM\_011145.3 de PPAR $\beta/\delta$  de *M. musculus* reportada en el *NCBI*.
- III. **Validación del gen endógeno y PPAR $\beta/\delta$ :** para validar el gen endógeno, se hizo una curva de eficiencia del gen PPAR $\beta/\delta$  y una del gen endógeno MnSOD a las diluciones 1:5, 1:50 y 1:500.
- IV. **Expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  por qPCR:** para medir el efecto de L165y AICAR en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  a través del tiempo se hizo bajo las mismas condiciones que para el PCR de tiempo real del punto 6.4; pero con una temperatura de alineación de 60°C.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 CURVA DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PAX7 Y MIOGENINA A TRAVÉS DE UNA CURVA DE TIEMPO**

En las imágenes de la fig.15 podemos observar que dos días antes de cambiar el medio de crecimiento por el medio de diferenciación en el cultivo de las células i28 de mioblastos de ratón, el porcentaje de expresión de la proteína Pax7 fue mayor al de miogenina ya que el porcentaje de expresión de Pax7 fue del 51% mientras que la expresión de la proteína miogenina fue del 22%, esto concuerda con lo descrito por Yokoyama y Asahara, 2011, donde describen que la expresión de Pax7 es mayor cuando las células musculares se encuentran indiferenciadas.

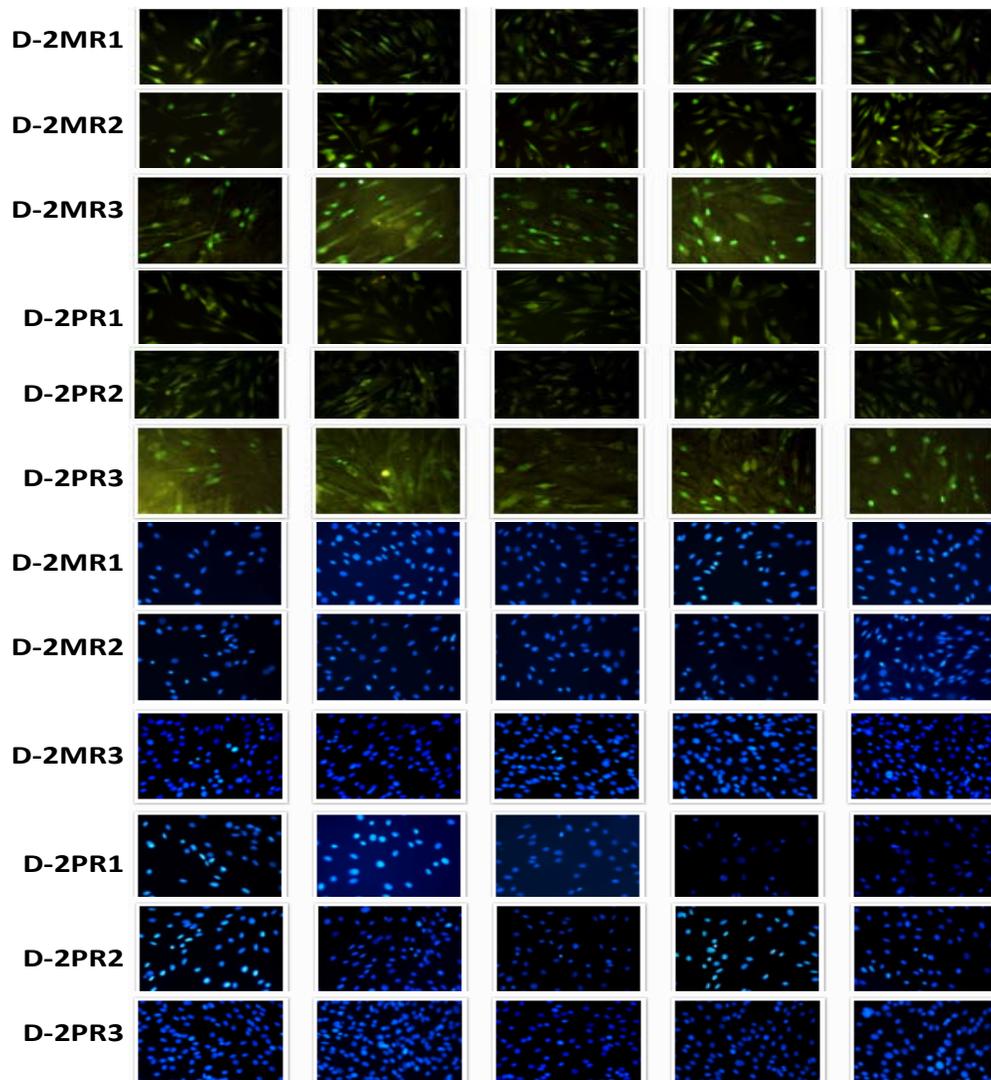


Fig.15 Fotos del día -2 con MC y  $5 \times 10^4$  células por pozo.

**D-2** = dos días antes de cambiar al MD, se mantenían con MC.

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición.

En la fig.16 podemos observar el efecto del cambio del medio de crecimiento por el medio de diferenciación, ya que la expresión de ambas proteínas Pax7 y miogenina se ve inhibida al contabilizarse un porcentaje de expresión del 6% para la proteína Pax7 y un 4% para la proteína miogenina.

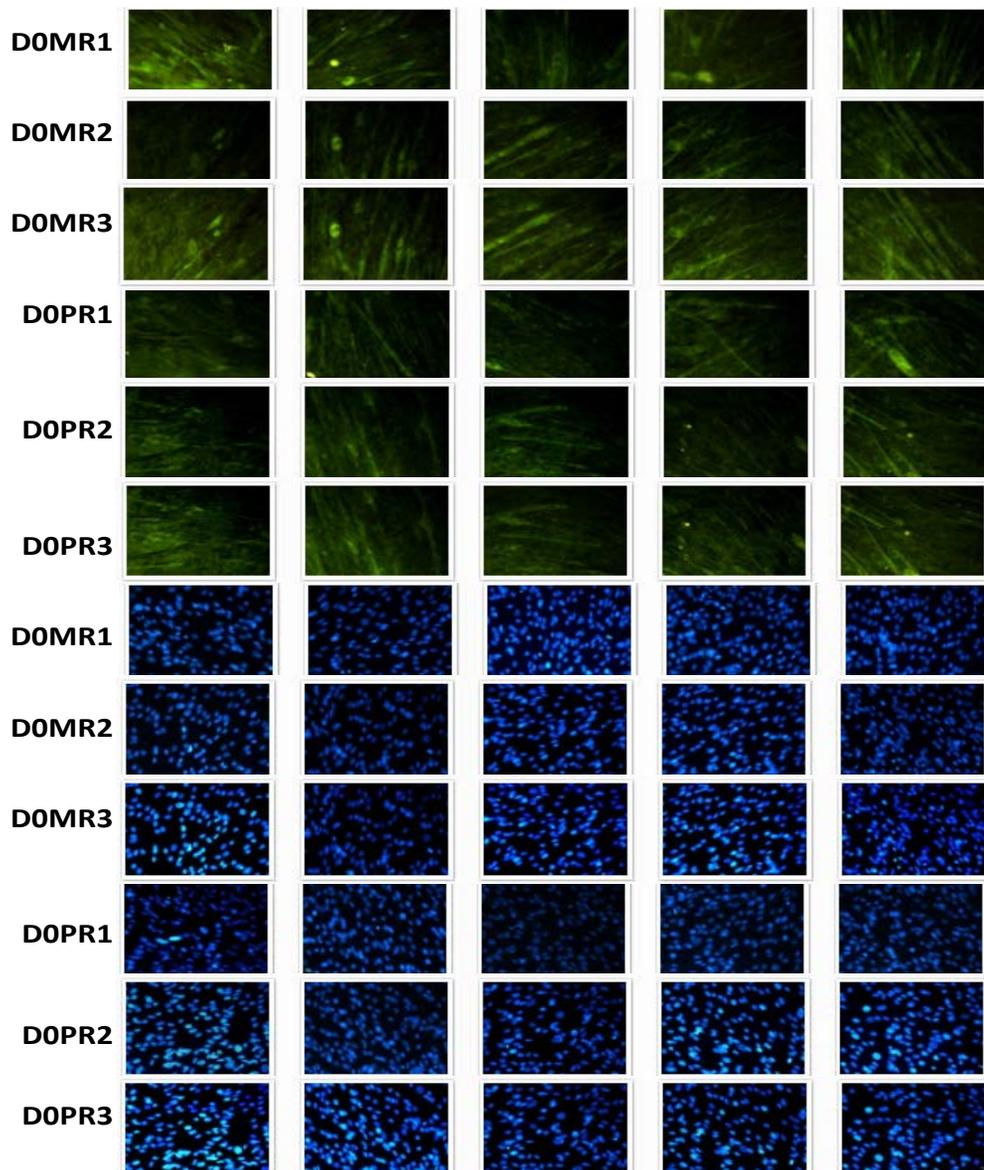


Fig. 16 Fotos del día cero con MD y  $5 \times 10^4$  células por pozo.

**DO**= día del cambio de MC por MD

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición.

En la fig.17 se muestran las imágenes de la expresión de las proteínas Pax7 y miogenina a los dos días con medio de diferenciación donde se observó que el porcentaje de expresión para la proteína miogenina fue

mayor que la expresión de la proteína Pax7, ya que el porcentaje para miogenina fue del 58% mientras que para Pax7 fue del 30%, lo cual coincide con lo descrito por Hettmer y Wager, 2010, donde el porcentaje de expresión de miogenina aumenta cuando las células satélite se diferencian a mioblastos.

