



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

### **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

# **Estudio del impacto del síndrome metabólico sobre la vía de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) en el músculo esquelético de rata mediante análisis de fosfoproteómica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Blanca Viridiana Alcantar González

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Horacio Reyes Vivas  
Instituto Nacional de Pediatría

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Karla Carvajal Aguilera  
Instituto Nacional de Pediatría

Dra. Adela Rodríguez Romero  
Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México, enero del 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



CGEP/PMDCB/1912/2019

**Alcántar González Blanca Viridiana**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "Estudio del impacto del síndrome metabólico sobre la vía de la cinasa dependiente de AMP (AMPK), en el músculo esquelético de rata mediante análisis de fosfoproteómica.", dirigida por el/la Dr(a). **Reyes Vivas Horacio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Zaraín Herzberg Ángel Alfonso
VOCAL	Gómez Víquez Leticia
VOCAL	Zazueta Cecilia
VOCAL	Ortega Aguilar Alicia
SECRETARIO	Ambrosio Hernández Javier Rolando

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019.  
COORDINADORA

Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel: 5623 7006

**Lugar de realización del proyecto:** Laboratorios de Bioquímica Genética y Nutrición Experimental de la torre de investigación del Instituto Nacional de Pediatría con recursos del Instituto Nacional de Pediatría.

**Sustentante:** Blanca Viridiana Alcantar Gonzalez



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, por haberme aceptado y apoyado en mis estudios de maestría.

Agradezco el apoyo recibido de los Laboratorios de Bioquímica Genética y Nutrición Experimental de la torre de investigación del Instituto Nacional de Pediatría por apoyar el desarrollo del presente estudio.

Agradezco el apoyo recibido por CONACYT de la beca y al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP).

Agradezco especial y enormemente a la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera por darme la oportunidad de ser mejor persona de lo que entonces era, por su confianza, paciencia y apoyo incondicional desde antes del inicio de este proyecto, por ver algo en mí y conducirme a que yo misma me diera cuenta, por recomendarme con mi tutor principal.

Agradezco a mi tutor principal, el Dr. Horacio Reyes Vivas por aceptarme como su alumna y a la Dra. Adela Rodríguez Romero apoyarme en mi formación.

Agradezco a los miembros de mi comité jurado por sus comentarios, sugerencias y correcciones al presente escrito, respeto su trabajo y admiro su ética en pro de la labor por la ciencia para el bienestar de todos.

Agradezco con mucho cariño a cada miembro del Laboratorio de Nutrición Experimental por los que estuvieron antes de mí y por los que convivieron conmigo, fueron mis amigos y mi familia, celebrando mis éxitos y apoyando en mis fracasos.

Agradezco a Ime Gonzalez que hizo por mí todos los trámites administrativos, recolección de firmas y entrega de documentos.

Gracias a todos los que colaboraron directa o indirectamente para obtener este trabajo.



## **DEDICATORIA**

A todos aquellos que buscan romper esquemas y paradigmas, a los buscadores, a mis alumnos que me formaron como docente, a mis maestros que me formaron como alumno y a mi familia que me formó con valores y el coraje de salir a buscar mi plenitud como ser humano.

A la mujer del desierto que siempre me dice que puedo con eso y más...



# ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>RESÚMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>7</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
7.1	Músculo esquelético.....	16
7.2	Contracción muscular.....	19
7.2.1	Teoría del deslizamiento de los filamentos.....	24
7.3	Tipos de fibras musculares .....	26
7.3.1	Fibras de contracción lenta.....	27
7.3.2	Fibras de contracción rápida .....	28
7.4	Cinasa dependiente de AMP.....	31
<b>8</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>35</b>
8.1	AMPK y su relación con el ejercicio .....	35
8.2	Estudios de Fosfoproteómica.....	37
<b>9</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>11</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
11.1	Hipótesis .....	40
11.2	Objetivo General .....	41
11.2.1	Objetivos Específicos .....	41
<b>12</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>44</b>



12.1	Inducción del SM por una dieta alta en hidratos de carbono en rata ....	44
12.2	Determinación de la expresión de AMPK total en el SOL y EDL de rata	44
12.3	Determinación de la fosforilación de AMPK por contracción <i>in vitro</i> del ME aislado de rata.....	45
12.4	Lisis del tejido muscular .....	45
12.5	Cuantificación de concentración de proteína .....	46
12.6	Protocolo de activación de AMPK de manera crónica <i>in vivo</i> por efecto de la actividad física .....	46
12.7	Análisis del fosfoproteoma por isoelectroenfoque (IEE).....	47
12.8	Análisis estadístico .....	50
<b>13</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
13.1	Obtención del modelo de SM en rata.....	51
13.2	Evaluación de la expresión de AMPK y su fosforilación en condiciones basales en SOL y EDL .....	53
13.3	Aumento de la fosforilación de AMPK en el SOL aislado en respuesta a la contracción.....	56
13.4	Evaluación de la activación crónica de AMPK en condiciones basales en el SOL	58
13.5	Aumento de la fosforilación de AMPK en condiciones de activación crónica en el SOL en respuesta a la contracción.....	61
13.6	Expresión y fosforilación de AMPK en el SOL de ratas sin tratamiento	63
13.7	Perfil de fosforilación de proteínas por la activación de AMPK del SOL de rata con SM en respuesta a la contracción.....	64
<b>14</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>15</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>16</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>17</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>18</b>	<b>APÉNDICE .....</b>	<b>79</b>



## 1 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estructura del músculo esquelético.</b> .....	17
<b>Figura 2. Descripción gráfica de una fibra muscular y sus elementos contráctiles.</b> .....	19
<b>Figura 3. Filamento grueso de miosina.</b> .....	21
<b>Figura 4. Filamento de actina.</b> .....	22
<b>Figura 5. Mecanismo de la contracción muscular desde un estado de reposo.</b> .....	23
<b>Figura 6. Hidrólisis del ATP como mecanismo de la contracción muscular.</b> .....	26
<b>Figura 7. Representación esquemática de la técnica de Isoelectroenfoque.</b> .....	50
<b>Figura 8. Imágenes de Western blot representativo para AMPK (A) y su fosforilación en condiciones basales (D) del SOL y EDL de ratas control y SM.</b> .....	53
<b>Figura 9. Imágenes de Western blot representativo para el aumento de la fosforilación relativa de AMPK en músculo sóleo y EDL por contracción (A).</b> .....	56
<b>Figura 10. Imágenes de Western blot representativo para la expresión y fosforilación de AMPK estimulada de manera crónica en condiciones basales del SOL de ratas SM (A).</b> .....	58
<b>Figura 11. Imágenes de Western blot representativo para el aumento de la fosforilación relativa de AMPK del SOL por contracción.</b> .....	61
<b>Figura 12. Imágenes de Western blot representativo para la expresión y fosforilación de AMPK del SOL de rata (A).</b> .....	63
<b>Figura 13. Imágenes de Western blot para AMPK, AMPK-P y Serina/treonina-P del SOL rata SM.</b> .....	64





## 2 ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Características de las fibras musculares según su tipo.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 2. Características de las ratas del grupo control y SM tras una dieta alta en hidratos de carbono. ..</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 3. Buffers usados para electroforesis, transferencia y WB.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 4 . Buffer de lisis anti fosfatasas y anti proteasas. ....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 5. Anticuerpos para western blot.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 6. Buffer de Ringer Krebs.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 7. Equipos.....</i>	<i>83</i>



### 3 ABREVIATURAS

<b>ACC</b>	Acetil CoA Carboxilasa
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>AICAR</b>	5-amino-imidazol-carboxamida-4 1- $\beta$ -D-ribofuranósido, 5 4-carboxamida-
<b>AMP</b>	Aminoimidazol ribonucleósido, acadesina
<b>AMPK</b>	Adenosín monofosfato
<b>ATP</b>	Cinasa activada por AMP
<b>ATP III</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATP III</b>	Del inglés: Guías para tratamiento de dislipidemias en el adulto III
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CaMK</b>	Cinasa dependiente de calcio/calmodulina
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CPT1</b>	Carnitina Palmitoil Transferansa 1
<b>EDL</b>	Extensor digitorum longus
<b>FT</b>	Del inglés: fast-twitch
<b>GLUT 4</b>	Transportadores de glucosa 4
<b>IEE</b>	Isoelectroenfoque
<b>IMAC</b>	Del inglés: afinidad iónica en micro columna
<b>LKB1</b>	Cinasa de hígado B1
<b>ME</b>	Músculo esquelético
<b>MHC</b>	Del inglés: Cadenas pesadas de miosina
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PFK1</b>	Fosfofructocinasa 1
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>PVDF</b>	Polidivinilo de Fluoruro
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SOL</b>	Sóleus
<b>ST</b>	Del inglés: slow twitch
<b><math>\beta</math>-GPA</b>	$\beta$ – ácido guanidopropiónico



## 4 RESÚMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo cardiovascular compuesto de dislipidemias, obesidad, hipertensión y diabetes tipo 2. Su común denominador es la resistencia a la insulina (RI) por lo que se propone como un mecanismo importante de la causa del SM. Se sugiere que las alteraciones inducidas por el SM que se presentan en diferentes órganos y tejidos se deben a afectaciones en las proteínas de vías de señalización como la AMPK que interviene en la regulación del metabolismo energético de manera diferencial en músculo esquelético. Es importante dilucidar los efectos del SM a nivel de señalización celular, es decir, en el proteoma y en el perfil de proteínas fosforiladas. Por lo que en el presente estudio nos propusimos determinar los efectos del SM sobre las proteínas de la vía de señalización de AMPK y cómo afectan la cantidad y fosforilación de esta proteína en el ME de rata con SM.

### Metodología

Se indujo el SM a diferentes grupos de ratas por alimentación con sacarosa al 30% en agua de beber por 16 semanas, a las que posteriormente se les aplicó tratamiento de ejercicio y metformina respectivamente. Otro grupo sirvió como control al no recibir sacarosa en su bebida. De estas ratas se aislaron sóleos y extensores largos de los dedos. Se determinó la cantidad total y estado de fosforilación de AMPK por Western Blot. La estandarización del perfil de fosforilación de la vía se realizó mediante isoelectroenfoque (IEE).

### Resultados

El SM disminuye la expresión y fosforilación de AMPK en sóleo (SOL), no así en el extensor digitorum longus (EDL). Tanto el ejercicio como el fármaco revierten la afectación causada por el SM. El ejercicio tiende a disminuir la cantidad de grasa visceral. Se estandarizó la técnica de IEE para determinar el perfil fosfoproteómico derivado de la activación de AMPK en ME en respuesta a la contracción.

### Conclusión

El SM altera la vía de señalización de AMPK pues impacta de manera directa en la expresión y fosforilación de AMPK en el músculo de tipo oxidativo como lo es el sóleo. El ejercicio incrementa tanto la expresión como el estado de fosforilación de AMPK y el aumento en su fosforilación en respuesta a la contracción, impactando en la disminución de la cantidad de grasa visceral, incluso mejor que el fármaco.



## 5 ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a set of cardiovascular risk factors composed of dyslipidemias, obesity, hypertension and type 2 diabetes. Its common denominator is insulin resistance (IR) and is therefore proposed as an important mechanism of the cause of the MS. It is suggested that the MS-induced alterations that occur in different organs and tissues are due to effects on signaling pathway proteins such as AMPK that intervenes in the regulation of energy metabolism differentially in skeletal muscle (SM). It is important to elucidate the effects of MS at the level of cellular signaling, that is, on the proteome and on the phosphorylated protein profile. Therefore, in the present study we set out to determine the effects of MS on AMPK signaling pathway proteins and how they affect the amount and phosphorylation of this protein in rat SM with MS.

### Methodology

MS was induced to different groups of rats by feeding with 30% sucrose in drinking water for 16 weeks, to which they subsequently applied exercise treatment and metformin respectively. Another group served as a control by not receiving sucrose in their drink. From these rats, solos and long finger extenders were isolated. The total amount and phosphorylation status of AMPK was determined by Western Blot. The standardization of the phosphorylation profile of the pathway was performed by isoelectric focusing (IEE).

### Results

MS decreases the expression and phosphorylation of AMPK in soleus (SOL), but not in the extensor digitorum longus (EDL). Both, exercise and the drug reverse the affectation caused by MS. Exercise tends to decrease the amount of visceral fat. The IEE technique was standardized to determine the phosphoproteomic profile derived from the activation of AMPK in ME in response to contraction.

### Conclusion

The SM alters the AMPK signaling pathway as it directly impacts the expression and phosphorylation of AMPK in the oxidative type muscle such as soleus. Exercise increases both the expression and phosphorylation status of AMPK and the increase in its phosphorylation in response to contraction, impacting on the decrease in the amount of visceral fat, even better than the drug.



## 6 INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) se define como la asociación de varios factores de riesgo cardiovasculares presentes en un individuo. Enfermedades como la obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemias e hipertensión forman parte del síndrome metabólico y el factor común es la resistencia a la insulina (RI) que se define como la incapacidad de los tejidos periféricos a responder a esta hormona en concentraciones fisiológicas (Reaven, 1988).

La organización mundial de la salud (OMS) propone que para que el SM pueda diagnosticarse, se requiere de la presencia de al menos 3 de 5 factores, entre los que se encuentran un aumento superior a 90 cm en la circunferencia de cintura, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa (Albert, 1998.)

Las enfermedades que se incluyen dentro del SM se caracterizan por presentar un desorden en el metabolismo energético que ocasiona el mal funcionamiento de proteínas involucradas en vías de señalización que controlan el metabolismo energético celular, tales como la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la proteína cinasa AKT que regula la vía de señalización de la insulina (Jorgensen, 2009; Long, 2006).



La proteína AMPK es una cinasa que fosforila proteínas en residuos Serina/Treonina y funciona como enzima reguladora del metabolismo celular, apagando vías anabólicas que consumen Adenosin Trifosfato (ATP) y encendiendo vías catabólicas que lo producen.

AMPK se activa a través de la fosforilación de la treonina 172 en la subunidad catalítica  $\alpha$  por proteínas cinasas que se encuentran río arriba como la cinasa de hígado B1 (LKB1) y la cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK), en respuesta a procesos fisiológicos que consumen ATP, como ocurre durante el ejercicio. Al activarse AMPK regula el metabolismo de lípidos debido a que al fosforilar a la Acetil CoA Carboxilasa (ACC) se inhibe su actividad; de esta manera, al disminuir los niveles de malonil-CoA, se libera la inhibición de la Carnitina Palmitoil Transferasa 1 (CPT1), provocando la oxidación de ácidos grasos. Otros de sus blancos directos son la Fosfofructocinasa 1 (PFK1), involucrada en procesos catabólicos de hidratos de carbono y mTOR, relacionado con la síntesis de proteínas (Khan 2005).

Tanto la vía de señalización de AMPK como la de AKT están estrechamente involucradas en la captación de glucosa postprandial, ya que ambas fosforilan a TBC1D4 y TBC1D1, provocando la liberación de las vesículas que contienen GLUT 4 para que estas se transloquen hacia la membrana plasmática y la glucosa



pueda ser captada e introducida al interior de la célula (Friedrichsen 2013, Richter 2013).

El músculo esquelético (ME) es el órgano que capta mayor cantidad de glucosa en condición postprandial y representa alrededor del 40% de la masa corporal en personas sanas. Se caracteriza principalmente por su actividad mecánica requerida para la postura, movimiento y respiración, que dependen de las contracciones de la fibra muscular, esta función se lleva a cabo por el consumo de energía en forma de ATP, obtenidos del metabolismo catabólico de glucosa, ácidos grasos y en condiciones extremas, de proteínas (Pedersen 2012). Por lo que alteraciones en este proceso en el músculo, favorecen la hiperglucemia e hipertrigliceridemia que son características de la RI.

Por otro lado, el ejercicio ofrece beneficios a nivel metabólico a través de la contracción muscular, pues se incrementa la actividad de enzimas claves en la  $\beta$ -oxidación, se incrementa la captación de glucosa independiente a la insulina en el ME a través de la vía de AMPK; además de que un efecto posterior al ejercicio es la sensibilización de la vía de la insulina en el ME (Cao 2012; Gulli, 2012; Richter 2013).



