



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de grado

**Estudio del efecto de ácidos grasos sobre la
expresión de genes relacionados con el control del
metabolismo energético en células musculares.**

Fco. Javier Monserrat Sanmartín

Grado de Biología

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 43221462T

Treabajo tutelado por: Ana María Rodríguez Guerrero
Departamento de Biología fundamental y Ciencias de la Salud

NO se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo: células musculares, ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato, aicar, PGC1 α , UCP3, CPT1b, PDK4, FAS, IL6, FNDC5.

Índice

Resumen.....	4
Abreviaturas.....	6
1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	13
3. Diseño experimental.....	14
3.1. Descongelación de las células.....	14
3.2. Subcultivos de células C2C12.....	14
3.3. Diferenciación de las células C2C12 a miotubos.....	15
3.4. Tratamientos utilizados durante la diferenciación de las células C2C12.....	15
3.5. Extracción y purificación de RNA.....	16
3.6. Análisis por retrotranscripción (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	16
3.7. Análisis estadísticos.....	17
4. Resultados	17
5. Discusión	22
6. Conclusión	25
7. Agradecimientos	25
8. Referencias	26
9. Anexos	29
9.1. Anexo 1: Protocolo para la descongelación de las células.....	29
9.2. Anexo 2: Protocolo para realizar un subcultivo de células C2C12.....	29
9.3. Anexo 3: Protocolo para la diferenciación de células C2C12 a miotubos.....	30
9.4. Anexo 4: Protocolo para la extracción y purificación del RNA en columnas...31	
9.5. Anexo 5: Protocolo del análisis de la expresión génica por RT-qPCR.....	35

Resumen

En el músculo esquelético se lleva a cabo de forma principal la oxidación de ácidos grasos (AG) y glucosa, permitiendo controlar un gran número de aspectos sobre el metabolismo del organismo, además de tener la capacidad de producción de numerosas proteínas encargadas de la comunicación, como las mioquinas. Actualmente, la búsqueda de compuestos relacionados con la dieta capaces de influir en el metabolismo de las células musculares produciendo efectos potencialmente beneficiosos para el organismo es de gran interés. Un caso interesante sería el de los AG de cadena corta (AGCC).

Los AGCC se producen principalmente en el colon y el ciego gracias a la acción de la población bacteriana presente en el organismo aunque su producción también depende de otros factores como la dieta o el estrés. Se sabe que los AGCC pasan a la circulación sanguínea y son capaces de actuar sobre el metabolismo de la glucosa, lípidos y colesterol y en general se ha descrito que presentan diversos efectos beneficiosos sobre la salud.

En el presente trabajo, se estudió el efecto de los AGCC sobre la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo energético en el músculo, centrándose principalmente en el Acetato y Propionato, ya que son los ácidos grasos mayoritarios producidos en el colón. Para ello se utilizaron células C2C12 de ratón, las cuales fueron sometidas a un proceso de cultivo y diferenciación y que posteriormente fueron tratadas con Acetato y Propionato, solos o en combinación con AICAR (un activador de la proteína quinasa activada por la AMP, la AMPK). El RNA de cada muestra fue obtenido mediante un proceso de extracción y purificación de RNA, seguido de un proceso de Rt-qPCR, lo que permitió poder determinar los niveles de expresión de los genes de interés en las células tratadas.

Los resultados indican que el acetato podría potenciar la capacidad de oxidación de lípidos en células musculares mientras que el principal efecto del propionato estaría relacionado con una posible inhibición de la expresión de mioquinas (Irisina e IL6). En general, a partir de los datos obtenidos en este estudio y teniendo en cuenta que los trabajos realizados con AGCC sobre células musculares son bastante novedosos, se puede decir que los AGCC tienen un importante efecto en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo energético en las células musculares y que esta expresión puede verse condicionada por la presencia de AICAR en combinación con los AGCC en la mayoría de los genes estudiados.

Palabras clave: células musculares, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), acetato, propionato, aicar, PGC1 α , UCP3, CPT1b, PDK4, FAS, IL6, FNDC5.

Abstract

In skeletal muscle importantly takes place the oxidation of fatty acids (FA) and glucose, allowing the control of a large number of aspects of the metabolism of the body, in addition of having the capacity to produce numerous proteins responsible for intercellular communication, such as miokines. Currently, the search for compounds related to the diet capable of influencing the metabolism of muscle cells producing potentially health beneficial effects on the organism is of great interest. An interesting case would be short-chain FA (SCFA).

SCFA occur mainly in the colon and cecum due to the action of the bacterial population present in the body, although its production also depends on other factors such as diet or stress. We know that SCFA pass into the bloodstream and are able to act on glucose, lipid and cholesterol metabolism and they have been generally described as able to show various beneficial effects on health.

In this work, we studied the effect of SCFA on the expression of the genes related to energy metabolism in muscle cells, focusing primarily on acetate and propionate as they are the main FA produced in the colon. We used murine C2C12 cells, which were subjected to a process of culture and differentiation and which were subsequently treated with acetate and propionate, alone or in combination with AICAR (an activator of AMP activated protein kinase, AMPK). The RNA of each sample was obtained through a process of extraction and purification of RNA, followed by a process of Rt-qPCR, which allowed to determine the levels of expression of genes of interest in the treated cells.