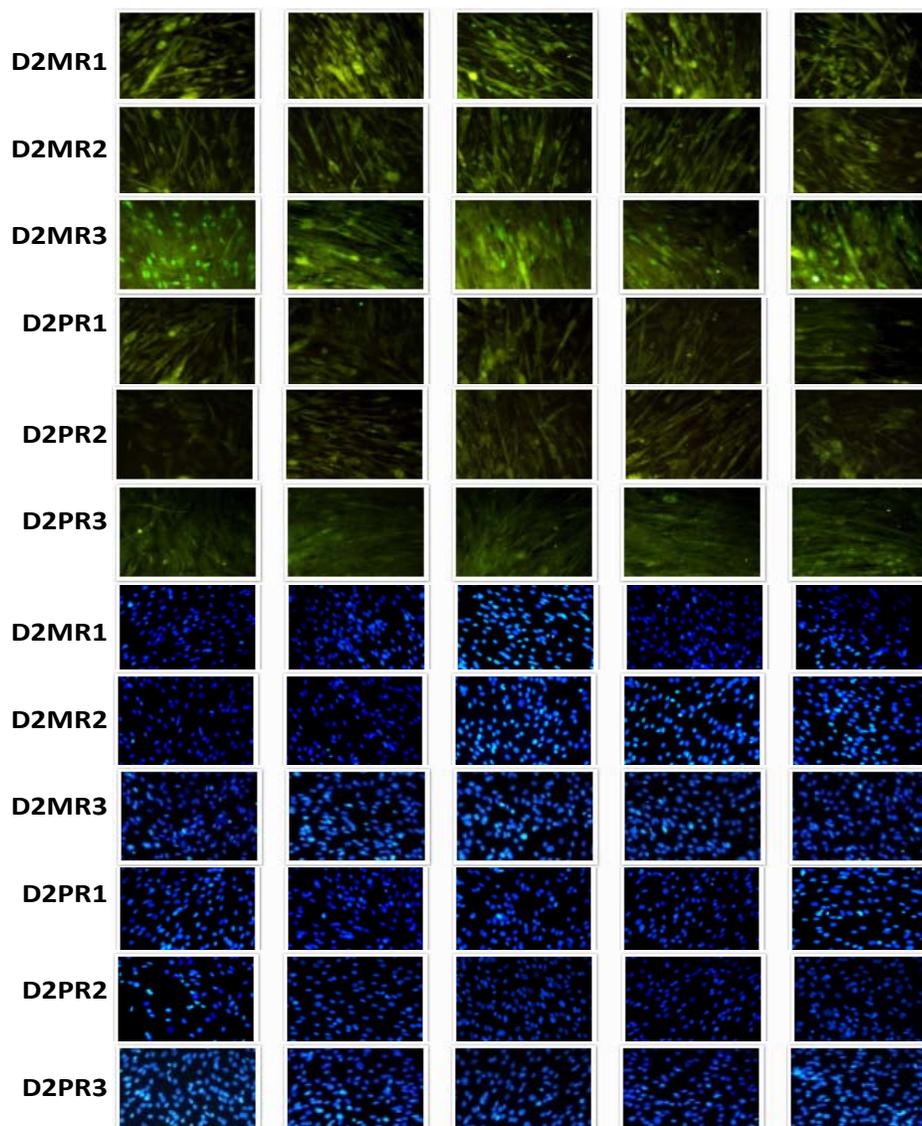


Fig.17 Fotos del día 2 con MC y  $25 \times 10^3$  células por pozo.

**D2** = dos días de cultivo con MD.

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición.

En la fig.18 a los cuatro días de cultivo con medio de diferenciación se observó la misma tendencia que a los dos días, ya que la expresión de la proteína de miogenina fue mayor con un 38% que la expresión de Pax7 con un 25%.

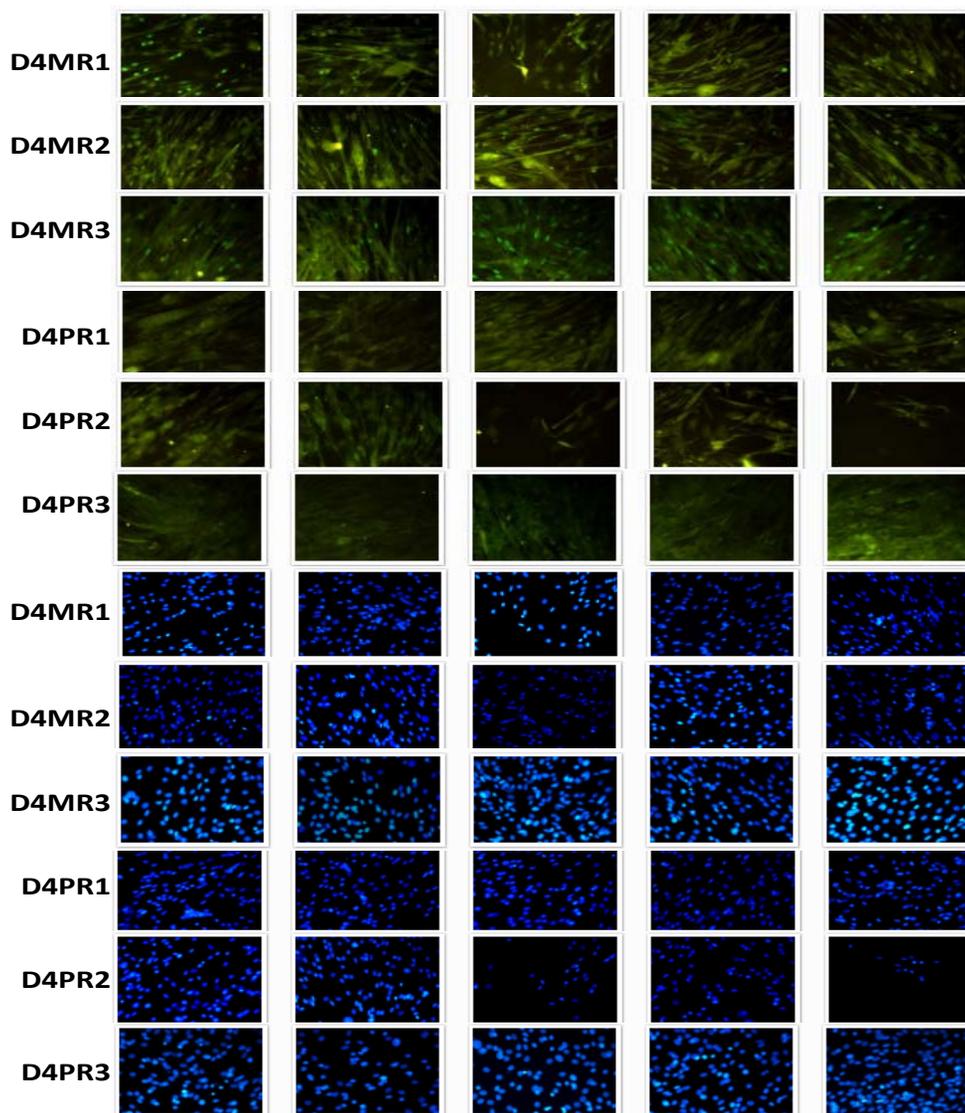


Fig.18 Fotos del día 4 con medio de diferenciación y  $1 \times 10^4$  células por pozo.

**D4** = Cuatro días de cultivo con medio de diferenciación.

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición.

En la fig.19 podemos observar que la expresión de la proteína Pax7 disminuye considerablemente del 25% de expresión del día cuatro a un 10% al día seis del cultivo, mientras que la proteína de miogenina se expresa a un 20%.