La función principal de la vía de AMPK es la fosforilación de proteínas relacionadas con el catabolismo de hidratos de carbono y lípidos, por lo que una disminución en la fosforilación de AMPK, podría sugerir un mecanismo celular para el desarrollo de RI y sus co-morbilidades asociadas como dislipidemias y alteración en la captación de glucosa en el ME. Por tanto, el estudio de las alteraciones en el ME de esta cinasa ayudará a comprender algunas fisiopatologías relacionadas con cambios en la actividad de la AMPK inducidas, por ejemplo, por modificaciones post traduccionales.

La metformina es un agente farmacéutico antihiper glucemiente que procede de la planta *Galega Officialis*, es un activador indirecto de AMPK ya que disminuye los niveles de ATP en relación con el AMP/ADP debido a que inhibe al complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria.

Misu en el 2002 en un estudio realizado en personas con diabetes mellitus tipo 2 a quienes les suministró metformina durante 10 semanas, encontró un aumento significativo en la fosforilación de AMPK en el músculo esquelético en relación con el grupo control ese aumento en la fosforilación correlaciona con la disminución del glucógeno muscular, fosfocreatina, triacilglicéridos y glucosa.





## 7 MARCO TEÓRICO

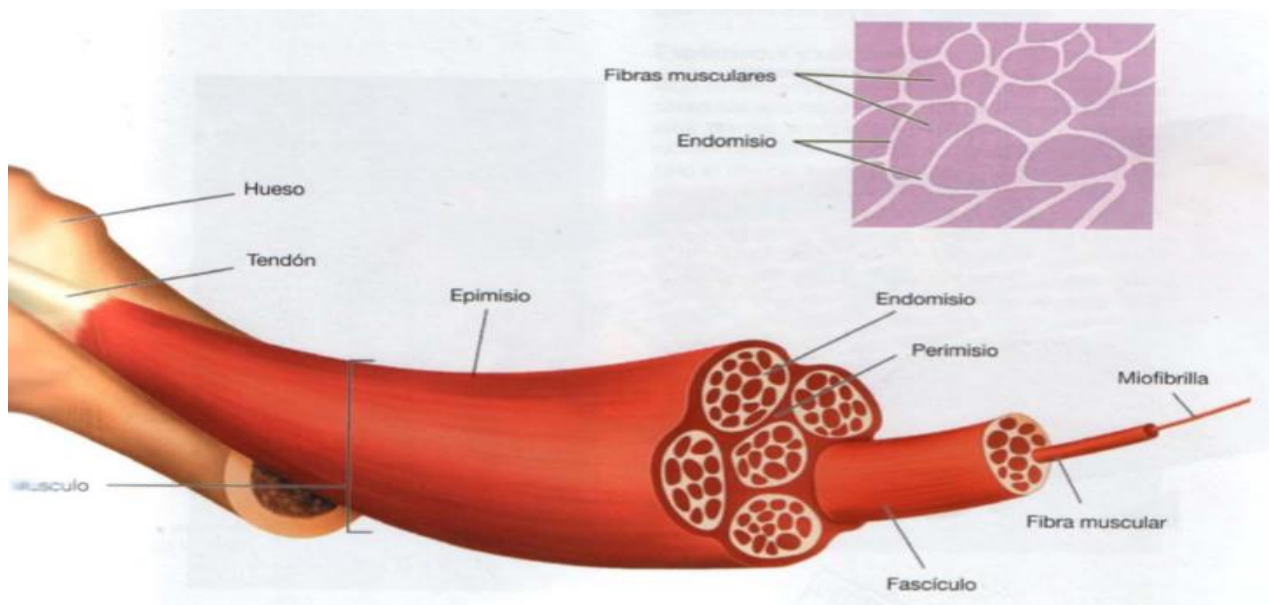
### 7.1 Músculo esquelético

El Músculo esquelético (ME) o tejido estriado está conformado por diferentes vainas bien reforzadas que se unen entre sí por tejido conjuntivo que le da estabilidad al músculo. En primer lugar, tenemos a las miofibrillas que en conjunto forman fibras musculares recubiertas por el endomisio formando fascículos envueltos entre ellos por el perimisio. Los conjuntos de fascículos forman el músculo en su totalidad y es envuelto por el epimisio que sirve para dar estructura y para unir al músculo a superficies óseas o esqueleto, permitiendo su movimiento por la cualidad muscular de ser elástico, plástico, elongable y contráctil (Ashmore et Doerr, 1971) (Figura 1).

La fibra muscular es la célula o miocito diferenciado, tienen una forma cilíndrica y alargada cuyo diámetro varía entre 10-80  $\mu\text{M}$  con una longitud desde 1 mm a 35 cm, esto en dependencia del tamaño del músculo. A lo largo de la fibra se encuentran múltiples núcleos justo por debajo de la membrana que lo recubre de manera individual llamada sarcolema y que se funde con los tendones en sus extremos distales insertándose en el hueso.



La parte fluida en el interior del sarcolema es el sarcoplasma, el equivalente al citoplasma que contiene depósitos de glucógeno, minerales, lípidos, enzimas y mioglobina que sirve como acarreador de oxígeno y le da el color rojizo a la célula, además de organelos y sarcosomas como se les llama a las mitocondrias encargadas de producir ATP, la molécula de importancia energética.



**Figura 1. Estructura del músculo esquelético.**  
(Tomado de Willmore y Costill, 5ª. Ed. Fisiología del Esfuerzo Humano, Paidotribo)

A lo largo de la fibra muscular se encuentra una red de vesículas o reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , en el sarcoplasma. Presentan una disposición longitudinal y se interconectan con invaginaciones llamadas túbulos T que se integran entre las fibras formando una triada que favorece la comunicación entre ellas y permite la propagación del estímulo para la contracción (Figura 5).



Dentro de la fibra muscular se encuentran estructuras filamentosas correspondientes a proteínas contráctiles como la actina y la miosina, estos filamentos presentan un arreglo hexagonal tridimensional, debido al acomodo 3:1 de actina y miosina respectivamente.

Son estas proteínas las que proporcionan la característica de estriado al músculo, ya que su distribución longitudinal presenta uniones y espacios entre los filamentos y según sus interacciones se observan una serie de bandas claras y oscuras por sus correspondientes propiedades de reflejar luz al observar el tejido muscular bajo el microscopio de luz polarizada (Figura 2).

Estas bandas que se observan en la estructura de la miofibrilla reciben las siguientes denominaciones:

**Bandas A (anisotrópicas):** Son zonas formadas por filamentos de actina y en cuyos extremos se encuentran separados por filamentos de miosina.

**Zona H:** De la palabra Hell que Significa *clara* en alemán y en la que se observa a la miosina en forma perpendicular sólo cuando la miofibrilla está relajada.

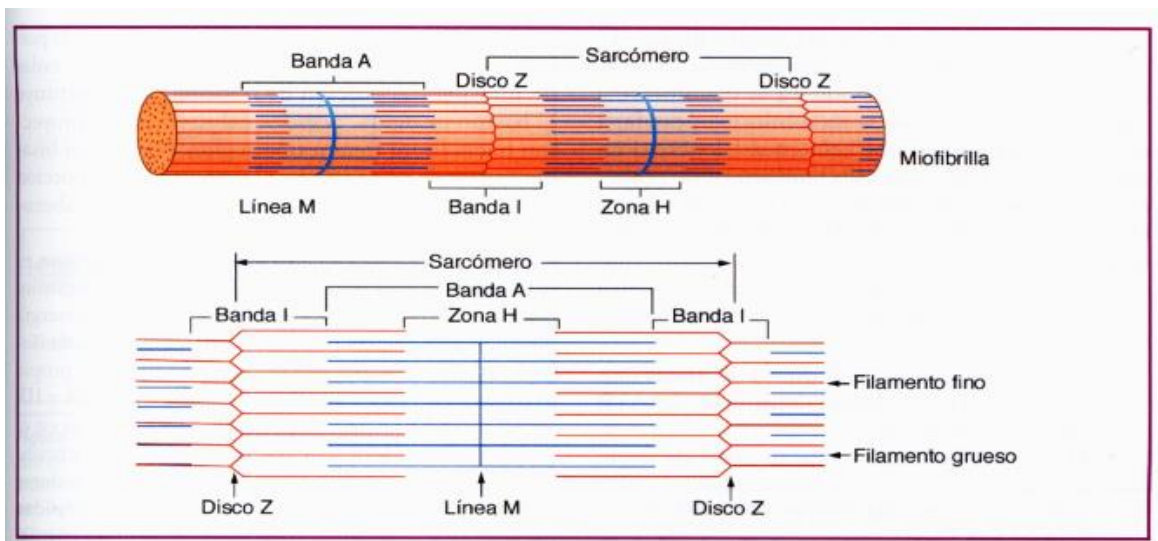
**Línea M:** De la palabra Mitte que Significa *mitad* en alemán. Señala la conexión cruzada entre los filamentos de miosina justo a la mitad de la banda A.

**Discos Z:** De la palabra Zwischen que Significa *entre* en alemán. Unión de filamentos de actina en forma de zig-zag.



Bandas I (isotrópicas): Comprende el espacio entre una banda A y otra, justo en el medio se encuentra un disco Z.

Entre dos discos Z se encuentra la mínima unidad funcional de la miofibrilla, el sarcómero, es en esta unidad donde se lleva a cabo la contracción miofibrilar y por la cual el músculo completo llega a contraerse.



**Figura 2.** Descripción gráfica de una fibra muscular y sus elementos contráctiles. (Tomada de López y Fernández, 3<sup>a</sup>. Ed. Fisiología del Ejercicio, Panamericana. Buenos Aires.)

## 7.2 Contracción muscular

El sólo hecho de mantener una postura requiere de una tensión muscular producida por contracciones musculares que participan en sostener un tono muscular, esto se lleva a cabo con un consumo de energía en forma de ATP. Lo mismo sucede para respirar, trasladarnos, hacer ejercicio, realizar movimientos



finos (como escribir o dibujar) para movimientos gruesos, como levantar objetos pesados o conservar un buen paso en una banda de caminata.

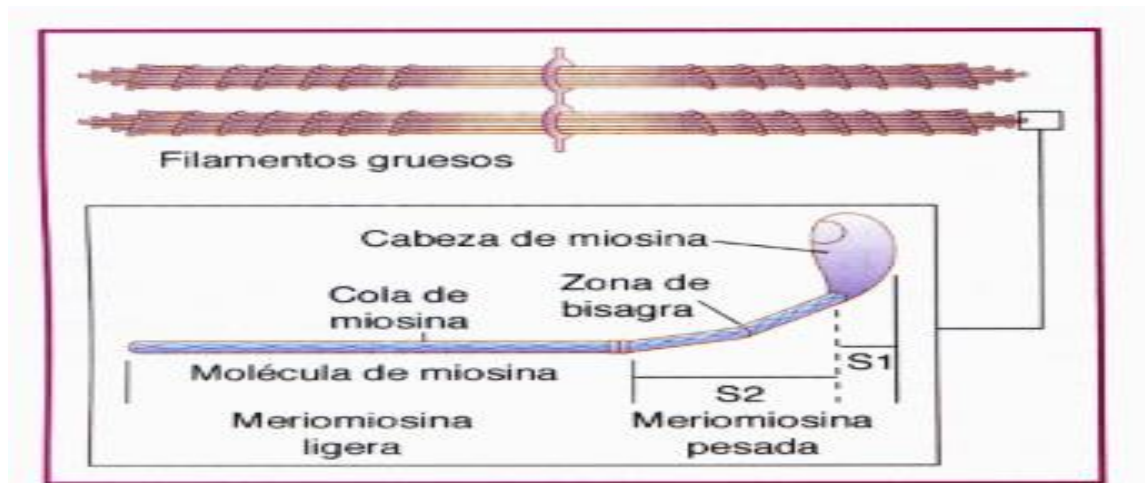
Las proteínas y complejos contráctiles que llevan a cabo esta acción muscular permiten la función del músculo.

Se describen a proteínas que forman parte de filamentos delgados como la actina, troponina y nebulina, actúan de manera sinérgica con proteínas como miosina, titina y algunas cinasas que componen a los filamentos gruesos. En conjunto, la interacción de ambos complejos fibrilares regulados por la presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y el ATP como forma de energía llevan a cabo la contracción muscular (Figura 3).

La miosina está formada por dos hilos fibrilares, uno se enrolla en su extremo distal para formar cabezas globulares denominadas cabeza de miosina. Esta estructura o cola de miosina se compone de estructuras más pequeñas como la meromiosina ligera, que esencialmente es la cola de la miosina; y la meromiosina pesada que está conformada por las regiones S2 y S1, unida por una zona elástica en forma de bisagra. La región S1 corresponde a la cabeza de miosina, que incluye una fracción de unión a actina y otra con función de ATPasa, hidrolizando al ATP para producir tanto la liberación de la actina como el movimiento de la cabeza hacia otro sitio de unión con actina. Esta bisagra permite el movimiento o "golpe de movimiento" y giro de la cabeza de miosina para



situarse en el punto de inserción de la actina y producir el acortamiento entre las miofibrillas, lo que provoca la contracción o relajación de las fibras musculares dependiendo de la presencia o ausencia del estímulo.



**Figura 3. Filamento grueso de miosina.**

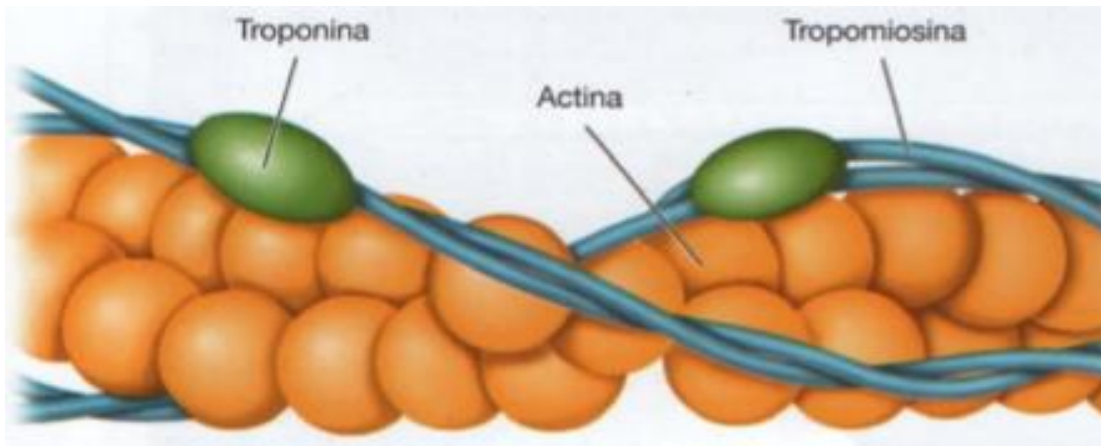
*La cabeza de miosina al hacer contacto con actina genera la contracción muscular. (Tomada de López y Fernández, 3ª. Ed. Fisiología del Ejercicio, Panamericana. Buenos Aires.)*

Existen otras proteínas que sirven para dar estabilidad a las fibras como la titina, que es una molécula elástica que refuerza a la miosina y nebulina.

Por otra parte, la actina está formada por actina fibrilar (F) compuesta por moléculas de actina globular (G), que dan la estructura proteica de fibras delgadas. En la parte externa de cada microfilamento de actina, ésta proteína forma un arreglo proteico con la troponina, que interactúa junto con la tropomiosina dispuesta como un hilo alrededor de la actina. Estas proteínas ofrecen una conformación relajada de la actina, ya que interfieren entre los sitios



en donde se une la miosina con la actina y se lleva a cabo la contracción muscular (Figura 5).