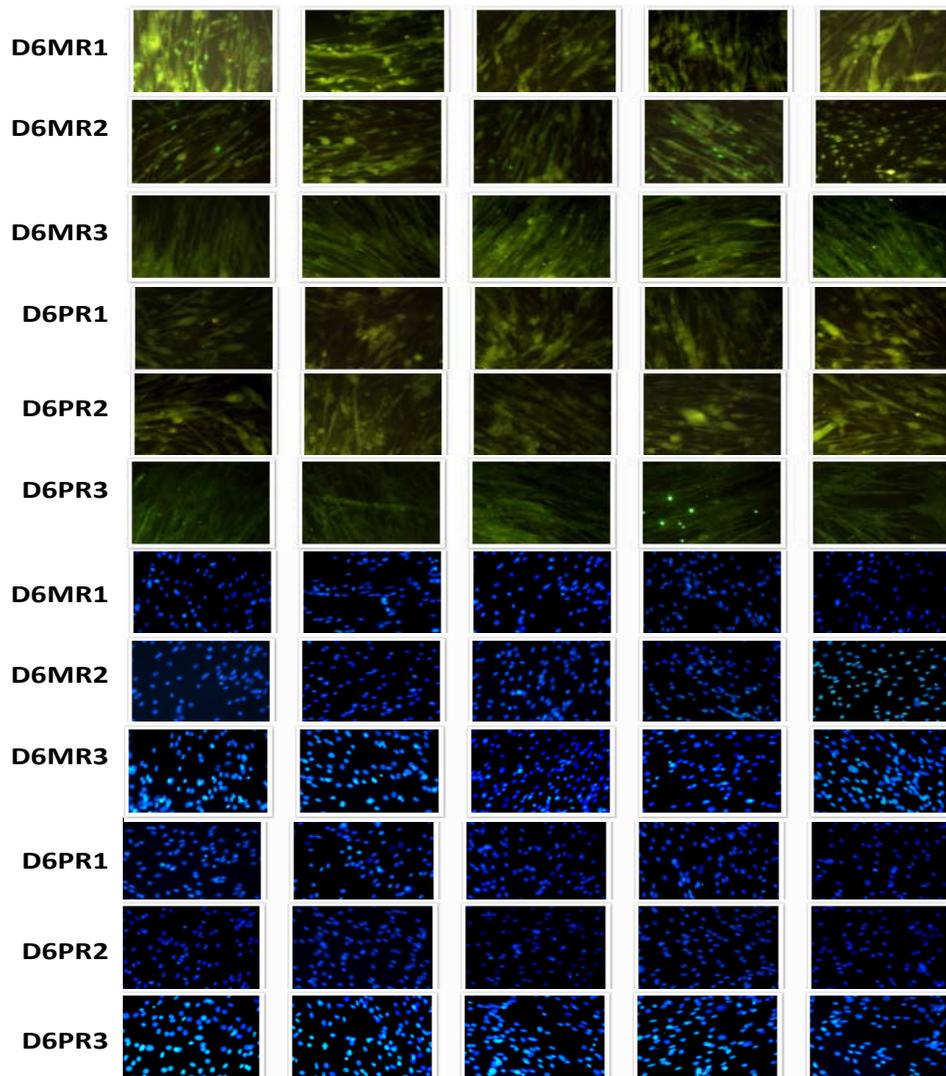


Fig.19 Fotos del día 6 con medio de diferenciación y  $1 \times 10^4$  células por pozo.

**D6** = seis días del cultivo con medio de diferenciación.

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición. Fueron tres repeticiones por día y por proteína.

En la fig.20 se observa una tendencia similar al cultivo del día seis, donde la expresión de Pax7 es menor con un 10%, comparado con el 19% de la proteína miogenina.

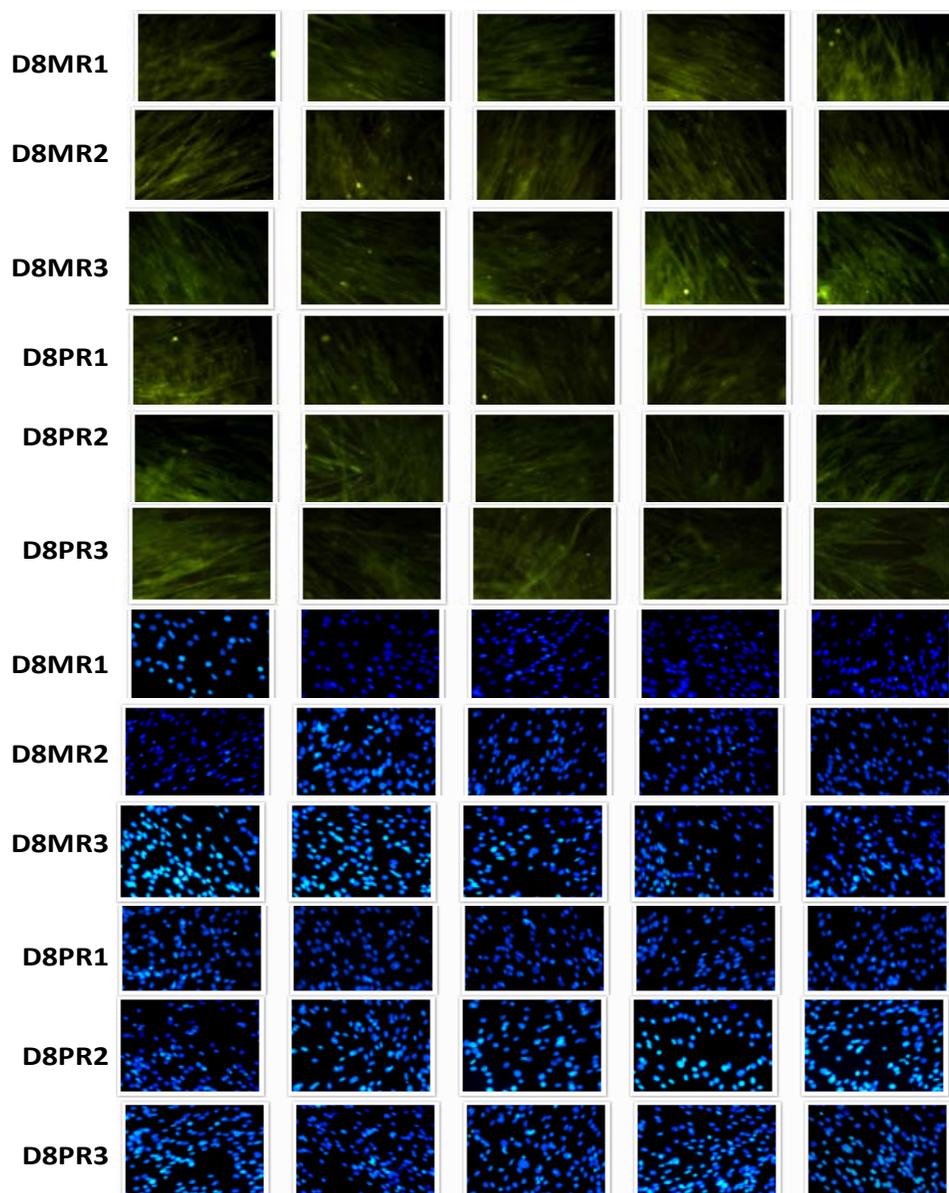


Fig. 20 Fotos del día 8 con medio de diferenciación y  $5 \times 10^4$  células por pozo.

**D8** = octavo día con medio de diferenciación.

**M** = anticuerpo monoclonal de la proteína Miogenina.

**P** = anticuerpo monoclonal de la proteína Pax7.

**RX** = es el número de repetición.

La expresión de las proteínas miogenina y Pax7, se ajustaron a un modelo cuadrático con la ecuación:  $y = 0.64x + 0.05x^2 + 0.008$  con una  $P = 0.006$  y coeficiente de regresión  $r^2 = 0.12$  para miogenina,  $y = 0.59x - 0.07x^2 + 0.008$ , una  $P < 0.002$  y un coeficiente de regresión  $r^2 = 0.13$  para Pax7. Como se muestra en la fig. 21 y 22.

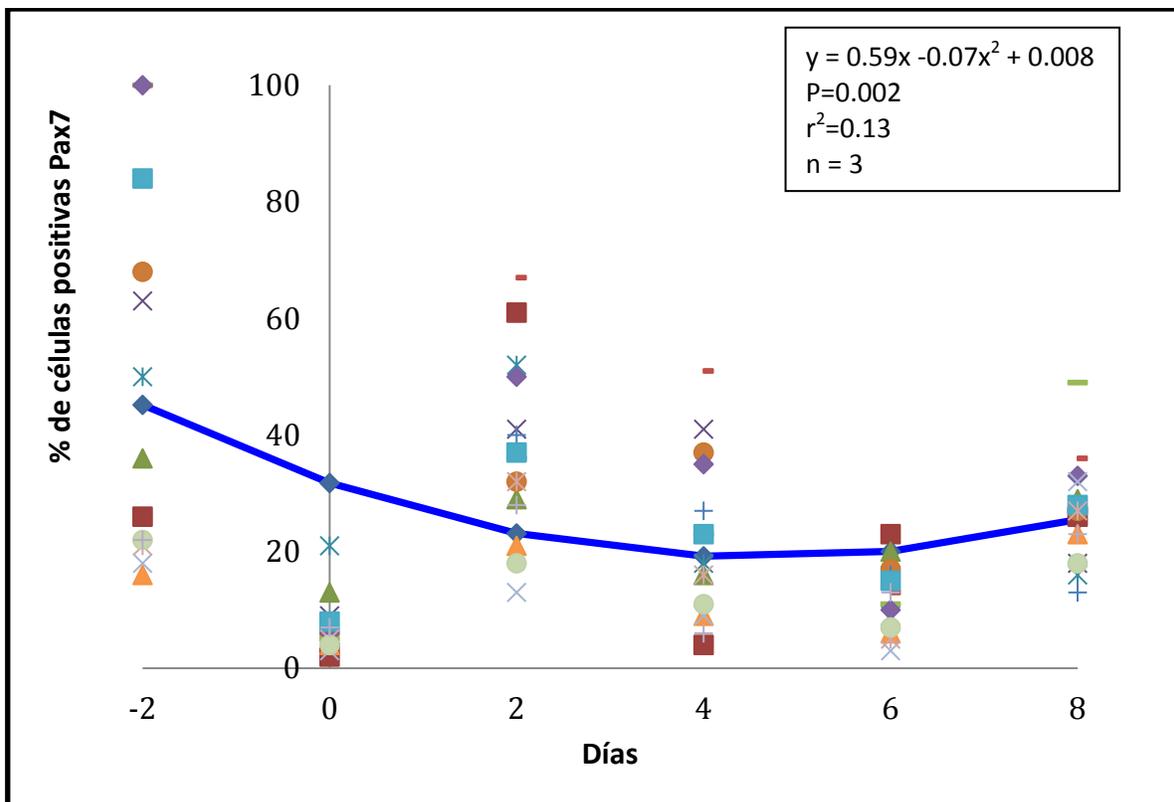


Fig.21 Curva de expresión de la proteína Pax7 en la línea celular i28 de mioblastos de ratón de los días -2 al 8. El cultivo de las células del día -2 y -1 fue con medio de crecimiento y del día 0 al día 8 con medio de diferenciación.

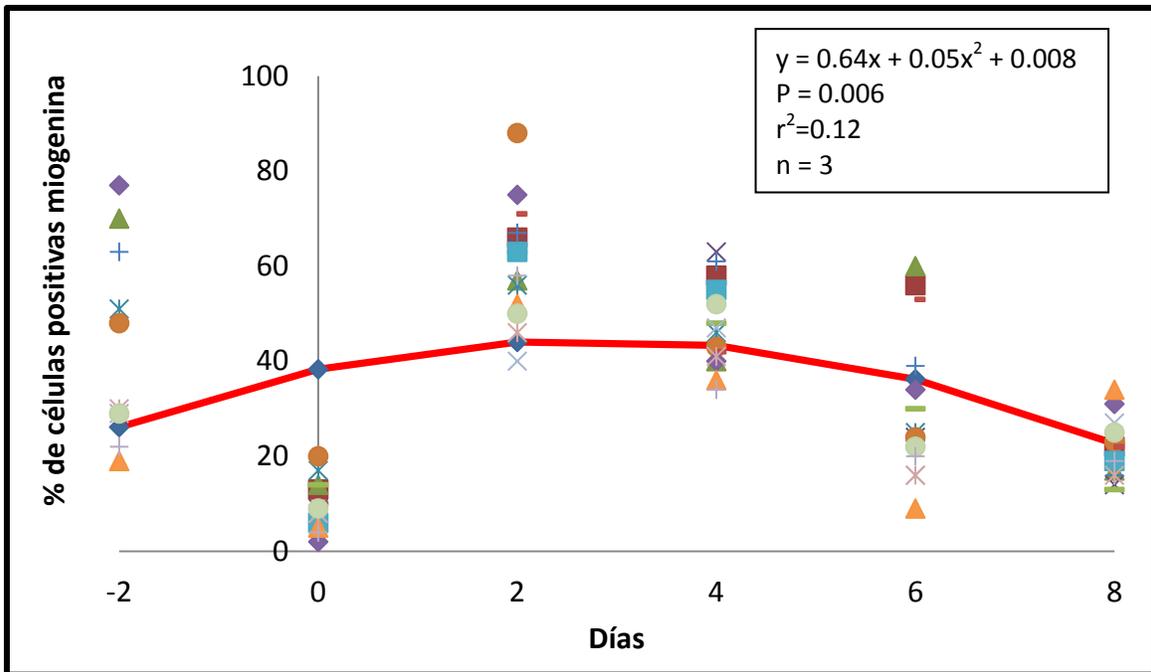


Fig.22 Curva de expresión de la proteína miogenina en la línea celular i28 de mioblastos de ratón de los días -2 a 8. El cultivo de las células del día -2 y -1 fue con medio de crecimiento y del día 0 al día 8 con medio de diferenciación.

## 7.2 VALIDACIÓN DEL GEN ENDÓGENO MnSOD Y MIOGENINA

La validación del gen endógeno MnSOD y miogenina fue necesaria para poder medir el efecto de los tratamientos en la expresión del RNAm por medio de la técnica de PCR de tiempo real. Para lo cual se hizo una curva de eficiencia del gen miogenina y una del gen endógeno MnSOD a las diluciones 1:5, 1:50 y 1:500. La eficiencia de la curva de miogenina fue de 2.11 y la de MnSOD de 2.04. El valor de la pendiente de los genes miogenina y MnSOD es de 0.145, lo cual permite utilizar el gen MnSOD como gen de referencia esto de acuerdo al trabajo de Livak y Schmittgen, 2001.

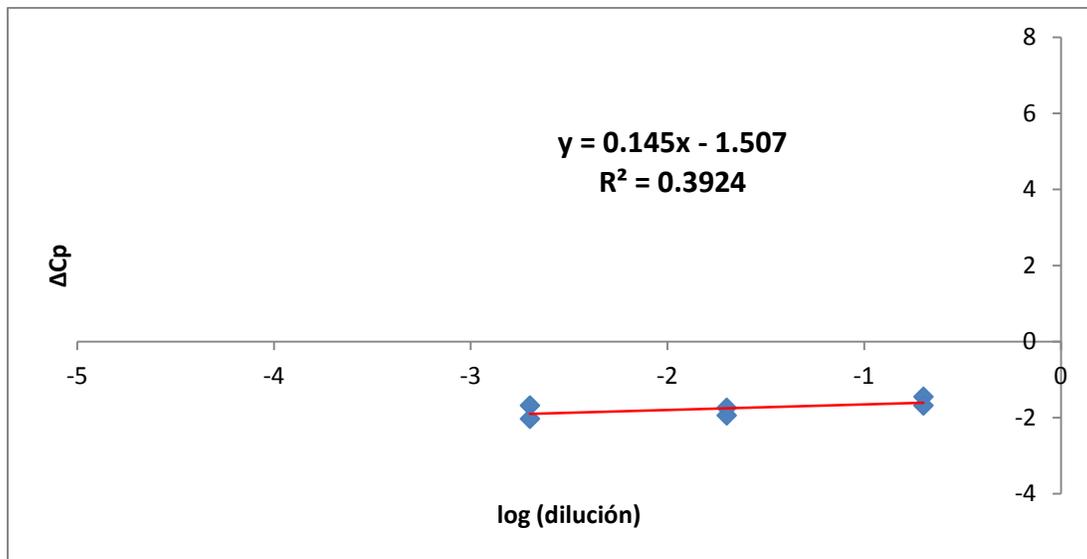


Fig.23 Validación del gen endógeno MnSOD y miogenina en la línea celular i28.

### 7.3 DETERMINAR LA DOSIS ÓPTIMA DE L165 Y AICAR

Para determinar la dosis óptima de L165 se hicieron varios ensayos preliminares en los que se observó que el efecto de L165 a concentraciones mayores de 30 $\mu$ M promovían muerte celular, por lo que el ensayo final para L165 fue a concentraciones de 10 y 20  $\mu$ M, donde la concentración de 10 $\mu$ M fue diferente con una  $P < 0.001$  en la expresión del RNAm de miogenina (Fig.24).

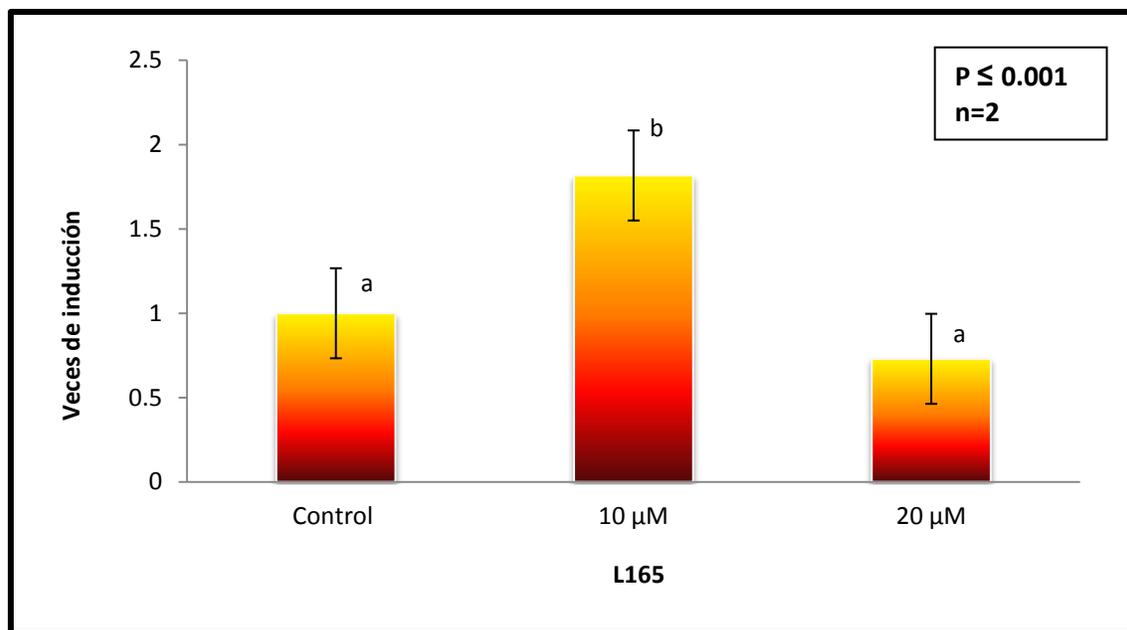


Fig. 24 La dosis óptima para el tratamiento L165 fue de 10 µM, por su incremento en la expresión del RNAm de miogenina en comparación con el grupo control y la concentración de 20µM del mismo tratamiento con una  $P \leq 0.001$ .

Para AICAR se realizaron varios ensayos ya que en la literatura se emplearon concentraciones de 2mM (Du et al., 2006) por lo que el primer ensayo fue de 0.2, 0.4, 1, 2 y 4mM, pero se observó muerte celular en todas las concentraciones, por lo que se realizó un segundo ensayo utilizando dosis de 0.2, 0.4 y 0.6mM. En dichas concentraciones también se observó el mismo efecto por lo que se diseñó un **tercer ensayo** con las concentraciones de 50, 100 y 200µM, en este ensayo no se observó muerte celular, sin embargo no hubo diferencias estadísticas, por lo que las dosis empleada para el ensayo final fue de 100µM para AICAR (fig.25).