**Figura 4. Filamento de actina.**

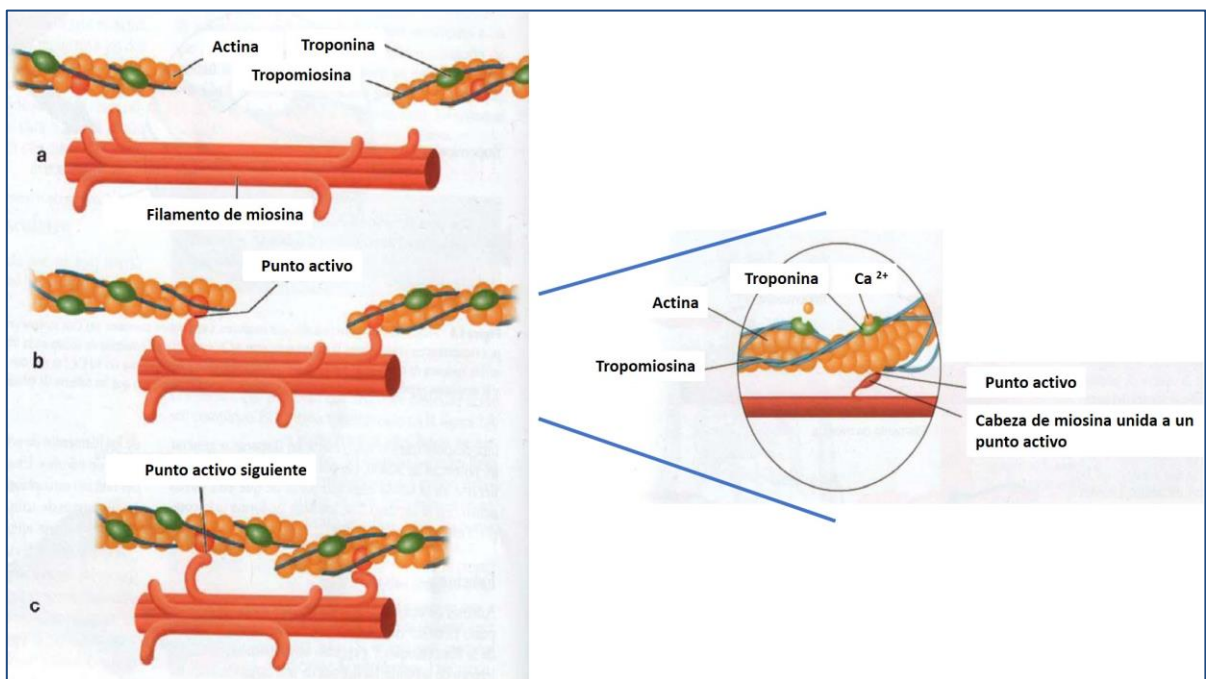
**Durante el reposo, el filamento de actina se encuentra envuelto por tropomiosina y troponina. (Tomado de Willmore y Costill, 5ª. Ed. Fisiología del Esfuerzo Humano, Paidotribo)**

Para que se lleve a cabo la contracción muscular, se requiere del estímulo detonado por el sistema nervioso, dando origen al acoplamiento excitación-contracción. Éste promueve la liberación de un neurotransmisor concentrado en los axones terminales de las motoneuronas, que se insertan en el sarcolema formando la placa neuromotora que desencadena impulsos eléctricos a lo largo de las miofibrillas. Lo anterior provoca la entrada de sodio al interior del sarcolema generando la despolarización en la membrana y la salida de potasio produce su repolarización, permitiendo que el impulso eléctrico viaje a través de la triada conformada entre los túbulos T y el retículo sarcoplasmático. En este último se



encuentran concentrados iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se liberan por el estímulo eléctrico al sarcoplasma en donde  $\text{Ca}^{2+}$  y el ATP entran en contacto con las miofibrillas contráctiles produciendo la contracción muscular (Willmore y Costill, 2007).

De manera paralela a este evento, se desencadenan cascadas de señalización molecular para la producción de ATP estimulada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de la relación de ADP-AMP/ATP por hidrólisis del ATP por la ATPasa de la miosina.



**Figura 5. Mecanismo de la contracción muscular desde un estado de reposo. Según la teoría de los miofilamentos deslizantes (Tomada y modificada de Willmore y Costill, 5ª. Ed. Fisiología del Esfuerzo Humano, Paidotribo).**





El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causa la activación de la CaMK quien, a su vez, activa mediante la transferencia de un grupo fosfato (fosforilación) a la cinasa dependiente de AMP (AMPK). La AMPK fosforila a diversas cinasas río abajo para promover la síntesis de ATP y por ésta misma fosforilación inactiva procesos que requieran de ATP, por ejemplo, la síntesis de proteínas, ácidos grasos o proliferación celular.

### 7.2.1 Teoría del deslizamiento de los filamentos

A partir de los hallazgos de Andrew Fielding Huxley y Niedeigerve en 1954, Hugh E. Huxley **en el mismo año** proponen la teoría actualmente aceptada respecto al mecanismo de contracción muscular. Se basa en la conversión de la energía química por hidrólisis de ATP en energía mecánica, al producirse el movimiento de palanca de las cabezas de miosina y provocar el llamado "golpe de movimiento". En este mecanismo se describe la interacción y deslizamiento de las miofibrillas de actina sobre las de miosina por medio de ciclos contráctiles en los que el ATP adquiere gran importancia, ya que se requiere una molécula para completar cada **fase del** ciclo que se describe a continuación:

- 1.- El ATP promueve la disociación entre la unión de la actina con la miosina provocada por la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  al unirse con la tropomiosina y dejar expuesto el sitio específico de unión entre actina y miosina.

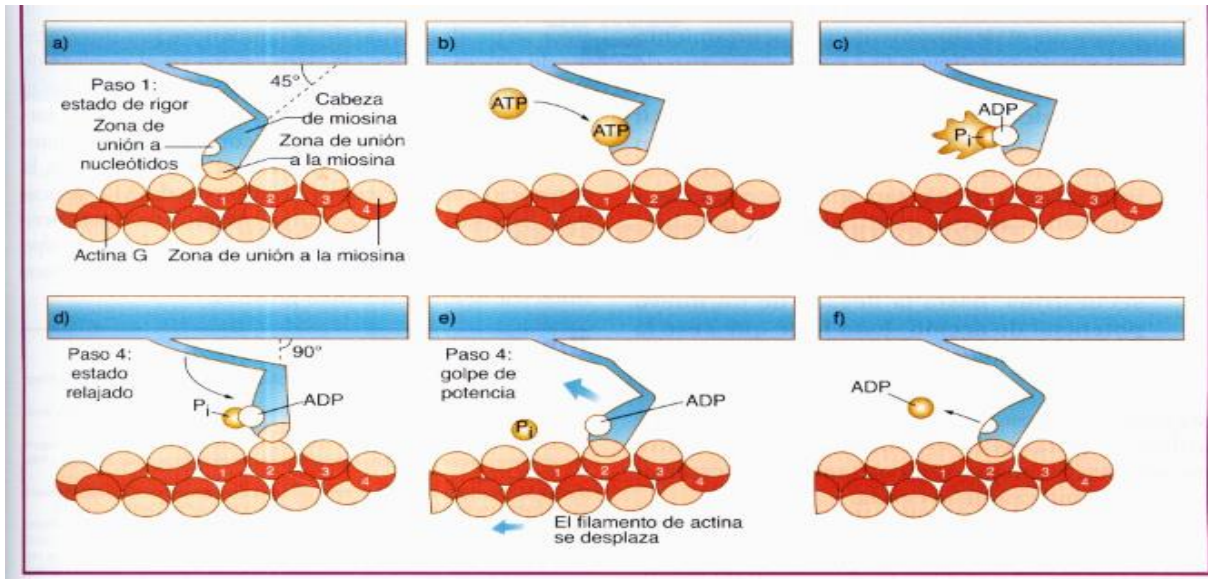


2.- Por la acción de la ATPasa en la cabeza de miosina, el ATP se hidroliza y la actina vuelve a unirse con la miosina, pero de manera favorable y en dirección de derecha a izquierda en otro sitio de unión.

3.- Se produce ADP+Pi por hidrólisis de ATP, lo que provoca la activación alostérica de AMPK y se sintetiza ATP para poder continuar con el ciclo.

Durante este proceso, se dice que la fibra muscular se encuentra en un estado activo. Durante este estado es posible cuantificar la fuerza e intensidad del "golpe de movimiento". Esto se realiza registrando las sacudidas del músculo estirado provocadas por estímulos eléctricos de alta o baja frecuencia y registrando la tensión del músculo tras cada sacudida, con el fin de prolongar el estado activo y poder activar procesos bioquímicos y mecánicos de la contracción muscular. El punto máximo de tensión muscular tras el incremento de la frecuencia de los estímulos se denomina tétanos y la serie de estímulos controlados se les denomina **tren de estimulación**.

Una vez que cesa el estímulo, se activa una vía de transducción de señales para que el  $\text{Ca}^{2+}$  se recapture nuevamente en las cisternas del retículo sarcoplasmático, lo que lleva a que las miofibrillas regresen a su estado de reposo. Sin embargo, la AMPK queda activa algunas horas ya que el proceso de relajación y recaptura de calcio requieren aún de energía.



**Figura 6.** Hidrólisis del ATP como mecanismo de la contracción muscular. (Tomada de López y Fernández, 3<sup>a</sup>. Ed. Fisiología del Ejercicio, Panamericana. Buenos Aires.)

### 7.3 Tipos de fibras musculares

El músculo es un órgano versátil en el sentido de que puede adaptarse al tipo de movimiento o acción que habrá de ejecutarse, ya que no todos los movimientos requieren la misma fuerza, rapidez o tiempo de ejecución. Esta versatilidad está mediada por el tipo de fibras que lo integran. Básicamente, existen dos tipos: **de contracción lenta** y **de contracción rápida** cuyas diferencias van desde su velocidad de contracción, metabolismo, sustrato energético predominante, capacidad de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  y, sobre todo, el tipo de miosina ATPasa.



### **7.3.1 Fibras de contracción lenta**

También llamadas tipo I, lentas, oxidativas, ST (del inglés Slow twitch) o rojas. Lo anterior, debido al color rojizo que adquieren por la oxidación del hierro del grupo hemo contenido en la mioglobina. Esta proteína se encarga de transportar oxígeno, fundamental para este tipo de fibra, ya que su metabolismo es esencialmente de tipo oxidativo.

Respecto a su velocidad de contracción, es relativamente lenta ya que su potencial de acción es transmitido con menor frecuencia, lo que conlleva un mayor tiempo de recuperación entre contracciones y proporciona un mayor ahorro de energía. De esta manera presenta mayor resistencia a la fatiga.

En cuanto a su metabolismo, dependen de la presencia de oxígeno para llevar a cabo su función, por lo que el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la beta-oxidación proveen de energía a los músculos compuestos por este tipo de fibras al catabolizar tanto glucógeno como ácidos grasos. Estos procesos se llevan a cabo en la mitocondria, por lo que otra de sus características fundamentales es el gran tamaño y cantidad de mitocondrias o sarcosomas; y por la elevada actividad enzimática requerida para esos procesos metabólicos oxidativos.

Las fibras tipo I, oxidativas o lentas ST (del inglés slow-twitch) y de apariencia rojas, poseen un retículo sarcoplasmático (RS) menos abundante en comparación



con el de las fibras tipo II por lo que presentan menor capacidad para almacenar  $\text{Ca}^{2+}$ .

La diferencia fundamental entre el tipo de fibras recae en las características de la ATPasa en las cabezas de miosina. La miosina ATPasa de las fibras de tipo I presentan una isoforma de cadena pesada llamada MHC- $\beta$ , que dentro de las familias de MHC (del inglés Myosin High Chain) son las que presentan menor velocidad máxima, es decir hidrolizan ATP más lentamente durante la contracción muscular.

Debido a esto, la velocidad máxima de acortamiento de este tipo de fibras es menor y requiere hasta 110 milisegundos para contraerse en comparación con los 50 milisegundos que requieren las fibras de tipo II. (O'Neil, 2011)

### **7.3.2 Fibras de contracción rápida**

Conocidas también como tipo II, rápidas, glucolíticas, FT (del inglés fast-twitch) son de apariencia blanca. Se subclasifican en fibras tipo IIA, IIB y IIX o C por diferencias en su tipo de metabolismo que se comentará más adelante.

Su velocidad de contracción es rápida debido a que su potencial de acción es transmitido con mayor frecuencia. Sin embargo, aunque alcanzan un estado de tensión más rápidamente, sólo son capaces de sostenerlo por periodos cortos de



tiempo, por lo que se clasifican como fibras fatigables o poco resistentes. (Jogersen, 2009)

El metabolismo en estas fibras se subdivide según las características del tipo de fibra rápida. Las fibras de tipo IIA se denominan intermedias, ya que pueden presentar tanto metabolismo oxidativo como glucolítico en los que las enzimas succinil deshidrogenasa y fosfofructoquinasa 1 (PFK 1) muestran elevada su actividad. Las fibras de tipo IIB son exclusivamente glucolíticas anaeróbicas obteniendo energía de glucosa y glucógeno con menor capacidad oxidativa. Las fibras de tipo IIX o C son raras e indiferenciadas, se dice que se encuentran en proceso de convertirse en algún otro tipo de fibra según el estímulo que estén recibiendo. Debido a que los procesos metabólicos de los que sustrae energía son menos oxidativos, la densidad y el tamaño de las mitocondrias son más pequeñas en relación a las que se encuentran en las fibras tipo I.

El tipo de RS difiere en relación al de las fibras tipo I ya que éste se encuentra mucho mejor desarrollado y estructurado. Esto permite una liberación y recaptura de  $Ca^{2+}$  por el RS más rápida y eficiente, aumentando de 3 a 5 veces su velocidad de sacudida.

Respecto a la miosina ATPasa, existen diferencias entre el tipo de fibras II ya que se presentan las isoformas MHC-IIA, IIB Y IIC. La distribución de estas isoformas



en las fibras IIA es menos abundantes, en las IIB son muy abundantes mientras que en el tipo IIC o X su aparición es intermedia (Tabla 1).

**Tabla 1. Características de las fibras musculares según su tipo.**

Diferencias	Fibras Contracción Lenta Tipo I	Fibras Contracción Rápida Tipo II
Histológicas Dimensión y color	Fibras menores y más rojas	Fibras grandes y blancas
Miofibrillas	Escasas	Numerosas
Mitocondrias	Grandes y numerosas	Pequeñas y numerosas
Inervación	Pequeñas motoneuronas con conducción lenta	Grandes motoneuronas con conducción rápida
Placas motoras	Difusas, con muchos capilares	Bien separadas, pocos capilares
Fisiológicas Tipos de contracción	Contracción lenta y progresiva	Contracción y relajación rápidas
Tétanos	Lento, de gran duración	Rápido y de poca duración
Actividad	Salida lenta al estado Activo	Salida rápida del estado activo
Resistencia	Mayor resistencia a la fatiga	Fatiga rápida
Tensión desarrollada	Llega lentamente a la tensión Máxima	Rápidamente llega a elevadas tensiones
Elasticidad	Grande	Baja
Bioquímicas Metabolismo	Fundamentalmente ácidos grasos En presencia de oxígeno	Principalmente Glucolítico En ausencia de oxígeno
Contenido en mioglobina	Alto	Bajo
Glucógeno	Menor reserva	Gran reserva
Sodio y Potasio	Más sodio	Más potasio
Músculo representativo	Sóleo	Extensor Digitorum Longus (EDL)

(Modificada de López y Fernández, 3ª. Ed. Fisiología del Ejercicio, Panamericana. Buenos Aires.)



## 7.4 Cinasa dependiente de AMP

La AMPK (por sus siglas en inglés) es una proteína cinasa de serina/treonina porque fosforila en esos residuos a otras proteínas para regular su actividad, por lo que la AMPK es considerada un sensor del estado metabólico y energético celular. Es un heterotrímero: la subunidad catalítica alfa ( $\alpha$ ) presenta dos isoformas, la subunidad de andamio beta ( $\beta$ ) con dos isoformas y la subunidad reguladora gama ( $\gamma$ ) con 3 isoformas. Estas isoformas se expresan de manera tejido-específica, siendo en ME la  $\alpha 2\beta 2\gamma 3$  la isoforma predominante (O'Neil, 2011).

La AMPK se activa al fosforilarse la subunidad  $\alpha$  en la treonina 172 por la disminución de ATP y fosfocreatina, o bien, por el aumento del AMP y acidosis provocados por el ejercicio, estrés osmótico, isquemia e hipoxia (O'Neil, 2011).