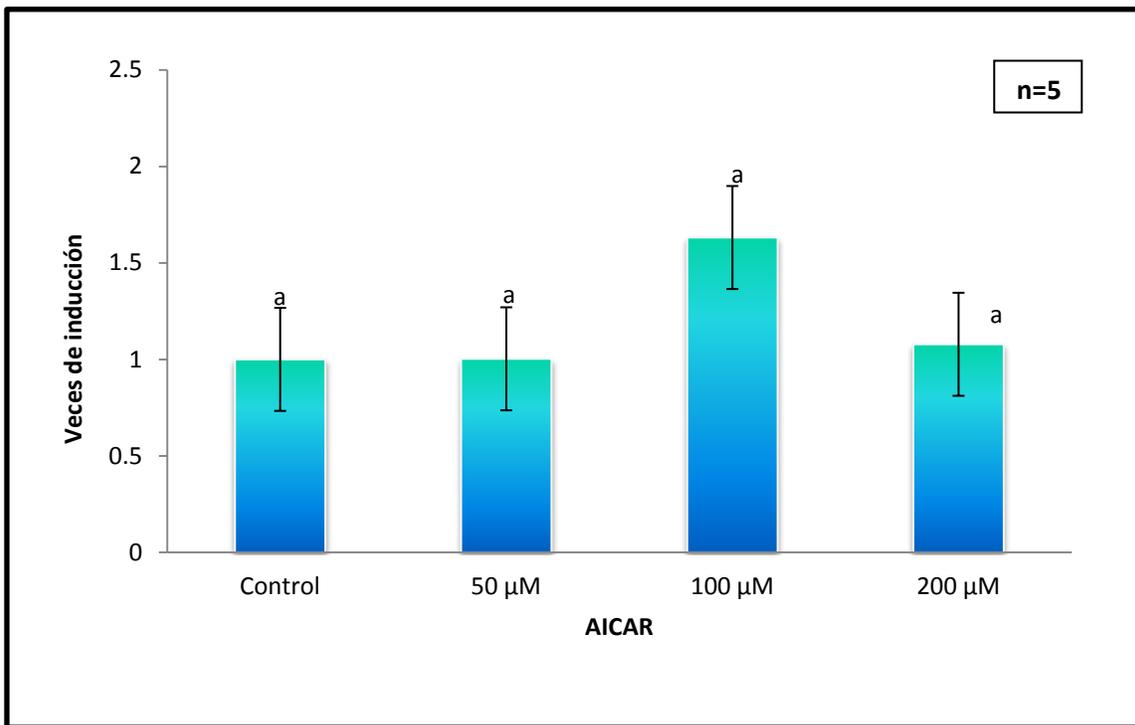


Fig.25 Efecto de AICAR en la expresión del RNAm de miogenina, donde no se observa una diferencia estadística a las concentraciones de 50μM, 100μM y 200μM.

#### 7.4 MEDIR EL EFECTO DE 165 Y AICAR EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE MIOGENINA EN MIOBLASTOS DE LA LÍNEA i28

A partir del PCR de tiempo real, realizado de la extracción del RNAm de las células tratadas a las 24, 48, 72 y 96 hrs.; se observó que sólo hay diferencias estadísticamente significativas contra el grupo control con una  $P \leq 0.05$  a las 72 horas con el tratamiento de AICAR y L165 y a las 96 horas con AICAR (fig.26).

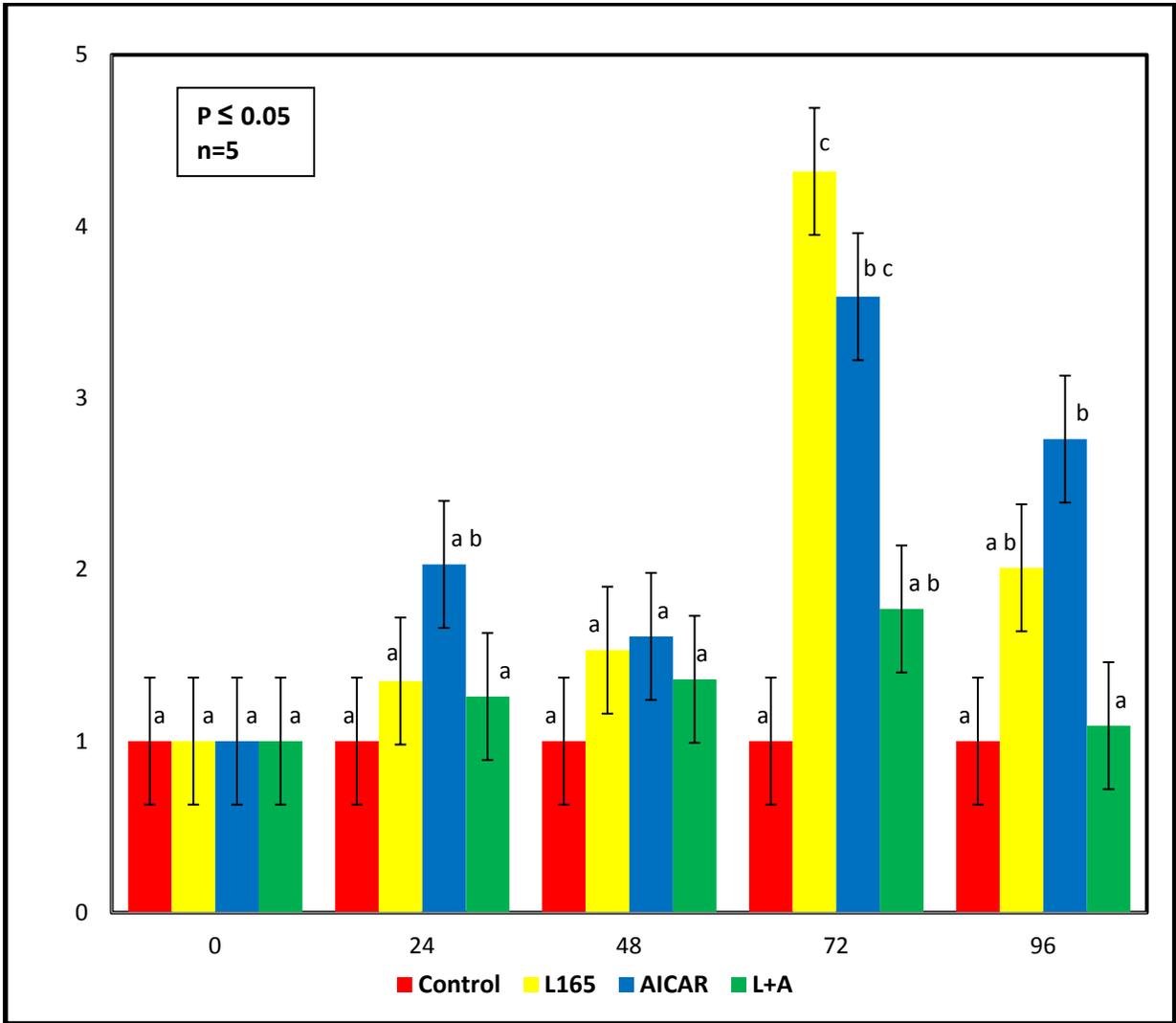


Fig.26 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de miogenina en la línea celular i28.

### 7.5 VALIDACIÓN DEL GEN ENDÓGENO MnSOD Y PGC1 $\alpha$

La validación del gen endógeno MnSOD y PGC1 $\alpha$  se realizó de acuerdo al punto 7.2. Donde la eficiencia de la curva de PGC1 $\alpha$  fue de 1.91, la de MnSOD de 2.04 y el valor de la pendiente, fue de: 0.04 (fig.27).

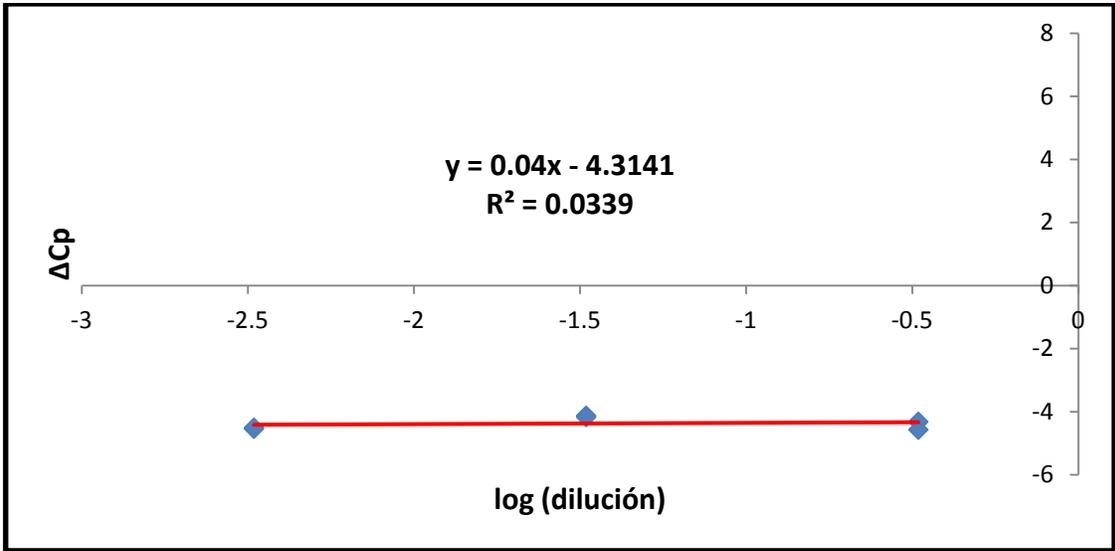


Fig.27 Validación del gen endógeno MnSOD vs PGC1α en la línea celular i28.