Su activación promueve la fosforilación de enzimas que intervienen en la producción de ATP, disminuye procesos que lo consumen, regula a largo plazo la transcripción nuclear y regula la transferencia de energía al catabolizar el glucógeno, glucosa o ácidos grasos. También regula las vías de señalización con las que trabaja de manera sinérgica como, por ejemplo, la vía de la insulina o la de síntesis de proteínas (Friedrichsen, 2013).

En el ME, la AMPK es regulada por la cinasa LKB1. Esto se demostró en modelos de ratones en los que se abatió la expresión de la LKB1 y se estimuló al ME con





ejercicio, tren de estimulación o de manera farmacológica con AICAR (5-aminoimidazol-carboxamida-4 1-β-D-ribofuranósido, 5 4-carboxamida-aminoimidazol ribonucleósido, acadésina), encontrándose que la respuesta de AMPK se abolía (Friedrichsen et al. 2013). La AMPK también se regula por la CaMK cuyas isoformas α y β se expresan en el ME. Su función es la de regular la presencia de Ca<sup>2+</sup> durante los procesos de contracción-relajación del ME (Jensen et al. 2007).

La activación de la AMPK depende también de la intensidad del ejercicio que el músculo realice, la duración del mismo y del tipo de fibras que se encuentren involucradas, según lo reportado por Mason y col. en el 2012. Este grupo menciona que el ejercicio de baja intensidad correlaciona con la activación de las cadenas pesadas de miosinas de las fibras tipo I que utilizan ácidos grasos como sustrato energético. Por lo que, la intensidad baja y moderada en el ejercicio provoca que AMPK active la vía de la degradación de ácidos grasos por la activación de la Acetil CoA.

Por otro lado, los grupos de De Souza en el 2013 y Bartlett en el 2012, mencionan que tanto el ejercicio de alta intensidad con poca duración que involucra a fibras de tipo II, como el ejercicio de baja intensidad y larga duración que involucra a fibras de tipo I o una combinación de ambos ejercicios, influyen de igual manera sobre la vía de la AMPK en el metabolismo energético celular. En ambos casos, la activación de AMPK es provocada por la contracción de las fibras musculares y



dependiendo de la intensidad del ejercicio se activa ya sea la vía de la degradación de glucosa o la de ácidos grasos.

Estudios realizados en ratas viejas a las que se les aplicó un protocolo de esfuerzo físico por carreras de corta distancia, mostraron bajo rendimiento y disminución de la actividad de AMPK (Mitsuishi, 2013). Las enfermedades cardiovasculares y la edad avanzada llevan a la disminución de la actividad de la AMPK. Tales condiciones fisiopatológicas se ven estrechamente relacionadas con el aumento en los niveles de insulina y la diabetes tipo 2, ya que los pacientes muestran una disminución en el metabolismo muscular por la RI en este tejido (Frosig, 2013; O'Neil, 2013; Kristencen, 2013).

En otros estudios, el grupo de Larsen en el 2012 estudiando ratas con disminución de la isoforma  $\alpha 2$  de la AMPK en el ME, observaron intolerancia al ejercicio y una disminución en la actividad física espontánea. Bori en el 2012 hace una relación respecto a la disminución de la capacidad aeróbica por la baja activación de la AMPK.

Por otra parte, los beneficios del ejercicio se relacionan con la activación de la AMPK, por lo que esta cinasa se propone como blanco para la prevención y terapia para restablecer los niveles de insulina en sangre y disminuir las afecciones generadas por el SM, esto según un estudio realizado en roedores a los que se les aplicó un programa corto de ejercicio y se observó una mayor



actividad en AMPK, reduciendo la RI y la hiperinsulinemia en relación al grupo control (Ruderman, 2013).

Koltai en el 2012 encontró que la contracción muscular por ejercicio de moderada intensidad revierte o atenúa la disminución de la enzima succinato deshidrogenasa al igual que en la expresión y actividad de la AMPK en el ME de rata frente a la condición de deterioro por edad. Por lo que el beneficio del ejercicio impacta de manera favorable en el metabolismo aeróbico, ya que la AMPK activa a la Succinato deshidrogenasa, enzima que cataliza reacciones catabólicas como el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones.

Por su parte, Koltai en el 2012 y Oliveira en el 2014 mediante la aplicación de un programa de ejercicio de moderada intensidad usando una banda sin fin, evaluaron los efectos del ejercicio sobre la disminución de la expresión y fosforilación de la AMPK en los músculos cuádriceps y gastrocnemio de ratas envejecidas. Estos grupos observaron que el ejercicio previene la disminución en los niveles de expresión y fosforilación de la AMPK, reduciendo parcialmente los efectos del envejecimiento.



## 8 ANTECEDENTES

### 8.1 AMPK y su relación con el ejercicio

La importancia de la función de la AMPK en el metabolismo del ME se ha hecho evidente en estudios con ratones transgénicos que presentan una reducción en la actividad de la AMPK y a los que se les dio una dieta alta en grasa para probar el impacto metabólico de la ausencia de esta cinasa. En estos animales se observó un deterioro en la capacidad de realizar ejercicio, ya que se observa una disminución del tamaño en las fibras musculares. Así mismo, los músculos estudiados de los ratones con disfunción de la AMPK mostraron ser más susceptibles a desarrollar RI; lo anterior se evaluó por experimentos de captación de glucosa inducida por contracción de músculos aislados, los animales presentaron aumento de peso e intolerancia a la glucosa inducidos por la dieta (Steinberg 2010).

Tras un estudio del efecto del ejercicio y el fármaco  $\beta$ -GPA (ácido  $\beta$  guadinopropiónico) en un modelo animal con RI inducida por una dieta alta en grasa, (reportado por Gulli en el 2012) se observó que el ejercicio de resistencia, las intervenciones farmacológicas y la pérdida de peso revierten la RI adquirida en el ME. Estos beneficios estuvieron acompañados de un aumento en la activación de las vías tanto de las cinasas AMPK y AKT, apoyando la participación crucial de



la activación de estas proteínas en la recuperación de la homeostasis energética del músculo y su conexión con el resto de los órganos periféricos. En ese estudio se usó el  $\beta$ -GPA ( $\beta$  – ácido guadinopropiónico) como un agente que promueve adaptaciones metabólicas en el ME, similares a las que se observan tras un entrenamiento de resistencia aeróbica ya que este fármaco disminuye los niveles de ATP, los niveles de fosfagenos y de glucogeno intramuscular, provocando un aumento en la fosforilación de AMPK.

Jorgensen y col. en el 2009 por su parte, pone de relieve a la AMPK en el ME como un objetivo en la terapia de la diabetes tipo 2 y la RI relacionada con la obesidad. Este grupo demostró que ratones que sobreexpresan la AMPK disfuncional y además son alimentados con una dieta alta en grasa, disminuye en un 90% la fosforilación de acetil CoA carboxilasa (ACC), enzima blanco de AMPK que se ve involucrada en la oxidación de ácidos grasos.

Se ha visto en estudios realizados en un modelo animal de sedentarismo, que, durante la contracción muscular inducida tanto por sesiones de natación, estímulos eléctricos o estímulos farmacológicos, existe un incremento en la captación de glucosa de manera independiente a la vía de la insulina en el ME aislado, activando a la vía de señalización que está mediada por AMPK, CaMK, LKB1 y PKC (Fisher 2002, Wright 2004, Rockl 2008).



Respecto al mecanismo mediante el cual el ejercicio regula la homeostasis de la glucosa, Cao en el 2012 realizó un estudio en un modelo animal de diabetes tipo 2 inducido por dieta alta en grasa y en otro grupo por la aplicación de dosis bajas de estreptozotocina, para evaluar los efectos de la RI sobre la vía de AMPK en el músculo sóleo. Este grupo encontró disminuida significativamente la fosforilación de AMPK, además de evaluar los efectos del ejercicio agudo y crónico sobre la capacidad de mejorar el metabolismo energético del ME, encontrando que se restaura la fosforilación de AMPK a valores similares a su control. Sin embargo, no explican el mecanismo por el cual esto es posible (Cao 2012).

## **8.2 Estudios de Fosfoproteómica**

Las proteínas fosforiladas representan un tercio del proteoma de la célula, por lo que para estudiarlas se requiere su extracción de los lisados celulares o tejidos con el fin de identificar fosfoproteínas cuyo nivel de expresión sea bajo (Lu 2008, Kageyama 2007, 2006 Jones, Larsen 2000).

La fosfoproteómica se utiliza como una herramienta poderosa para estudiar y determinar las respuestas de las proteínas en el contexto celular.

El estudio de la activación e inhibición de proteínas que forman parte de cascadas de señalización de fosforilación permiten profundizar en los mecanismos de diferentes patologías, tales como cáncer, obesidad y RI que se caracterizan por



presentar perturbaciones en vías de señalización que incluyen cascadas de fosforilación, tal como lo es la vía de AMPK.

Existen dos técnicas muy útiles en la separación de proteínas fosforiladas del resto del proteoma para su mejor estudio, se usan anticuerpos específicos para reconocer residuos fosforilados. También se realiza la técnica de cromatografía por afinidad basada en el uso de metales en micro columna (IMAC) que consiste en el empleo de resinas que contienen metales unidas por un agente quelante, la cual se considera como la parte estacionaria. Posteriormente, se inicia con la fase de afinidad iónica ya que los metales poseen afinidad por grupos fosfato cargado negativamente. Esta unión se establece por atracción electrostática entre cargas positivas y negativas. (Anderson, 1986)

En el 2008, Dzamko publicó resultados obtenidos tras investigar el mecanismo molecular por el cual el ejercicio apoya en la prevención y el tratamiento de la RI por la oxidación de ácidos grasos. El mecanismo consiste en la activación de AMPK, que inicia con la cascada de fosforilación activando a ACC2 que inhibe la actividad de Malonil- CoA provocando así la oxidación de ácidos grasos. Usando fosfoproteómica y bioinformática evaluó los efectos de la ausencia de AMPK por la sobreexpresión de la cinasa inactiva específica en el ME de ratones. Encontró un incremento del 25% en la fosforilación de 18 cinasas de Ser/Thr extracelulares en el grupo con AMPK inactiva durante la contracción en relación al control, sin



embargo, no se estudió la fosforilación de proteínas río abajo tras la activación de AMPK, lo que resultaría interesante pues en ensayos *invitro* se correlaciona la fosforilación de AMPK con la fosforilación de ACC2 y la disminución de la activación de Malonil-CoA y ácidos grasos.

En el presente trabajo estudiaremos los efectos del SM sobre el perfil de las fosfoproteínas al estimular a AMPK en el ME y determinaremos si el ejercicio puede restablecer de manera terapéutica la función de las proteínas que se modulen por fosforilación y que resulten afectadas.

## **9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El músculo esquelético tiene alta oxidación de glucosa y ácidos grasos, por lo que alteraciones en su metabolismo pueden contribuir a la resistencia a la insulina. Sin embargo, aún se desconoce si existen cambios en el perfil de fosforilación de proteínas en el músculo esquelético inducidos por la resistencia a la insulina que puedan impactar sobre vías de señalización involucradas en el metabolismo energético celular.





## **10 JUSTIFICACIÓN**

Con este estudio se obtendrá un amplio panorama respecto a la respuesta de la vía de AMPK en el ME utilizando un modelo de SM inducido por una dieta alta en hidratos de carbono. Se ofrecerá una visión de cómo se encuentra el perfil de fosfoproteínas a través del estudio de fosfoproteómica, para conocer el mecanismo mediante el cual se altera la función de las proteínas que forman parte de la vía previamente mencionada tanto a los músculos soleus (SOL) como al extensor digitorum longus (EDL). Estas proteínas podrían ser blancos para restablecer el balance energético provocado por desórdenes metabólicos.

## **11 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **11.1 Hipótesis**

El síndrome metabólico perturbará la vía de la AMPK en el músculo esquelético, por lo que se afectará el perfil de fosfoproteínas derivado de la activación de esta cinasa.



## 11.2 Objetivo General

Determinar el efecto del síndrome metabólico sobre la vía de AMPK en los músculos de contracción lenta (SOL) y de contracción rápida (EDL), a través de estudios de fosfoproteómica.

### 11.2.1 Objetivos Específicos

1. Obtener el modelo de rata con síndrome metabólico (SM).

**Estrategia Experimental:** Alimentar a las ratas durante 16 semanas con una dieta alta en hidratos de carbono suministrando sacarosa al 30% en agua de beber.

2. Determinar la expresión de AMPK total en el SOL y EDL de animales con SM.
3. Evaluar la respuesta de la vía de la AMPK *in vitro* en el SOL y EDL tras un tren de estimulación en animales con SM.

**Estrategia Experimental:** Se aplicará un estímulo eléctrico para inducir contracción y activar a la AMPK en los músculos SOL y EDL aislados de rata con SM. **Estrategia Experimental:** Se llevarán a cabo estudios de Western blot para



evaluar la expresión y activación de AMPK (forma fosforilada) en el SOL y EDL de rata con SM.

4. Determinar si la activación crónica *in vivo* de AMPK mediante ejercicio restaura las alteraciones en la vía de AMPK en el SOL y EDL de ratas con SM.

**Estrategia Experimental:** Se aplicará un protocolo de carrera en banda sin fin para activar la vía de AMPK de manera crónica en las ratas con SM.

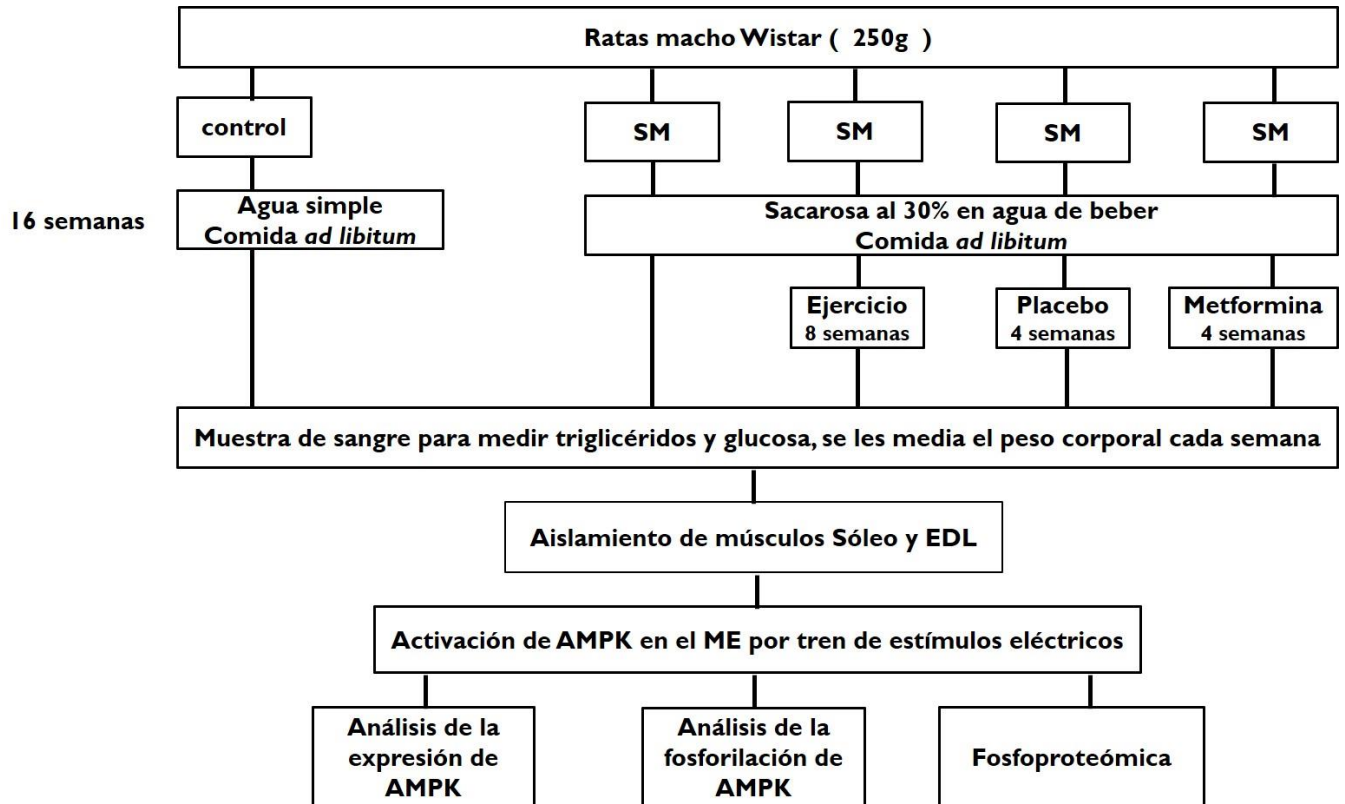
**Estrategia Experimental:** Se les suministró metformina de manera oral para activar la vía de AMPK de manera crónica en las ratas con SM.