**7.6 EFECTO DE L165 Y AICAR EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE PGC1α A LAS 72 HORAS**

En la fig.28 podemos observar el efecto de L165 y AICAR en el RNAm de PGC1α a las 72hrs, donde sólo el tratamiento de L165 es diferente al control con una  $P \leq 0.05$ .

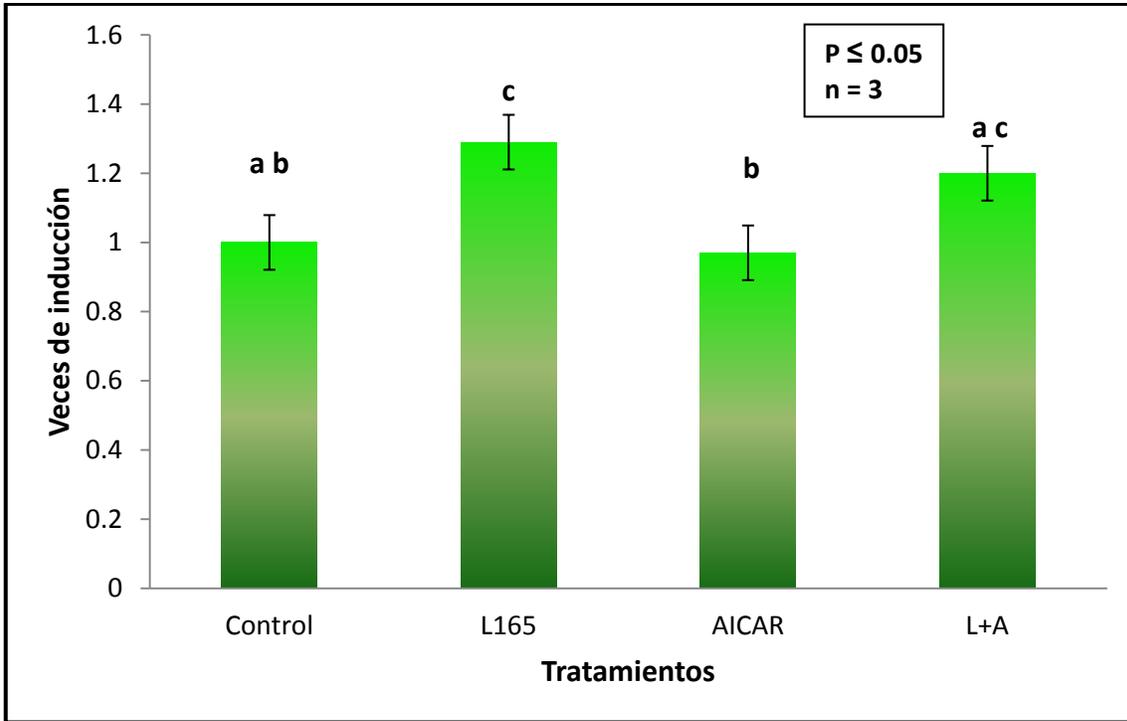


Fig. 28 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de **PGC1α** a las 72hrs.

### 7.7 VALIDACIÓN DEL GEN ENDÓGENO MnSOD Y PPARβ/δ

Para validar el gen endógeno, se hizo una curva de eficiencia del receptor PPARβ/δ y una del gen endógeno MnSOD a las diluciones 1:5, 1:50 y 1:500. La eficiencia de la curva de PPARβ/δ fue de 1.99 y la de MnSOD de 2.04. El valor de la pendiente de los genes PPARβ/δ y MnSOD es de -0.13, lo cual permite utilizar el gen MnSOD como gen de referencia (fig.29).

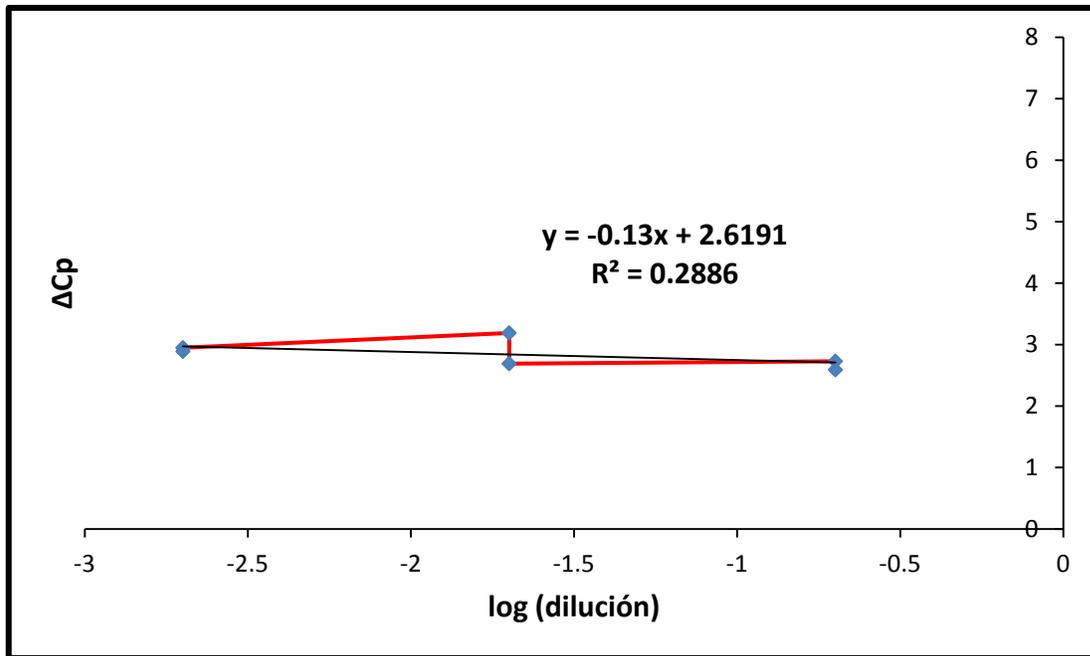


Fig.29 Validación del gen endógeno MnSOD vs PPAR $\beta/\delta$  en la línea celular i28.

### 7.8 MEDIR EL EFECTO DE L165 Y AICAR EN LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE PPAR $\beta/\delta$ EN MIOBLASTOS DE LA LÍNEA i28

En la fig.30 se puede observar el efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  a las 72hrs; en la cual sólo la mezcla de L165 a 10 $\mu$ M y AICAR a 100 $\mu$ M tiene un efecto regulador a la baja en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  con una  $P \leq 0.05$ .

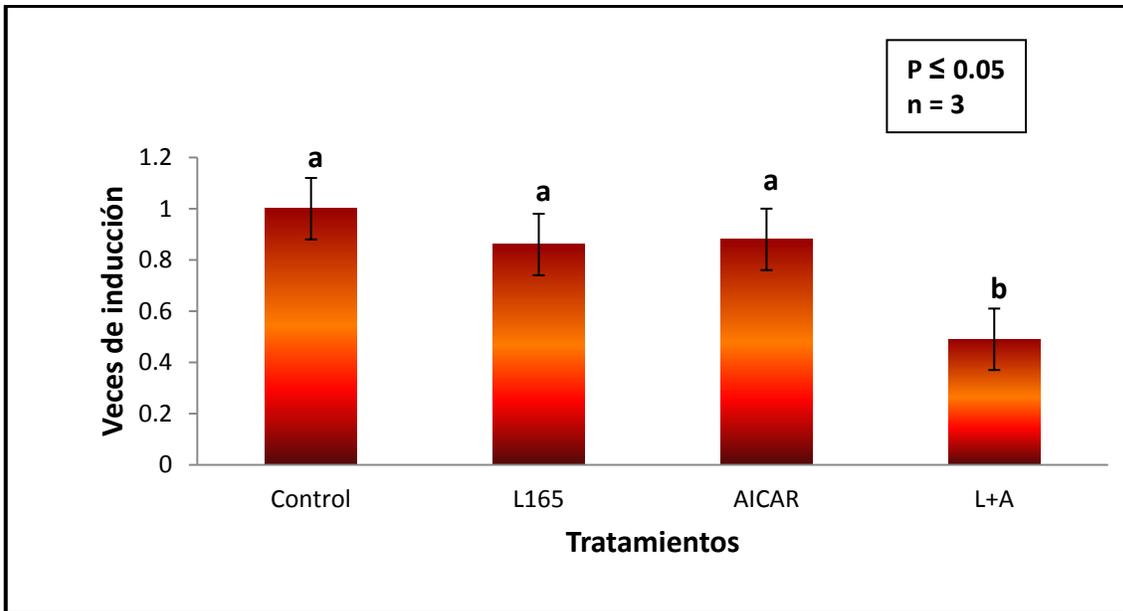


Fig.30 Efecto de L165 y AICAR en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$  a las 72hrs.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 CURVA DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PAX7 Y MIOGENINA

La miogénesis es el proceso por el cual se activan las células satelitales ubicadas en la parte externa de las células musculares, a través de la señalización en situaciones como: proliferación celular, crecimiento y reparación muscular. Uno de los principales marcadores de estas células satelitales es el factor miogénico Pax7 y de acuerdo a la literatura (Lepper et al., 2009; Yokoyama y Asahara, 2011), su expresión disminuye cuando inicia la etapa de la diferenciación muscular. Este comportamiento se observa en la curva de expresión de la proteína Pax7 de la línea celular i28 de mioblastos de ratón en la Fig.21.