5. Determinar el efecto del síndrome metabólico en el perfil de fosfoproteínas del SOL y EDL dependiente de la activación de la vía de la AMPK.

**Estrategia Experimental:** Se realizará un estudio de fosfoproteómica para evaluar los efectos del SM inducido por una dieta alta en hidratos de carbono sobre el perfil de fosfoproteínas derivada de la activación de la vía de AMPK en el SOL y EDL de rata.



## Diseño Experimental





## **12 METODOLOGÍA**

### **12.1 Inducción del SM por una dieta alta en hidratos de carbono en rata**

El modelo de SM se obtuvo al suministrar sacarosa al 30% en agua de beber y alimento estándar a ratas macho wistar (250g) durante 16 semanas, periodo durante el cual se les pesó cada semana y se les midieron los triglicéridos al final de la dieta para corroborar el desarrollo de hipertrigliceridemia.

### **12.2 Determinación de la expresión de AMPK total en el SOL y EDL de rata**

Se obtuvieron los músculos SOL y EDL de rata previamente anestesiada y sacrificada para determinar la expresión de AMPK en los músculos utilizando la técnica de Western blot. Los tejidos musculares se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de disectarlos y se guardaron a -70° para análisis posteriores.



### **12.3 Determinación de la fosforilación de AMPK por contracción *in vitro* del ME aislado de rata**

Se realizó protocolo de contracción según el tipo de músculo. Para el SOL, se estimuló a 30 Hz, 600 ms duración del pulso, 18 tétanos/min. Para EDL, se dio un estímulo eléctrico a 50 Hz, 350 ms duración del pulso, 6 tétanos/min. a 60 Volts

El tren de estímulos para ambos músculos tuvo una duración de 25 minutos, se usó de testigo al músculo contrario que permanecía en reposo en una solución Ringer-Krebs (Tabla 6). Al finalizar el protocolo de estimulación, se congelaron los músculos en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C para análisis posteriores por el método de Western blot. Durante el transcurso del protocolo, tanto los músculos en estimulación como en reposo se mantuvieron en solución Ringer Krebs burbujeado con una mezcla de gases (O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%). También se estuvo monitoreando presencialmente durante la duración del protocolo que el músculo se contraía en respuesta al estímulo eléctrico que recibió según la frecuencia para cada tipo de músculo.

### **12.4 Lisis del tejido muscular**

Se utilizó un politrón para poder homogenizar el tejido en una relación de 100 mg en 500 µl de buffer de lisis frío con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Tabla 4). Se utilizó un mortero de metal y pistilo en el que se trituró el tejido muscular



previamente sumergido en nitrógeno líquido para poder pesar la cantidad de tejido a lisar. El tejido, se transfirió a un microtubo de 2 ml con el buffer de lisis utilizando el politrón se homogenizó haciendo 6 pulsos de 5 segundos de homogenización, para procurar que la muestra se conservara fría se la mantenía en hielo entre cada lapso.

## **12.5 Cuantificación de concentración de proteína**

Se usó el método espectrofotométrico de cuantificación de Lowry (Lowry *et. al* 1951) para leer a una longitud de onda de 580 nm, estableciendo primero una curva patrón usando albúmina sérica bovina en concentraciones desde 0,5,10,30 y 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para posteriormente extrapolar la absorbancia de la muestra problema usando 5 $\mu\text{l}$  de homogenado de músculo para cuantificar.

## **12.6 Protocolo de activación de AMPK de manera crónica *in vivo* por efecto de la actividad física**

Una vez comprobado que las ratas adquirieron la condición de SM, se procedió a aplicarles un protocolo de actividad física en modalidad de caminata en una banda sin fin (Treadmill Panlab Harvard Apparatus) acoplada a un analizador de gases (LE 405 Panlab Harvard Apparatus) y un suministrador de aire y cambiador (Panlab Harvard Apparatus), con una frecuencia diaria de 5 días por semana, con una



duración de 40 minutos por sesión, con 0° de inclinación de la banda, a una velocidad de 20 cm/seg, durante un periodo de 8 semanas. De igual manera, se les aplicó el mismo protocolo a un grupo de ratas que no tenían SM para tomarlo como un grupo control.

#### **7.7.- Protocolo de activación de AMPK de manera crónica *in vivo* por efecto de la administración oral de metformina**

A las 16 semanas de la inducción del SM, se separó un grupo de ratas con SM a las que se les administró oralmente metformina en una dosis diaria de 100 mg por Kilogramo de peso corporal durante 6 semanas, esto para provocar la activación de AMPK en un modelo animal *in vivo*, mientras que otro grupo recibió una dilución de povidona, hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de magnesio como placebo. Una vez concluido el tratamiento, se les determinó nuevamente el nivel de triglicéridos en sangre.

## **12.7 Análisis del fosfoproteoma por isoelectroenfoque (IEE)**





Para separar las proteínas y analizar el fosfoproteoma, se realizó la técnica de isoelectroenfoque y posteriormente se separaron las proteínas por peso molecular.

En primera instancia, se precipitaron 500 µg de proteína de una muestra de sóleo con AMPK estimulada por contracción muscular, esta proteína estaba disuelta en buffer de lisis para preservar la fosforilación de las proteínas y almacenada a -80 °C.

Para precipitarla se agregaron 2 ml de acetona fría y se dejó a -20 °C toda la noche, Posterior a esto, la muestra se centrifugó a 13500 rpm a 4°C por 30 minutos. se retiró y se resuspendió en buffer de isoelectroenfoque (urea 8M, tiourea 2M y CHAPS al 5%) adicionado con inhibidores de fosfatasas (ácido okadaico 1mM y ortovanadato 1 mM) y de proteasas (complete de Roche 1 mM) y se llevó a un volumen de 500 µl, se guardó a -80 °C (ver Figura 7).

Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry-TCA.

Para el protocolo de isoelectroenfoque, se cargaron 110 µg de proteína a las tiras de IPG con un rango de pH entre 3 y 10 y se corrió bajo las siguientes condiciones:

Proceso de rehidratación pasiva 12 hrs a 20°C

Step 1: 250 V lineal 20 min.



Step 2: 4000 V lineal 2 hr.

Step 3: 4000V rápido 10000 V/7 hr.

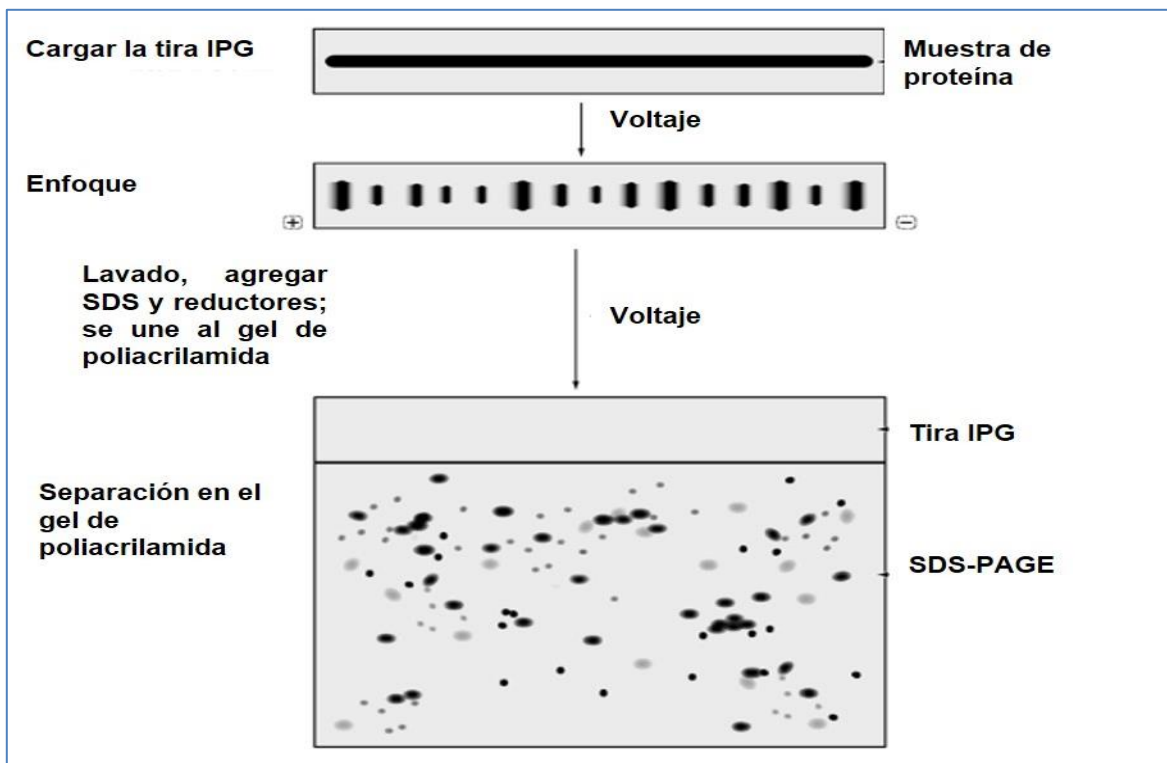
Step 4: 500 V rápido 3 hr.

Posteriormente, las proteínas en las tiras se prepararon para la 2D inmediatamente en buffer de equilibrio 1 (50 mM Tris pH 6.8, urea 8 M, tiourea 2 M, SDS al 2% y 20 mM DTT) por 15 minutos, después se equilibraron las tiras por 15 minutos en buffer de equilibrio 2 (50 mM Tris pH 6.8, urea 8 M, tiourea 2 M, SDS al 2% y 200 mM de iodoacetamida).

Las tiras se unieron a geles de poliacrilamida al 10% con 1 mm de grosor, la separación de las proteínas se realizó a 120 V por alrededor de 2.5 h a temperatura ambiente. Un gel 2-D fue teñido con commassie coloidal y desteñido con una solución de ácido acético y metanol. El otro gel sirvió para transferir la proteína a una membrana de PVDF para determinar proteínas fosforiladas usando anticuerpo anti-fosfoserina/treonina de Abcam (no. catálogo ab17464). Después de la transferencia, el gel fue teñido con una solución de tinción fluorescente (Sypro Invitrogen) toda la noche y desteñido con una solución de ácido acético y metanol.



Las imágenes fueron adquiridas por fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad) usando el software Quantity one (Bio Rad). Para el gel teñido con cCoomassie coloidal, se usó la opción "EPI White" y para el gel teñido con Sypro "TRANS UV".



**Figura 7. Representación esquemática de la técnica de Isoelectroenfoque.**

Diagrama de flujo partiendo del uso de tiras para separar a las proteínas según su punto isoeléctrico, se integra la tira a un gel de poliacrilamida para hacer la separación por peso molecular de las proteínas y obtener de esa manera una separación en 2 dimensiones.

## 12.8 Análisis estadístico



Se realizó el análisis estadístico usando el software GraphPad Prisma Version 5.01, usando t-Student para comparar los grupos Control vs. SM considerando una diferencia significativamente estadística al obtener una  $p \leq 0.05$ . También se utilizó el test de Mann-Whitney para determinar el efecto de los protocolos de activación crónica de la AMPK *in vivo*.

## 13 RESULTADOS

### 13.1 Obtención del modelo de SM en rata

Se midieron las variables para determinar si las ratas habían adquirido la condición del SM tras 16 semanas de haber recibido una dieta alta en hidratos de carbono en el agua de beber. El nivel de triglicéridos en sangre se determinó con tiras reactivas y se obtuvo un valor de  $181 \pm 10.53$  mg/dl (Control) y  $249.13 \pm 31.74$  mg/dl (SM) encontrando un aumento significativo en el grupo SM ( $p=0.002$ ). Se determinó el porcentaje de la grasa visceral en relación al peso corporal obteniendo  $2.6 \pm 0.18$  % (Control) y  $3.01 \pm 0.26$  % (SM) ( $p=0.09$ ), como se muestra en la Tabla 2. Este modelo está ampliamente estandarizado en el laboratorio por lo que estos valores muestran que las ratas adquirieron la condición de SM, además de que concuerdan con los factores que mencionan la OMS y el ATP III para el diagnóstico del síndrome metabólico.



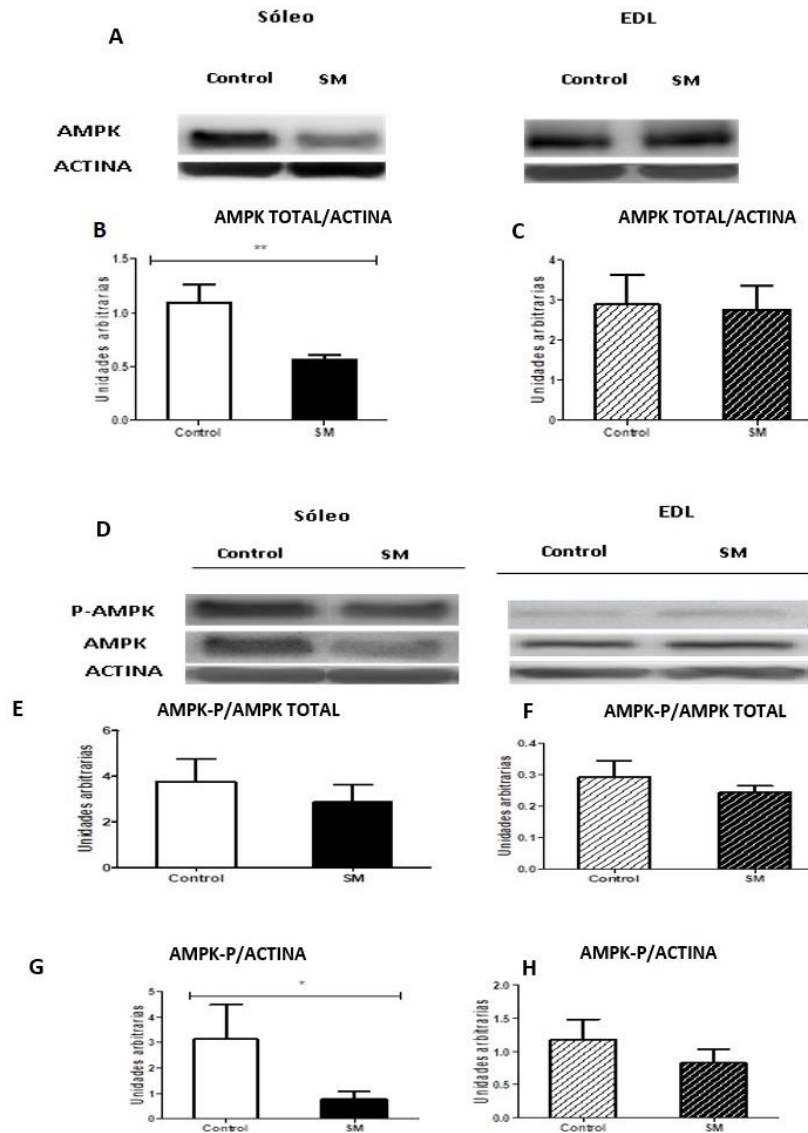
**Tabla 2. Características de las ratas del grupo control y SM tras una dieta alta en hidratos de carbono.**

<b>Variables</b>	<b>Control (n=19)</b>	<b>SM (n=15)</b>
<b>Peso corporal (g)</b>	<b>410.88 ± 11.07</b>	<b>421.93 ±16.57</b>
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	<b>181 ± 10.53</b>	<b>249.13* ± 31.74</b>
<b>Grasa visceral (g)</b>	<b>11.22 ± 1.03</b>	<b>12.73 ± 1.41</b>
<b>% grasa visceral/peso corporal</b>	<b>2.6 ± 0.18</b>	<b>3.01** ± 0.26</b>

*Características del modelo de síndrome metabólico tras suministrar una dieta del 30% de sacarosa en el agua de beber durante 16 semanas a ratas wistar controles(n=19) y experimentales (SM) (n=15). \*p=0.002, \*\*p=0.09 (± error estándar) t-Student*



## 13.2 Evaluación de la expresión de AMPK y su fosforilación en condiciones basales en SOL y EDL



**Figura 8.** Imágenes de Western blot representativo para AMPK (A) y su fosforilación en condiciones basales (D) del SOL y EDL de ratas control y SM.

Análisis densitométrico de la expresión total de AMPK de SOL (B) y del EDL (C), de la fosforilación basal de AMPK relativa del SOL (E) y EDL (F) en relación a la AMPK Total; y de la fosforilación basal absoluta de AMPK del SOL (G) y del EDL (H) en relación a la **beta**-actina para determinar la cantidad de AMPK disponible para fosforilar, (n=8) \* p=0.049, \*\*p=0.002 SM vs. Control t-Student



Como se muestra en la figura 8, se determinó la expresión de AMPK en el SOL y EDL en ratas con SM mediante Western blot para determinar el efecto del SM sobre estos tejidos contráctiles de diferentes sistemas metabólicos, oxidativo y glucolítico respectivamente (A). En el caso del SOL se observa que la expresión de AMPK total es estadísticamente menor en el caso de ratas SM en relación a su grupo Control ( $p= 0.002$ ; t-Student) (B), sin embargo, en el EDL no se encuentran cambios por los efectos de esta condición (C). Por lo que se sugiere que el SM afecta a la expresión de AMPK total en músculos con fibras contráctiles de tipo oxidativo.

La cantidad de AMPK fosforilada depende en primera instancia de la **capacidad del tejido** para fosforilar a la proteína disponible haciendo una relación de AMPK-P/AMPK total a la cual llamaremos **fosforilación relativa**, y en segundo lugar depende de la **proteína disponible** para fosforilar haciendo una relación entre la AMPK-P/Actina denominada **fosforilación absoluta**. Por lo que, para determinar la fosforilación de AMPK en reposo del SOL y EDL de las ratas SM, se usó la técnica de Western blot y se hizo una relación entre la proteína AMPK fosforilada y AMPK, ésta se normalizó con los niveles de beta-actina en cada tipo de músculo (D), encontrándose que la fosforilación basal relativa en SOL (E) y EDL (F) de ratas SM presentan niveles similares al de sus controles.

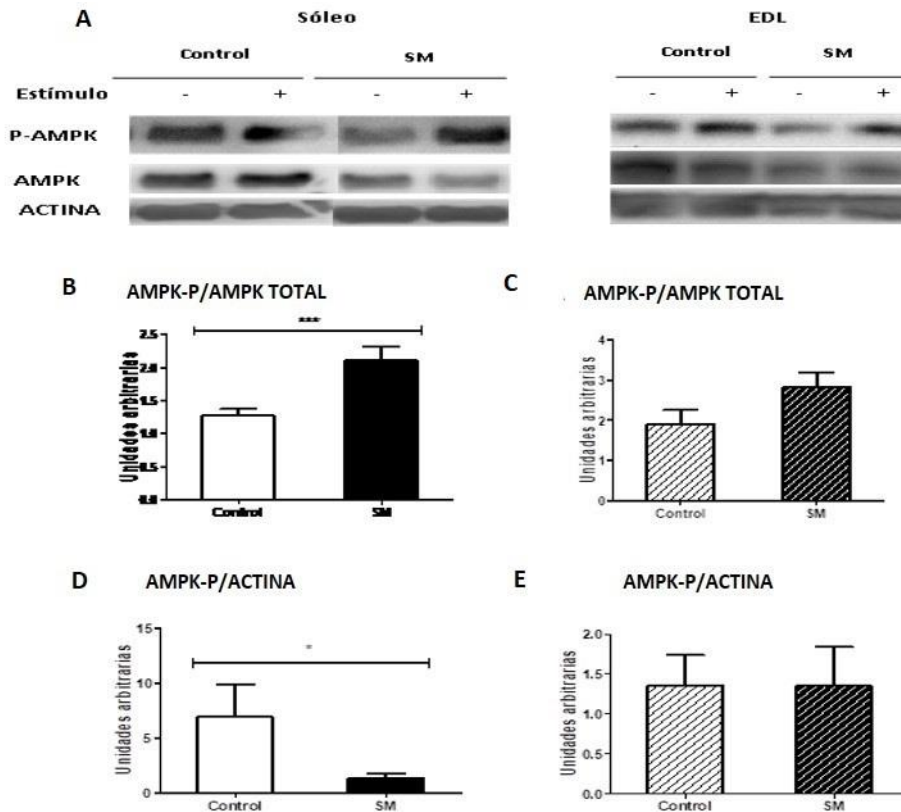


En el análisis de la fosforilación absoluta de AMPK se encontró que la cantidad de fosforilación en el SOL de ratas SM es significativamente menor al de sus controles ( $p=0.049$ ; t-Student) tomando en cuenta sólo la proteína AMPK fosforilada en condición basal (G). En el panel H se observa que el EDL no muestra cambios en la fosforilación absoluta de AMPK por efectos del SM. Por tanto, se concluye que el SM disminuye la fosforilación absoluta de AMPK en el SOL que es de metabolismo oxidativo, esto debido a que hay menos proteína que pueda ser fosforilada.





### 13.3 Aumento de la fosforilación de AMPK en el SOL aislado en respuesta a la contracción



**Figura 9.** Imágenes de Western blot representativo para el aumento de la fosforilación relativa de AMPK en músculo sóleo y EDL por contracción (A).

Análisis densitométrico de la relación de P-AMPK del músculo estimulado sobre AMPK del músculo en reposo de SOL (B) y del EDL (C); de la relación del AMPK fosforilada sobre Actina en SOL (D) y del EDL (E) de ratas control y SM (n=8) \*p=0.0397, (n=10) \*\*\*p=0.0009 SM vs. Control t-Student . La contracción se indujo en los músculos aislados mediante estimulación eléctrica.

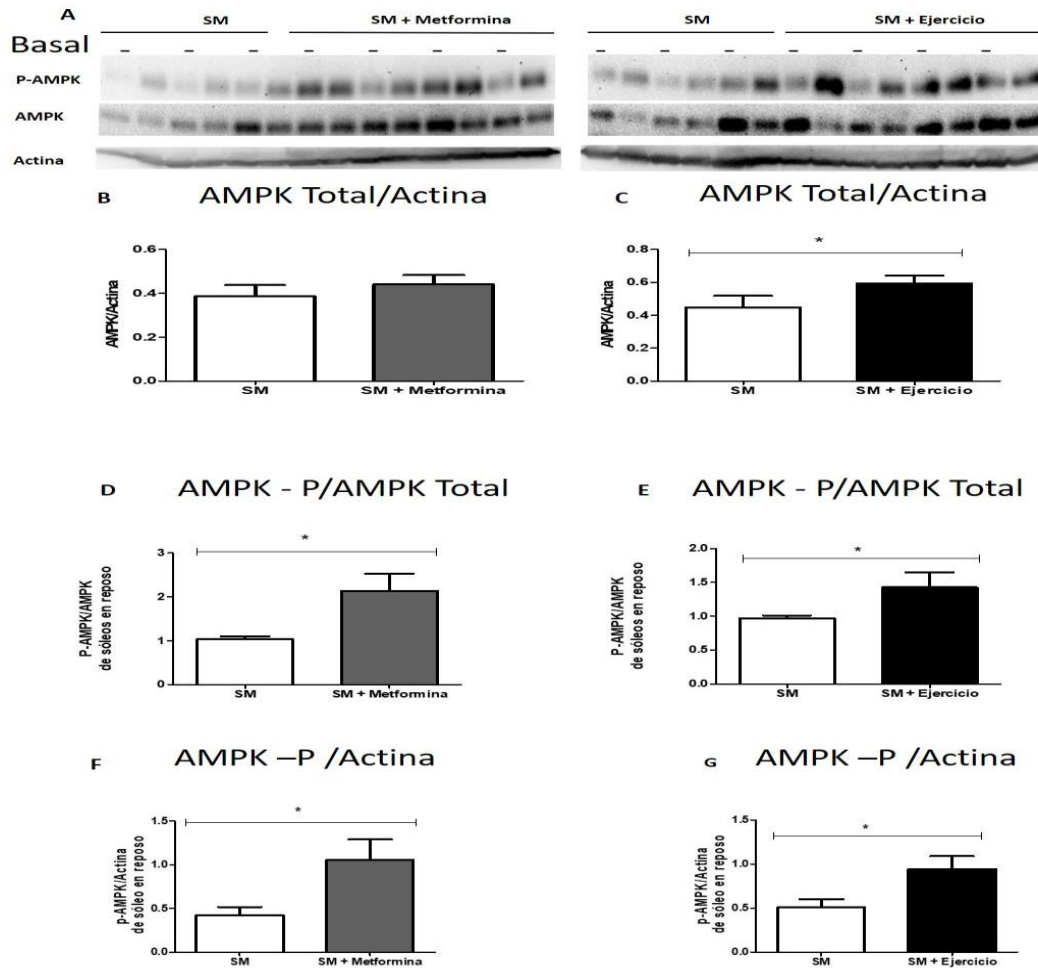


La figura 9 muestra los efectos de la SM sobre la fosforilación de AMPK en el ME inducido por contracción muscular, *in vitro* se realizó un análisis haciendo la relación entre la proteína fosforilada a nivel basal y la fosforilada por efecto de la contracción muscular inducida por corriente eléctrica en el músculo aislado, determinado usando el método de Western blot (A). En el panel B observamos que el aumento de la fosforilación en relación a la proteína AMPK aumenta al doble que la basal en el SOL de ratas con SM por efectos del estímulo eléctrico de forma estadísticamente significativa  $p=0.0009$  (t-Student), mientras que en el panel C vemos que el EDL de ratas con SM muestra ligeramente un aumento sobre el grupo control.

El panel D y E muestran el análisis entre la proteína AMPK fosforilada tanto basal como por efecto de la contracción muscular estimulada por corriente eléctrica normalizada con la beta-actina, para conocer el efecto del SM sobre el aumento de la fosforilación en los músculos SOL y EDL respectivamente. Se encontró que en el SOL de ratas con SM existe significativamente menor cantidad proteína fosforilada con una ( $p=0.0397$ ; t-Student) comparadas con el grupo control, mientras que el EDL no muestra cambios por efectos del SM. Por lo que se concluye que no toda la AMPK que se encuentra en el SOL se alcanza a fosforilar ante el estímulo de la contracción, efecto inducido por el SM en las fibras musculares de tipo oxidativo.



### 13.4 Evaluación de la activación crónica de AMPK en condiciones basales en el SOL



**Figura 10.** Imágenes de Western blot representativo para la expresión y fosforilación de AMPK estimulada de manera crónica en condiciones basales del SOL de ratas SM (A).

Análisis densitométrico de la expresión de AMPK de SOL de ratas SM, de ratas SM que recibieron metformina (SM + Metformina) (B) o que hicieron ejercicio (SM + Ejercicio) (C), de la fosforilación basal relativa de AMPK del SOL de ratas SM + Metformina (D) y SM + Ejercicio (E), de la fosforilación basal absoluta de AMPK del SOL de ratas SM + Metformina (F) y SM + Ejercicio (G). (SM n=3, SM + Metformina n=4 y SM + Ejercicio n=4). SM vs. SM + Metformina y SM vs. SM + Ejercicio. Datos normalizados con beta-actina (\* $p < 0.05$ ; t-Student).



Usando el método de Western blot para determinar el efecto de los tratamientos crónicos tanto con metformina como con el ejercicio en ratas con SM sobre la expresión de AMPK (A), se encontró que en el caso del SOL de ratas SM + Metformina no hay cambios en la expresión de AMPK (B), mientras que las ratas SM + Ejercicio muestran un aumento significativo ( $p < 0.05$ ; t-Student) en esta condición (C), según lo muestra la figura 10. Debido a que ambos tratamientos activan a la AMPK, se sugiere que los mecanismos de acción de cada uno se llevan a cabo por diferentes vías y que el estímulo de la síntesis de la AMPK se ve favorecido por efecto del ejercicio.

Los tratamientos crónicos tanto con metformina como con ejercicio aumentaron la fosforilación basal relativa de AMPK en ratas con SM en relación al grupo de ratas que no recibió tratamiento ( $p < 0.05$ ; t-Student) (Figura 10D y E). Por lo que se concluye que ambos tratamientos provocan un incremento en la fosforilación basal de AMPK en el SOL.

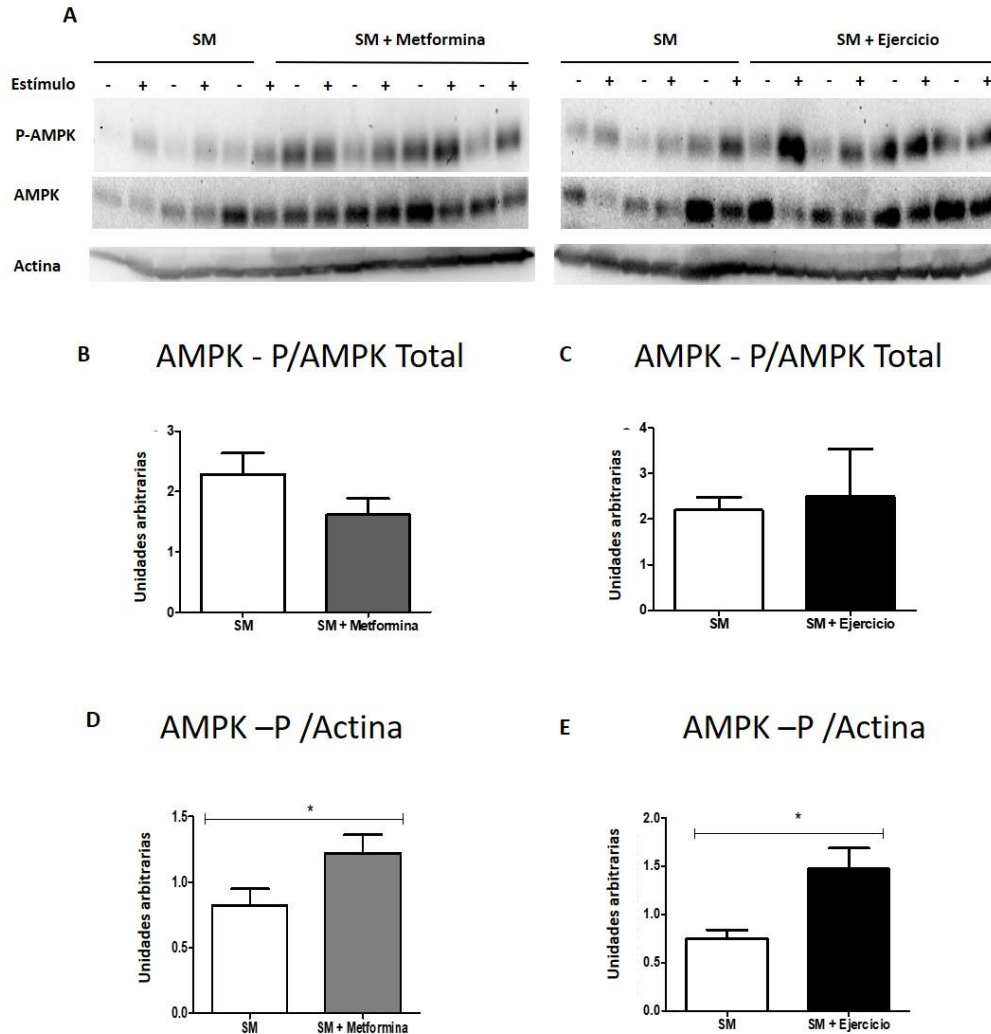
Al determinar los efectos de los tratamientos con metformina y ejercicio sobre la fosforilación basal absoluta de la AMPK en el SOL de ratas SM y conocer realmente la cantidad absoluta de proteína fosforilada, se hizo un análisis entre la fosforilación de AMPK y la beta-actina. Encontramos que la cantidad de fosforilación de AMPK en los músculos SOL tanto de ratas SM + Metformina (F) como las SM + Ejercicio (G) es significativamente mayor al de aquellas ratas SM,



observándose que los tratamientos crónicos con metformina y ejercicio provocan un aumento en el total de la proteína fosforilada en reposo. Esto podría deberse a que el tratamiento con metformina o ejercicio aumentó la capacidad de fosforilar a la proteína en el músculo.