Al iniciarse la miogénesis, la expresión de otros factores aumenta como la de Mif5, MioD, Miog y Mif6; los cuales regulan el balance entre la proliferación y diferenciación de las células, que promueven la formación del músculo maduro (Yokoyama y Asahara, 2011). En este trabajo de investigación se seleccionó como marcador a miogenina por ser un factor miogénico involucrado en varias de las etapas como: la proliferación, diferenciación, fusión y formación del músculo maduro (Lepper et al., 2009). En la curva de expresión de la proteína de miogenina (Fig.22) se observa que la expresión aumenta a los dos días de haber agregado el medio de diferenciación y a partir del cuarto día se observa un descenso, lo cual puede deberse a diferentes causas como: al balance entre la proliferación y diferenciación de los mioblastos, el aumento de otros factores reguladores miogénicos como Mif6 que está involucrado en la maduración de las fibras musculares, entre otros (Le Grand y Rudnicki, 2007).

## **8.2 EFECTO DE L165**

Debido a los resultados obtenidos en la Fig.26 donde se observa que a las 72hrs el tratamiento del agonista selectivo de PPAR $\beta/\delta$  L165 tiene un incremento de 4.3 veces contra el grupo control con una P de  $\leq 0.05$  en la expresión del RNAm de miogenina, se seleccionó trabajar con estas muestras, para conocer si este incremento se encuentra relacionado con un aumento en la expresión del RNAm del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$ , sin embargo a las 72 hrs no se observó dicho aumento. Para conocer si el agonista L165 se unió y activó a su receptor PPAR $\beta/\delta$  es necesario hacer un mayor número de estudios (Wang et al., 2004, Escher et al., 2001, De Lange, 2004, Tsintzas et al., 2006, Holst et al., 2003, Ehrenborg y Krook, 2009).

En este trabajo se observó que el aumento en la expresión del RNAm de miogenina está relacionado con un aumento en la expresión del RNAm del coactivador de PGC1 $\alpha$  a las 72hrs (fig.28); con un incremento de 1.3 veces contra el grupo control, con una  $P \leq 0.05$ . PGC1 $\alpha$  es un coactivador del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$  (Lonard y O'Malley, 2007) y su incremento pudo promover la traducción de la proteína de PGC1 $\alpha$ , la cual estaría disponible para su activación por medio de su fosforilación, promoviendo así la transcripción del gen miogenina, sin embargo esto debe ser comprobado (fig,31).

Es necesario realizar más estudios para entender como el agonista selectivo L165 del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$ , especializado en la regulación del metabolismo de los lípidos y glucosa (Tanaka et al., 2003), tiene un efecto en la transcripción del gen de miogenina, el cual es un factor miogénico involucrado en varias etapas de la determinación muscular (Lepper et al., 2009). Esto puede deberse a una respuesta a las diferentes cascadas de señalización, desencadenadas al ser L165 un derivado del ácido graso fenoxiacético. En el músculo esquelético un estado de estrés inducido por ayuno, aumenta los niveles de AGL intracelulares. Algunos de los efectos de la señalización de estos ácidos grasos son: el aumento de la expresión del RNAm de genes involucrados en la atrofia muscular (Krawiec et al., 2007) y la determinación del tipo de fibra muscular oxidativa sobre la glucolítica (Miura et al., 2010). Esto podría deberse a que es necesario encender vías de proliferación, diferenciación, fusión y maduración muscular para mantener el equilibrio entre la degradación y formación de las fibras musculares. Como se observa en el estudio de Gaudel et al., en el 2008, donde los factores miogénicos Mif5 y MioD incrementan la expresión de su proteína con el tratamiento GW0742 el cual es agonista de PPAR $\beta/\delta$ , esto lo realizó con

ratones machos de diez semanas aplicando 1mg/kg del agonista selectivo GW0742 diario, por medio de inyecciones subcutáneas.

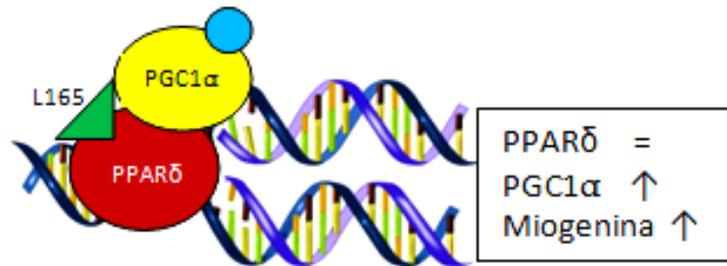


Fig.31 Efecto de L165 a 10 $\mu$ M en el aumento de la expresión del RNAm de miogenina y PGC1 $\alpha$ , en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.

### 8.3 EFECTO DE AICAR

Como se mencionó anteriormente AICAR es un activador de AMPK, que bajo condiciones *in vivo*, actúa como un regulador metabólico importante que se activa en situaciones de baja disponibilidad de energía por los altos niveles celulares de la razón AMP: ATP, desencadenando el consumo de glucosa en el músculo esquelético de manera independiente a la señalización de la insulina (Giri et al., 2004). Uno de los mecanismos por el cual AICAR regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa, es por la fosforilación del coactivador maestro PGC1 $\alpha$ , el cual al fosforilarse por la acción de AICAR se activa (Aschenbach, 2002) permitiendo así la activación de receptores nucleares como PPAR $\beta/\delta$  (fig.32).

En este trabajo no se observó un efecto de AICAR a las 72hrs sobre PPAR $\beta/\delta$  y PGC1 $\alpha$ , sin embargo lo que si se pudo observar es que el uso

del compuesto AICAR a una concentración de 100µM, tiene un efecto en la expresión del RNAm de miogenina. Sin embargo, es necesario comprobar el mecanismo por el cual AICAR tuvo un efecto en el aumento del RNAm de miogenina, ya que este efecto pudo ser de manera directa o indirecta, al funcionar como señal para desencadenar otras rutas.

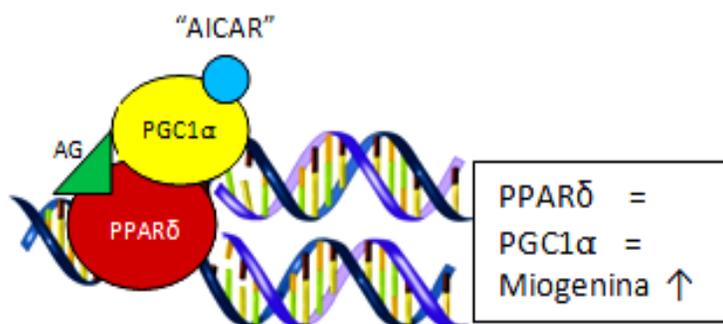


Fig.32 Planteamiento del efecto de AICAR a 100µM en el aumento de la expresión del RNAm de miogenina, en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.

#### 8.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE "AICAR Y L165"

La aplicación de L165, aumenta los niveles de los AGL en las células musculares (Dressel et al., Wang et al., 2003; Holst et al., 2003 y Coll et al., 2010), mientras que la aplicación de AICAR promueve el cambio en la proporción de la razón AMP: ATP (Rutter et al., 2003; Dressel et al., 2003). Con base en esto, una de las hipótesis de este trabajo fue que al mezclar los dos compuestos tendrían un efecto sinérgico, sin embargo no se observó, ya que al mezclar AICAR a 100µM y L165 a

10 $\mu$ M, la expresión de PPAR $\beta/\delta$  disminuyó, y la expresión de PGC1 $\alpha$  y miogenina se mantuvo (fig.33).

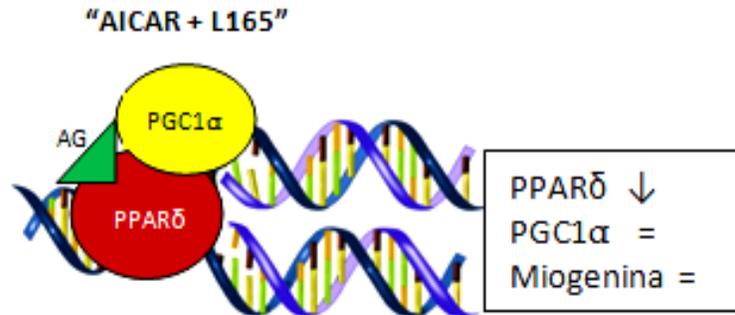


Fig.33 Efecto de "AICAR + L165" a 100 $\mu$ M y 10 $\mu$ M respectivamente en la expresión del RNAm de PPAR $\beta/\delta$ , miogenina y PGC1 $\alpha$ , en la línea celular i28 de mioblastos de ratón.

Una posible explicación de por qué cuando se mezclan los tratamientos de L165 a una concentración de 10 $\mu$ M y AICAR a 100 $\mu$ M los niveles de la expresión de PPAR $\beta/\delta$  disminuyen y los de PGC1 $\alpha$  y Miogenina se mantienen puede deberse a que estos compuestos al mezclarse bloquean su efecto ya que cada compuesto promueve la utilización de diferentes sustratos de energía en el músculo esquelético (Ehrenborg y Krook, 2009, Rutter et al., 2003). Sin embargo esto necesita ser comprobado con otros estudios, donde se manejen también diferentes concentraciones de los tratamientos L165 y AICAR.

## 9. CONCLUSIONES

1. El agonista selectivo de PPAR $\beta/\delta$  L165 a una concentración de 10 $\mu$ M, afectó la expresión del RNAm de miogenina a las 72 hrs en la línea celular i28 de mioblastos de ratón al incrementar 4.3 veces su expresión contra el grupo control con una diferencia estadísticamente significativa de  $P \leq 0.05$ .