### 13.5 Aumento de la fosforilación de AMPK en condiciones de activación crónica en el SOL en respuesta a la contracción



**Figura 11.** Imágenes de Western blot representativo para el aumento de la fosforilación relativa de AMPK del SOL por contracción.

Análisis densitométrico de la relación de AMPK-P del SOL estimulado sobre AMPK-P del SOL en reposo de ratas SM + Metformina (B) y de ratas SM + Ejercicio (C) normalizada con AMPK total. La contracción en el músculo aislado se obtuvo mediante estimulación eléctrica; Análisis de la relación de AMPK-P del SOL estimulado sobre Actina de ratas SM + Metformina (D) y de ratas SM + Ejercicio (E). (SM n=3, SM + Metformina n=4 y SM + Ejercicio n=4). SM vs. SM + Metformina y SM vs. SM + Ejercicio. Datos normalizados con **beta-actina** (\*p< 0.05; t-Student).



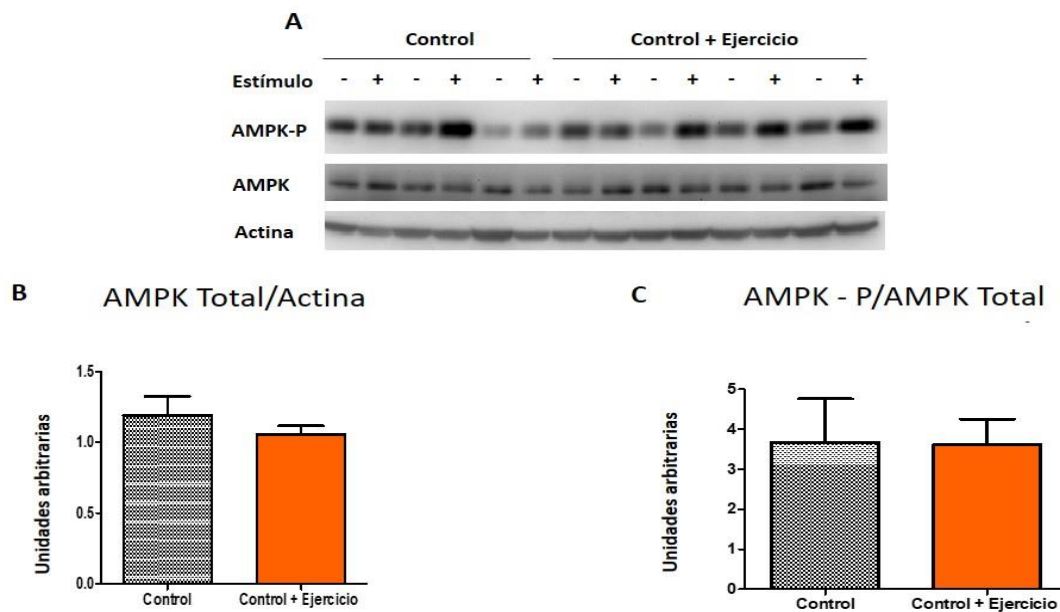
Posterior a los tratamientos crónicos con metformina o ejercicio que se aplicaron a las ratas SM, se aislaron los músculos SOL y se les aplicó un protocolo de estimulación eléctrica para provocar su contracción y evaluar el efecto de los tratamientos sobre el aumento de la fosforilación de AMPK sobre la fosforilación a nivel basal por medio del método de western blot (A). Al hacer el análisis estadístico encontramos que ni el tratamiento con metformina (B) ni el ejercicio (C) indujeron cambios en el aumento de la fosforilación de AMPK inducida por un estímulo de contracción del SOL de las ratas con SM. Es decir, se observa que AMPK se fosforila por efectos de la contracción muscular inducida por corriente eléctrica, sin embargo, no se observa diferencia con la respuesta de los músculos de ratas con SM que no recibieron tratamiento alguno.

Al hacer el análisis tomando en cuenta solo la proteína AMPK que está fosforilada por efecto de la contracción muscular inducida con electricidad en relación a su cantidad de Actina, para determinar la fosforilación absoluta, en el SOL, encontramos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ; t-Student) tanto en los SOL de las ratas con SM que recibieron metformina (D) como en aquellas que hicieron ejercicio (E). Concluyendo que el total de la AMPK disponible para fosforilar respondía por efecto de los tratamientos crónicos ante el estímulo de la contracción muscular, según lo muestra la figura 11.



### 13.6 Expresión y fosforilación de AMPK en el SOL de ratas sin tratamiento

Como objetivo secundario, nos propusimos a evaluar el efecto del ejercicio sobre la expresión y fosforilación basal de aquellas ratas que recibieron una dieta estándar con agua simple de beber, esto como control del efecto del ejercicio en ratas sanas según lo observamos en la figura 12. Al no encontrar cambio alguno, se concluye que la intensidad del ejercicio no fue la adecuada como para propiciar algún cambio.



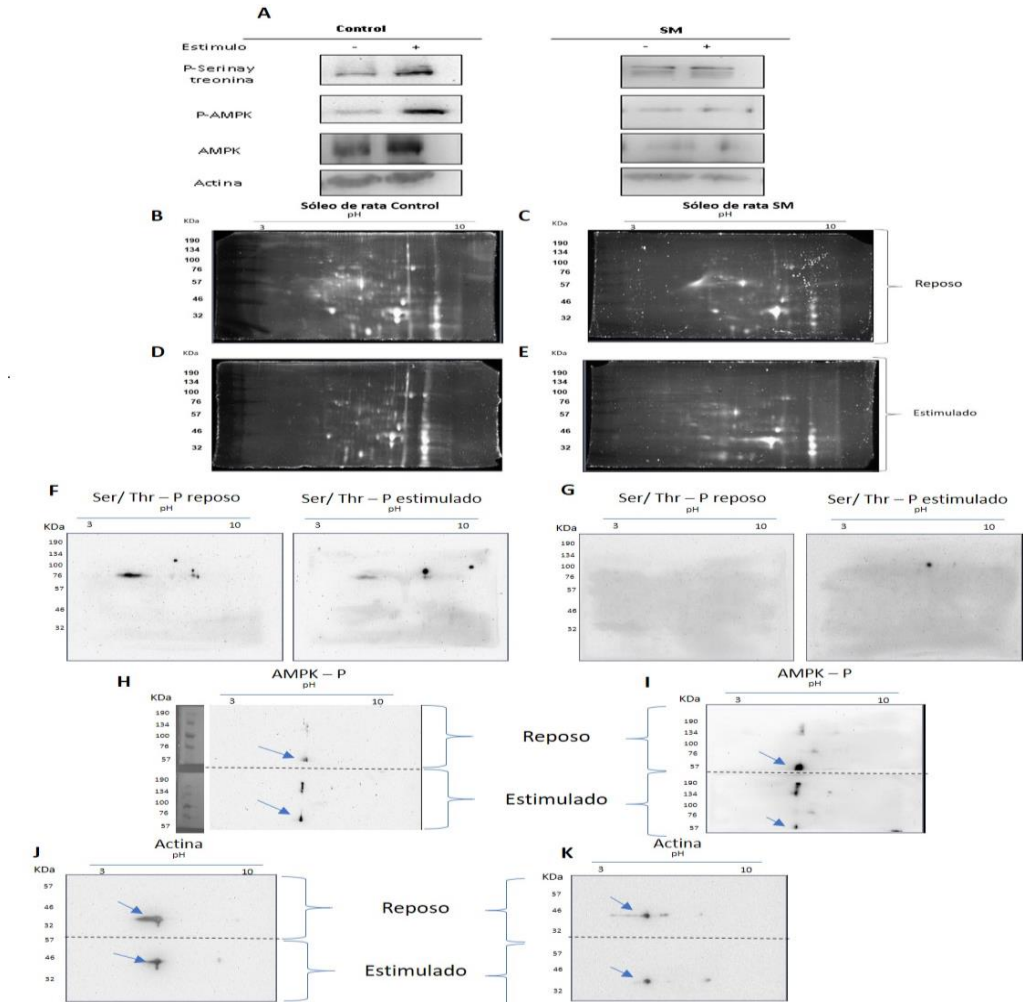
**Figura 12.** Imágenes de Western blot representativo para la expresión y fosforilación de AMPK del SOL de rata (A).

Análisis densitométrico de la expresión (B) y fosforilación (C) de AMPK del SOL de ratas que recibieron dieta estándar y agua de beber simple (Control n=3) y ratas con esta misma dieta pero que hicieron ejercicio (Control + Ejercicio n=4). t-Student, datos normalizados con beta-actina y AMPK respectivamente.





### 13.7 Perfil de fosforilación de proteínas por la activación de AMPK del SOL de rata con SM en respuesta a la contracción



**Figura 13. Imágenes de Western blot para AMPK, AMPK-P y Serina/treonina-P del SOL rata SM.**

El primer carril corresponde a proteína de sóleo mayor a 30 KDa en reposo y en el segundo carril la proteína de sóleo mayor a 30 KDa estimulado por contracción (A). El signo negativo (-) y positivo (+) corresponden a las proteínas enriquecidas en reposo y estimuladas respectivamente. Imágenes del perfil proteómico obtenido por isoelectroenfoque de proteínas del SOL mayores a 30 KDa. Se separaron 200 µg de proteínas de SOL de rata usando tiras de pH 3-10 por isoelectroenfoque, posteriormente fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12% de BIS-acrilamida. Las proteínas fueron teñidas con SYPRO y analizadas en fotodocumentador usando fluorescencia. SOL en reposo de rata Control (B), SOL estimulado de rata Control (C), SOL en reposo de rata SM (D) y SOL estimulado de rata SM (E). Imágenes del western blot para determinar el perfil de fosfoproteínas del SOL de ratas SM. Se obtuvo el perfil por isoelectroenfoque de proteínas del SOL mayores a 30 KDa y western blot. Se usaron anticuerpos para determinar residuos de serina y treonina fosforilados en SOL de ratas control y SM (F y G), AMPK-P (H e I) y actina (J y K), se obtuvieron las imágenes por quimioluminiscencia en fotodocumentador.



Se analizaron las muestras de los músculos SOL enriquecidas con proteínas con un peso mayor de 30 KDa ya que, las proteínas correspondientes al proteoma que se fosforila por efecto de la activación de AMPK corresponde a un peso mayor a 30 KDa, por lo que al hacer este corte se enriqueció la muestra para el momento de hacer el análisis 2D. Para determinar el efecto de la fosforilación de AMPK en respuesta a la contracción muscular inducida con corriente eléctrica sobre la fosforilación de las proteínas en los residuos de serinas y treoninas (A). Se obtuvo un aumento en la fosforilación tanto de AMPK como de serinas y treoninas en el SOL de una rata control, mientras que en el SOL de rata SM parece no haber ocurrido este efecto.

Para obtener el perfil proteómico de rata SM y control se tomaron los SOL de una misma rata, un SOL se usó como testigo en reposo (B y C) mientras que el otro recibió el estímulo para contracción (D y E). Estos resultados son preliminares ya que solo se usaron los SOL de una rata en cada caso para hacer el análisis y no se ven cambios aparentes en los perfiles de proteínas totales.

Se hizo el análisis del SOL aislado de ratas Control y SM en condición de reposo y estimulado por contracción, se usó el SOL de la misma rata como testigo. Mediante la técnica de IEEF y western blot se identificaron proteínas fosforiladas en residuos aminoácidos serinas/treoninas (F y G), AMPK fosforilada (H e I) y



Actina (J y K). En base a estos resultados, se queda en perspectiva mejorar las condiciones de los estudios de proteómica para identificar proteínas.



## 14 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se utilizó un modelo de síndrome metabólico en rata inducido tras suministrar sacarosa al 30% en agua de beber durante 16 semanas, modelo ampliamente estandarizado en el Laboratorio de Nutrición Experimental, según diversos estudios en los que éste modelo fue utilizado para inducir el síndrome metabólico y estudiar sus efectos como lo hizo Baños en 1997 al encontrar los niveles de triglicéridos en suero y la presión sanguínea significativamente elevados en comparación con el grupo control ( $P < .001$ ) y ( $P < .01$ ) respectivamente ( $n=50$ ). Lo cual correlaciona con el estudio que realizan posteriormente Carvajal y Baños en el 2002, replicando el mismo modelo de rata en este caso para estudiar los efectos de la Hipertrigliceridemia e hipertensión sobre la función del miocardio.

En el 2013 Balderas *et. al.* replican el modelo al estudiar los efectos del síndrome metabólico esta vez encontrando que el estrés oxidativo en cardiomiocitos contribuye a disminuir la actividad de SERCA2a en las ratas, en las que al determinar, el porcentaje de grasa abdominal, nivel de triglicéridos en suero, el nivel de insulina y el índice HOMA encontró una diferencia de  $P < 0.05$  en relación a las ratas control, estos resultados avalan que el modelo presenta resistencia a la insulina.

En este modelo se encontraron los factores de riesgo que señala la ATPIII y la OMS para el diagnóstico del SM, en el cual mencionan que al haber 3 de 5



factores entre los que se encuentran la obesidad, hipertensión, diabetes mellitus tipo II, dislipidemias, resistencia a la insulina, entre otros, se determina que existe el SM.

Por lo tanto, al determinar el nivel de triglicéridos y el porcentaje de la relación entre el peso de la grasa visceral y el peso corporal de las ratas, encontramos que aquellas que consumieron la dieta de sacarosa al 30% muestran un aumento significativamente mayor en relación al grupo Control que no consumió la sacarosa. Para la variable de peso corporal como en el peso del tejido adiposo abdominal no se encontraron cambios.

Debido a las alteraciones observadas en los niveles de triglicéridos en sangre y el aumento en la cantidad de tejido adiposo provocados por el SM en las ratas, nos propusimos a determinar si esta condición generaba algún efecto sobre la expresión de proteínas de importancia metabólica a nivel celular.

Para cumplir con la demanda energética derivada de la contracción muscular, entra en juego la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), ya que se propone como un sensor maestro del metabolismo energético celular debido a que al sensar un aumento en la concentración de AMP/ADP en relación con la de ATP, inhibe la actividad de procesos anabólicos para dar paso a la activación de procesos catabólicos como la oxidación de glucosa y de ácidos grasos, por mencionar algunas fuentes.



Al determinar por medio del Western blot la expresión de AMPK y su estado de fosforilación basal en músculos sóleos de ratas con SM, el resultado muestra una disminución tanto en la expresión como en el estado de fosforilación en relación a su grupo control. Por otro lado, no se obtuvieron diferencias al evaluar el músculo EDL, este resultado coincide con lo reportado por Bueno en el 2012 quien propone que las fibras musculares oxidativas son menos afectadas que las glucolíticas en el curso de enfermedades relacionadas con el metabolismo oxidativo y en distrofias musculares, observó una mejora significativa en la función muscular cuando se combina el ejercicio con el medicamento. De manera muy importante, se observa que el SM afecta en mayor medida a aquellas fibras de metabolismo aerobio u oxidativo que utiliza a los ácidos grasos para la obtención de energía.

En consecuencia, la condición de SM afectó disminuyendo la cantidad de AMPK disponible para ser fosforilada y su fosforilación a nivel basal en tejidos musculares con metabolismo de tipo oxidativo, dicho resultado apoya nuestra hipótesis.

Por lo tanto, se evidencia que un estado temprano del SM, al alterar tanto la expresión como el estado de fosforilación basal en el ME, integrado por fibras con un metabolismo oxidativo para ácidos grasos y, al hacer el análisis entre la proteína AMPK fosforilada basal en relación a la fosforilada por el estímulo de contracción muscular inducido por corriente eléctrica en el músculo aislado, se



observa disminuida la fosforilación en relación al grupo control. Sin embargo, no se observa este efecto en el músculo EDL.

La evidencia experimental obtenida tras aplicar los tratamientos de ejercicio en las ratas SM muestran un aumento significativo en la expresión de AMPK en el ME sóleo en relación al grupo que recibió metformina, esto puede deberse a que los mecanismos de acción de cada uno se llevan a cabo por diferentes vías. Al analizar la fosforilación basal de AMPK en el ME sóleo de ratas con SM, tanto las que recibieron metformina como las que hicieron ejercicio, se observa un aumento significativo en relación al grupo que no recibió tratamiento.

Dichos resultados nos llevaron a analizar el aumento en la fosforilación basal de AMPK en relación a la fosforilación por contracción muscular inducida por corriente eléctrica. Obtuvimos que tanto los tratamientos del ejercicio como el de metformina en las ratas con SM, provocaron un aumento significativo en la fosforilación de AMPK en los músculos sóleos, sin embargo, al hacer un análisis de los niveles de triglicéridos en sangre en ambos grupos se obtiene un incremento incluso significativo en aquellas ratas que recibieron metformina, pero una tendencia a disminuir el porcentaje de grasa en relación al peso corporal de las ratas con SM que realizaron ejercicio.

Debido a esto, se hizo un análisis tanto en la expresión como en la fosforilación basal de AMPK en el ME sóleo de ratas SM que realizaron ejercicio y no se



encontraron cambios al compararlas con un grupo control de ratas sanas. Por lo tanto, se concluye que la intensidad del ejercicio no fue la adecuada para propiciar cambio alguno.

Tras conocer que el SM alteraba tanto la expresión como la fosforilación de AMPK en el SOL de las ratas, se inició la estandarización de un estudio de proteómica para analizar estos efectos en el fosfoproteoma por efectos de la activación de AMPK, por lo que, mediante el método del IEEF se obtuvieron imágenes del proteoma del SOL y al combinarlo con Western blot obtuvimos las proteínas fosforiladas en los residuos aminoácidos de serina/treonina, AMPK y de la cantidad total de Actina tras la activación de AMPK por estímulo de contracción que servirán de base para continuar con estudios posteriores de fosfoproteómica. La evidencia experimental muestra solo resultados preliminares.





## 15 CONCLUSIONES

El síndrome metabólico altera la expresión de la proteína AMPK total en el músculo soleo de la rata, provocando la disminución absoluta de su fosforilación y sugiere que existe una alteración diferencial por tipo de músculo ya que el EDL no muestra cambios por efectos del síndrome metabólico.

Un programa de ejercicio aeróbico incrementa tanto la expresión como la fosforilación basal de AMPK en ratas con síndrome metabólico. Así como también, mejora el aumento de la fosforilación de AMPK en respuesta a un estímulo de contracción muscular en ratas con síndrome metabólico.



## **16 PERSPECTIVAS**

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede trabajar sobre la vía de AMPK, identificar las proteínas que modifican su fosforilación por efectos del SM usando estudios de fosfoproteómica empezando por AMPK y la vía río abajo.



## 17 REFERENCIAS

1. Ashmore, C. R., & Doerr, L. (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental Neurology*, 31(3), 408-418.
2. Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. F. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine*, 15(7), 539-553.
3. Andersson, L., & Porath, J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography. *Analytical biochemistry*, 154(1), 250-254.
4. Anguenot, R., Yelle, S., & Nguyen-Quoc, B. (1999). Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe (III)-immobilized metal affinity chromatography. *Archives of biochemistry and biophysics*, 365(1), 163-169.
5. Balderas-Villalobos, J., Molina-Muñoz, T., Mailloux-Salinas, P., Bravo, G., Carvajal, K., & Gómez-Viquez, N. L. (2013). Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
6. Baños, G., Carvajal, K., Cardoso, G., Zamora, J., & Franco, M. (1997). Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *American journal of hypertension*, 10(4), 379-388.
7. Bartlett, J. D., Hwa Joo, C., Jeong, T. S., Louhelainen, J., Cochran, A. J., Gibala, M. J., ... & Morton, J. P. (2012). Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1 $\alpha$  mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 112(7), 1135-1143.
8. Benziene, B., Björnholm, M., Pirkmajer, S., Austin, R. L., Kotova, O., Violette, B., ... & Chibalin, A. V. (2012). Activation of AMP-activated protein kinase stimulates Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in skeletal muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23451-23463.
9. Bori, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Douroudos, I. I., ... & Boldogh, I. (2012). The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Experimental gerontology*, 47(6), 417-424.
10. Carvajal, K., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Archives of medical research*, 34(2), 89-99.



11. Carvajal, K., & Banos, G. (2002). Myocardial function and effect of serum in isolated heart from hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 24(4), 235-248.
12. Cao, S., Li, B., Yi, X., Chang, B., Zhu, B., Lian, Z., ... & Zhang, H. (2012). Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One*, 7(12), e51709.
13. De Souza, E. O., Tricoli, V., Roschel, H., Brum, P. C., Bacurau, A. V. N., Ferreira, J. C. B., ... & Ugrinowitsch, C. (2013). Molecular adaptations to concurrent training. *International journal of sports medicine*, 34(03), 207-213.
14. Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V. A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., ... & Visconti, P. E. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11579-11589..
15. Fisher, J. S., Gao, J., Han, D. H., Holloszy, J. O., & Nolte, L. A. (2002). Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 282(1), E18-E23.
16. Friedrichsen, M., Mortensen, B., Pehmøller, C., Birk, J. B., & Wojtaszewski, J. F. (2013). Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. *Molecular and cellular endocrinology*, 366(2), 204-214.
17. Frøsig, C., Jensen, T. E., Jeppesen, J., Pehmøller, C., Treebak, J. T., Maarbjerg, S. J., ... & Kiens, B. (2013). AMPK and insulin action-responses to ageing and high fat diet. *PLoS One*, 8(5), e62338.
18. Goodyear, L. J., Giorgino, F. R. A. N. C. E. S. C. O., Balon, T. W., Condorelli, G. E. R. O. L. A. M. A., & Smith, R. J. (1995). Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268(5), E987-E995.
19. Gulli, R. A., Tishinsky, J. M., MacDonald, T., Robinson, L. E., Wright, D. C., & Dyck, D. J. (2012). Exercise restores insulin, but not adiponectin, response in skeletal muscle of high-fat fed rodents. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(10), R1062-R1070.
20. Jeppesen, J., Maarbjerg, S. J., Jordy, A. B., Fritzen, A. M., Pehmøller, C., Sylow, L., ... & Qvortrup, K. (2013). LKB1 regulates lipid oxidation during exercise independently of AMPK. *Diabetes*, 62(5), 1490-1499.



21. Jones, A. M., Bennett, M. H., Mansfield, J. W., & Grant, M. (2006). Analysis of the defence phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* using differential mass tagging. *Proteomics*, 6(14), 4155-4165.
22. Jørgensen, S. B., O'Neill, H. M., Hewitt, K., Kemp, B. E., & Steinberg, G. R. (2009). Reduced AMP-activated protein kinase activity in mouse skeletal muscle does not exacerbate the development of insulin resistance with obesity. *Diabetologia*, 52(11), 2395-2404.
23. Kageyama, Y., Hyochi, N., Kihara, K., & Sugiyama, H. (2007). The androgen receptor as putative therapeutic target in hormone-refractory prostate cancer. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2(3), 203-211.
24. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism*, 1(1), 15-25.
25. Koltai, E., Hart, N., Taylor, A. W., Goto, S., Ngo, J. K., Davies, K. J., & Radak, Z. (2012). Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(2), R127-R134.
26. Kristensen, J. M., Larsen, S., Helge, J. W., Dela, F., & Wojtaszewski, J. F. (2013). Two weeks of metformin treatment enhances mitochondrial respiration in skeletal muscle of AMPK kinase dead but not wild type mice. *PLoS one*, 8(1), e53533.
27. Larsen, M. R., & Roepstorff, P. (2000). Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7), 677-690.
28. Larsen, S., Kristensen, J. M., Stride, N., Wojtaszewski, J. F. P., Helge, J. W., & Dela, F. (2012). Skeletal muscle mitochondrial respiration in AMPK  $\alpha 2$  kinase-dead mice. *Acta Physiologica*, 205(2), 314-320.
- Lashner, B. A., Kirsner, J. B., & Hanauer, S. B. (1986). Acute pancreatitis associated with high-concentration lipid emulsion during total parenteral nutrition therapy for Crohn's disease. *Gastroenterology*, 90(4), 1039-1041.
29. Long, Y. C., & Zierath, J. R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1776-1783.
- Lu, G., & Wang, Y. (2008). Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(2), 107-112.



30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
31. Mason, R. R., Meex, R. C., Lee-Young, R., Canny, B. J., & Watt, M. J. (2012). Phosphorylation of adipose triglyceride lipase Ser404 is not related to 5'-AMPK activation during moderate-intensity exercise in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(4), E534-E541.
32. Mitsuishi, M., Miyashita, K., Muraki, A., Tamaki, M., Tanaka, K., & Itoh, H. (2013). Dietary protein decreases exercise endurance through rapamycin-sensitive suppression of muscle mitochondria. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(7), E776-E784.
33. Musi, N., Hirshman, M. F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., ... & Moller, D. E. (2002). Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(7), 2074-2081.
34. O'Neill, H. M. (2011). Maarbjerg SJ Crane JD Jeppesen J Jørgensen SB Schertzer JD Shyroka O Kiens B van Denderen BJ Tarnopolsky MA AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *PNAS*, 108, 16092-16097. Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(8), 457. Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.
35. Oliveira, N. R., Marques, S. O., Luciano, T. F., Pauli, J. R., Moura, L. P., Caperuto, E., ... & Lira, F. S. (2014). Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 $\alpha$  protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. *Mediators of inflammation*, 2014.
36. Pandke, K. E., Mullen, K. L., Snook, L. A., Bonen, A., & Dyck, D. J. (2008). Decreasing intramuscular phosphagen content simultaneously increases plasma membrane FAT/CD36 and GLUT4 transporter abundance. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(3), R806-R813.
37. Richter, E. A., & Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological reviews*, 93(3), 993-1017.
38. Röckl, K. S., Witczak, C. A., & Goodyear, L. J. (2008). Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB life*, 60(3), 145-153.
39. Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M., & Cacicedo, J. M. (2013). AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 123(7), 2764-2772.



40. Steinberg, G. R., O'Neill, H. M., Dzamko, N. L., Galic, S., Naim, T., Koopman, R., ... & Schertzer, J. D. (2010). Whole body deletion of AMP-activated protein kinase  $\beta 2$  reduces muscle AMPK activity and exercise capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37198-37209.
  
41. Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in health and disease. *Physiological reviews*, 89(3), 1025-1078.
  
42. Wright, D. C., Hucker, K. A., Holloszy, J. O., & Han, D. H. (2004).  $Ca^{2+}$  and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes*, 53(2), 330-335.



## 18 APÉNDICE

Tabla 3. Buffers usados para electroforesis, transferencia y WB.

Buffer	Composición
TBS (1X)	20 mM Tris y 150 mM NaCl; ajustar pH a 7.4
PBS (10X)	82 g de NaCl, 16g de $\text{PO}_4\text{HNa}(2\text{H}_2\text{O})$ y 1.56 de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ disueltos en 800 mL de agua grado II y ajustar pH a 7.4, aforar a 1L.
PBST (1X)	Diluir del stock PBS 10 X y agregar 1mL de Tween 20, aforar a 1L.
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	18.17g/80 mL de Tris-base en agua grado II; ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.605g/80 mL de Tris-base en agua grado II; ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar a 100 mL
Corrida (5X)	15g de Tris-base. 72 g de glicina y 5 g de SDS disueltos en 800 mL de agua grado II y ajustar pH a 8.3, aforar a 1L.
TRANSFERENCIA (5X)	15g de Tris-base, 15 g de glicina disueltos en 800 mL de agua grado II y ajustar pH a 8.5, aforar a 1L.
Corrida (1X)	Diluir del stock 5 X, aforar a 1L.
TRANSFERENCIA (1X)	Diluir del stock 5 X 50mL en 150 mL de agua grado II y agregar 50 mL de MeOH.





**Tabla 4 . Buffer de lisis anti fosfatasa y anti proteasas.**

Marca	Sustancia	Molaridad (mM)	Masa molar (g/mol)	mg/100ml
SIGMA T-1503	HEPES	50	238.3	0
MERCK 4936	KCl	50	74.75	0
SIGMA E-005	EDTA	1	292.2	0
SIGMA E4378	EGTA	1	380.35	0
SIGMA 50020	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	5	306.11	0
SIGMA X100	TRITON X100	0.10%		100 µl
SIGMA D-9163-5G	DTT	1	154.2	1µl/ml
SIGMA 6508	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1	183.9	10µl/ml
SIGMA 7626	PMFS	0.2	174.2	2µl/ml
SIGMA 7920	NaF		41.99	50µl/ml
SIGMA P7626-26G	NaPPi		221.9	20µl/ml
ROCHE	Coctel anti-proteasas	stock 10 X		1.6µl/ml



**Tabla 5. Anticuerpos para western blot**

ANTICUERPOS PRIMARIOS	MARCA	DILUCIÓN (WB)	BUFFER Y DILUCIÓN	CONDICIONES
Anti-AMPK	Cell Signaling	1:1000	3% leche descremada en TBS, Azida de sodio	4°C/toda la noche
Anti-PAMPK	Cell Signaling	1:1000	3% leche descremada en TBS, Azida de sodio	4°C/toda la noche
Anti-Fosfoserina/treonina	Abcam	1:1000	3% leche descremada en TBS, Azida de sodio	4°C/toda la noche
Anti-Actina	Sigma	1:10 000	3% leche descremada en TBS, Azida de sodio	T° ambiente/1 h
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>				
HRP conjugated rabbit anti-IgG	Cell Signaling	1:1000	3% leche descremada en PBST	25°C/1 h
HRP conjugated rabbit anti-IgG	Cell Signaling	1:2000	3% leche descremada en PBST	25°C/1 h
HRP conjugated mouse anti-IgG	Cell Signaling	1:1000	3% leche descremada en PBST	25°C/1 h



**Tabla 6. Buffer de Ringer Krebs**

<b>Reactivo</b>	<b>Molaridad (mM)</b>	<b>Masa molar (g/mol)</b>	<b>g/1000ml</b>
<b>NaCl</b>	<b>135</b>	<b>58.44</b>	<b>7.89</b>
<b>KCl</b>	<b>5</b>	<b>74.55</b>	<b>0.373</b>
<b>MgCl</b>	<b>1</b>	<b>95.22</b>	<b>0.095</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>15</b>	<b>84.01</b>	<b>1.26</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1</b>	<b>142</b>	<b>0.142</b>
<b>Glucosa</b>	<b>11</b>	<b>180.2</b>	<b>1.98</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>2.5</b>	<b>147</b>	<b>1.25 ml</b>
<b>Ácido pirúvico</b>	<b>2</b>	<b>110</b>	<b>0.22</b>
<b>Se prepara el día del sacrificio, se agrega el CaCl<sub>2</sub> mientras se agita el buffer y se burbujea con carbógeno por 20 min. se ajusta el pH a 7.4 y se afora.</b>			



**Tabla 7. Equipos**

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>
<b>Espectrofotómetro</b>	<b>Cary 100</b>
<b>Cámara de electroforesis</b>	<b>Tetracell</b>
<b>Cámara de transferencia</b>	<b>Power supplies Enduro Labnet</b>
<b>Fotodocumentador</b>	<b>Chemidoc BIORAD</b>
<b>Centrifuga</b>	<b>Centrifuge 5804 R eppendorf</b>
<b>Sistema de isoelectroenfoque</b>	<b>PROTEAN IEF Cell Bio-Rad</b>
<b>Cámara amicón</b>	<b>Millipore 8050</b>
<b>Estimulador eléctrico</b>	<b>GRASS S88</b>
<b>Transductor eléctrico</b>	<b>GRASS SIU 5</b>
<b>Homogenizador</b>	<b>PRO Scientific 200</b>