El efecto del tratamiento del agonista L165 está relacionado con el incremento del RNAm del coactivador PGC1 $\alpha$ , al incrementar su expresión 1.3 veces contra el grupo control con una  $P \leq 0.05$ .

No se observó un aumento en la expresión del RNAm del receptor PPAR $\beta/\delta$  contra el grupo control al aplicarse el tratamiento del agonista L165.

2. El compuesto AICAR a una concentración de 100 $\mu$ M tuvo un efecto en la expresión del RNAm de miogenina al incrementar su expresión 3.6 veces contra el grupo control a las 72 hrs, con una  $P \leq 0.05$ . El tratamiento del compuesto AICAR no tuvo efecto en la expresión del RNAm del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$  y del coactivador PGC1 $\alpha$ ; ya que no hubo diferencias estadísticas.
3. La mezcla de los dos compuestos AICAR a una concentración de 100 $\mu$ M y L165 a 10 $\mu$ M, no promovió el aumento en la expresión del RNAm de miogenina y del coactivador PGC1 $\alpha$  en comparación con el grupo control, sin embargo se observa una disminución del 50% en la expresión del RNAm del receptor nuclear PPAR $\beta/\delta$  a la del grupo control con una  $P \leq 0.05$ .

## 10. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones de este trabajo de investigación, es necesario realizar más investigaciones *in vivo e in vitro*, para conocer si el aumento en la expresión del RNAm de Miogenina por los tratamientos de L165 y AICAR promueve un aumento en la masa muscular y por lo tanto una mejor canal en animales productores de carne.

## 11. REFERENCIAS

Aschenbach W, Hishman M, Fujii N, Sakamoto K. 2002. Effect of AICAR treatment on glycogen metabolism in skeletal muscle. *Diabetes* 51.

Bugge A and Mandrup S. 2010. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* ID.169506.

Buckingham M. 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 11:440- 448.

Calberg C, Seuter S. 2010. Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. *Trends Cell Biol.* 17:292-301

Coll T, Guardia A, Barroso E, Foix A, et al. 2010. Activation of peroxisome proliferator activated receptor  $\delta$  by GW501516 prevents fatty acid induced nuclear factor Kappa  $\beta$  activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinol* 151:1560-1569.

Costa D, Bajanca D, Rodríguez A, Tome R, Corthals G, Macedo-Ribeiro S, Paulson H, Logarinho E, and Maciel P. 2010. Ataxin-3 plays a role in mouse myogenic differentiation through regulation of integrin subunit levels. *PLoS One.* 5:11728.

De Lange P, Farina P, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E. 2007. Sequential changes in the signal transduction responses Of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB J.* 200:629.

Dodson M, Hausman G, Guan L, Du M, Rasmussen T, Poulos S, Mir P, Bergen W, Fernyhough M, McFarland D, Rhoads R. 2010. Skeletal muscle stem cells from animals. *Int J Biol Sci.* 6:465-474.

Dressel U, Allen T, Pippal J, Rohde P, Lau P, and Muscat G. 2003. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 17:2477-2493.

Du M, Shen QW, Zhu MJ, Ford SP. 2007. Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J Anim Sci.* 85:919-27.

Ehrenborg E and Krook A. 2009. Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$ . *PharmRev.* 61:1560.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, and Desvergne B. 2001. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinol.* 142:4195-202.

Feige J and Auwerex J. 2007. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 177:936-51.

Fluck M and Hoppeler H. 2007. Molecular basis of skeletal muscle plasticity from gene to form and function. *Univ. of Bern.* 26, 3000.

Gaudel C, Schwartz C, Giordano C, Abumrad N, and Grimaldi P. 2008. Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E297-E304.

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, and Laudet V. 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 58:685-704.

Gervois P, Fruchart J and Staels B. 2007. Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonist of peroxisome proliferator activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3(2):145-56.

Giri S, Nath N, Smith B. 2004. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-1- $\beta$ -Ribofuranoside Inhibits Proinflammatory Response in Glial Cells: A

Possible Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Jour of Neuros.* 24: 479–487 .

Gundersen K. 2010, Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biol Rev.* 10.1111.

Harridge SD. 2007. Plasticity of human skeletal muscle: gene expresion to in vivo function. *Exp. Physiol.* 92(5): 783-97.

Hettmer S and Wagers A. 2010. Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med.* 16-2.

Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, and Grimaldi PA. 2003. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1633:43-50.

Jucker B, Yang D, Casey W, Olzinski A, Williams C, Lenhard S, Legos J, Hawk C. 2007. Slective PPARdelta agonist treatment increases skeletal muscle lipid metabolism without altering mitochondrial energy coupling: an *in vivo* magnetic resoncance spectroscopy study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1256-E1264.

Kota B, Huang T and Roufugalis. 2004. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharm. Res.* 85-94.

Kleiner S, Nguyen-Tran V, Bare O, Huang X, Spiegelman B, and Wu Z. 2009. PPAR(delta) agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1(alpha) but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem.* 284:18624-33.

Krämer D, Al Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves P, and Krook A. 2007. Role of AMP kinasa and PPARdleta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 282:19313-19320.

Krawiec B, Nystrom G, Frost R, Jefferson L and Lang C. 2007. AMP-activated protein kinase agonist increase mRNA content of the muscle specific ubiquitin ligases MAFbx and Murf1 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: 1555-1567.

Le Grand F and Rudnicki MA. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 19:628-33.

Lepper C. and Fan C. 2010. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *NIH 48*: 424–436. doi:10.1002/dvg.20630.

Livak K and Schmittgen D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$ . *Eis Sci Met* 25:402-8.

Liu C and Lin J. 2009. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Mol Cell Biol.* 29:6257-67.

Lonard DM and O'malley BW. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell.*27:691-700.

Lu M and Krauss R. 2010. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:4212-7.

Miura S, Kai Y, Ono M and Ezaki O. 2003. Overexpression of peroxisome proliferator activated receptor  $\delta$  coactivator 1 $\alpha$  down regulates glut4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem.* 278:33.

Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R and Croff F. 2010. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res*, ID 435689.

Narkar V, Downes M, Yu R, Emblar E, Wang Y, Banayo E, Mihaylova M, Nelson M, Zou Y, Juguilon H, et al. 2008. AMPK and PPARdelta agonist are exercise mimetics. *Cell* 134:405-415.

Park K, Sheffler T, Spurlock M, Grant A and Gerrad D. 2009. Chronic activation of 5 AMP activated protein kinase changes myosin heavy chain expression in growing pigs. *J Anim Sci.* 87:3124-3123.

Perry R and Rudnick M. 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci.* 5:D750-67.

Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. 2003 Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes.*52:657-62.

Rennie M, Wackerhage H, Spangenburg E, Booth F. 2008. Control Size of human muscle mass. *Annu Rev Physiol.* 2004:66:799-828

Risérus U, Sprecher D, Johnson T. 2008. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diab* 57:332-9.

Rutter G, Silva G and Leclerc I. 2003. Roles of 5'AMP activated protein kinase AMPK in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J.* 375, 1-16.

Sanderson M, Degenhardt T, Koppen A, Kalkhoven E, Desvergne B, Müller M, Kersten S. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol.* 30:4977.

Schiefelbein D, Seitz O, Goren I, Dissmann JP, Schmidt H, Bachmann M, Sader R, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S. 2008. Keratinocyte-derived vascular endothelial growth factor biosynthesis represents a pleiotropic side effect of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone but not rosiglitazone and involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase: implications for diabetes-impaired skin repair. *Mol Pharmacol.* 74:952-63.

Schug T, Berry D, Shaw N, Travis S, and Noy N. 2007. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell.* 129:723-33.

Shavlakadze T, Chai J, Maley K, Cozens G, Grounds G, Winn N, Rosenthal N, and Grounds M. 2010. A growth stimulus is needed for IGF-1 to induce skeletal muscle hypertrophy *in vivo*. *J Cell Sci.* 123:960-71.

Spangenburg E and Booth F. 2003. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 178:413-424.

Sprecher D, Massian C, Pearce G, Billin A, Perlstein I, Willson T, et al. 2007. Triglyceride: high-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator active receptor delta agonist. *Arter Thromb Vasc Biol* 27:359-365.

Stavinoha MA, RaySpellicy JW, Essop MF, Graveleau C, Abel ED, Hart-Sailors ML, Mersmann HJ, Bray MS, Young ME. 2004. Evidence for mitochondrial thioesterase as a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-regulated gene in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287:888-95.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, et al. 2003. Activation of peroxisome proliferator activated receptor  $\beta$  induces fatty acid  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. PNAS 100:26.

Tsintzas K, Jewell K, Kamran M, Laithwaite D, Boonsong T, Littlewood J, Macdonald I and Bennett A. 2006. Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. J Physiol. 291-303.

Wang , Zhang C, Yu R, Cho H, Nelson M, Bayuga-Ocampo C, Ham J, Kang H, and Evans R. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. PLoS Biol. 2:294.

Wessel T, Haan A, Laarse W and Jaspers R. 2010. The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism?. Eur J Appl Physiol. 110:665-694.

Yessoufou A and Whali W. 2010. Multifaceted roles of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. Chromosoma. 479:84.

Yokoyama S and Asahara H. 2011. The myogenic transcriptional network. Cell Mol Life Sci. 68(11): 1843-1849. PMC3092062.

Yu S and Reddy J. 2007. Transcription Coactivators for peroxisome proliferator activated receptors. Biochim Biophys. 1771:936-51.