The results indicate that acetate may enhance the capacity of oxidation of lipids in muscle cells while the main effect of propionate would be related to a possible inhibition of the expression of miokines (Irisin and IL6). In general, based on the data obtained in this study and taking into account that the works carried out with SCFA on muscle cells are quite innovative, it can be suggested that SCFA have an important effect on the expression of genes related to energy metabolism in muscle cells and that this expression may be conditioned by the presence of AICAR in combination with the SCFA in the majority of the studied genes.

Key words: muscle cells, short-chain fatty acids (SCFA), acetate, propionate, aicar, PGC1 α , UCP3, CPT1b, PDK4, FAS, IL6, FNDC5.

ABREVIATURAS más utilizadas

AG: Ácido graso

AGCL: Ácido graso de cadena larga

AGCC: Ácido graso de cadena corta

PGC1- α : Co-activador del receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales 1 alfa (*Peroxisome proliferator activated receptor Gamma Coactivator 1- alpha*)

UCP-3: Proteína desacoplante mitocondrial 3 (*Uncoupling Protein 3*)

CPT1-b: Carnitina palmitoiltransferasa 1 (*Carnitine Palmitoyl Transferase 1*)

PDK4: Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4 (*Pyruvate Dehydrogenase kinase, isozyme 4*)

FAS: Ácido graso sintasa (*Fatty Acid Synthase*)

IL-6: Interleucina-6 (*Interleukin-6*)

FNDC5: Proteína que contiene dominio tipo III de fibronectina 5 (*Fibronectin type III domain-containing protein 5*)

AMP: Adenosín monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

1. Introducción

La palabra músculo es un término que procede de la palabra latina *musculus* y tiene el significado de "ratón pequeño", lo que permite que se consideren a los músculos como los motores del cuerpo(1).

El músculo esquelético se encuentra formado por haces de fibras cilíndricas largas y plurinucleadas, con estriaciones longitudinales y transversales. La célula muscular, se caracteriza por ser una de las células más grandes del cuerpo, ésta se origina en el embrión como resultado de la fusión de los mioblastos (2).

El músculo esquelético presenta diferentes propiedades, como la excitabilidad, contractibilidad, elasticidad, extensibilidad o plasticidad entre otras y, para que todas estas propiedades puedan darse, el sistema nervioso es indispensable (1).

En cada fibra muscular, se encuentra un sarcolema, que es la membrana que delimita la fibra; y un sarcoplasma, que es el citoplasma de la célula en cuyo interior se hayan unas miofibrillas responsables de la contracción muscular.

Cada fibra muscular, es el resultado de la unión de varias células no diferenciadas, uninucleadas, denominadas mioblastos(2).

El músculo esquelético es el lugar principal para la oxidación de ácidos grasos y la glucosa, lo que permite controlar múltiples aspectos del metabolismo del cuerpo, además de producir diferentes proteínas encargadas de la señalización muscular (3). Además, se trata de un importante órgano secretor y liberador de unas proteínas señal denominadas miokinas.(4, 5). Se denomina miokinas a aquellas citoquinas o péptidos de bajo peso molecular que son producidas, liberadas o expresados por las fibras musculares esqueléticas y que ejercen importantes funciones de comunicación celular. En su mayoría su producción está estimulada por el ejercicio y se sabe que tiene efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos sobre el organismo, es decir que actúan sobre la misma célula, sobre una célula vecina o se liberan a la circulación sanguínea(6, 7). Existen varias miokinas, aunque las más conocidas son la IL6, 8 y 15 y la Irisina (24). Nosotros hablaremos más adelante de la importancia y de los efectos de la IL6 y la Irisina.

En el presente trabajo nos hemos centrado en estudiar compuestos relacionados con la dieta que puedan influir en el metabolismo de las células musculares con potenciales efectos beneficiosos en el organismo, regulando la expresión de genes clave del metabolismo de la célula muscular y genes de mioquinas. En este sentido, se propuso estudiar el papel de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Podemos definir los AGCC como ácidos grasos volátiles de 1 a 6 carbonos, pudiendo existir ramificaciones o no. De entre los diferentes AGCC, destacan el fórmico, acético, propiónico, butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico y caproico. De todos estos, los mayoritarios son los ácidos acético, propiónico y butírico, presentando un ratio molar en el colon de 60:20:20, siendo el ácido acético el que se encuentra en mayor proporción, aunque estas concentraciones son variables y pueden modificarse según la zona del cuerpo, ya que ésta es menor por ejemplo, en la zona distal del colon, aunque también se sabe que la concentración depende del tipo de fibra que se consuma (soluble o no soluble)(8). Los AGCC que se producen en el colon y el ciego, también podemos encontrarlos en la sangre hepática, portal y periférica, y pueden actuar como sustratos o señales de otros órganos (9).

El tipo de AGCC que se produce y su cantidad están muy relacionado con el tipo de población bacteriana presente en el organismo, la dieta consumida, los niveles de estrés, la cantidad de ejercicio realizado, etc(10).

Se sabe que estos AGCC pueden actuar sobre el metabolismo de los lípidos, glucosa y colesterol, además de presentar efectos beneficiosos y positivos sobre la salud, como incrementar la sensibilidad a la insulina o reducir el estado pro-inflamatorio entre otros(8).

Los AGCC tienen la capacidad de regular el balance entre la síntesis de ácidos grasos, su oxidación y la lipólisis. Los AGCC en el músculo, hígado y tejido adiposo marrón estimulan y activan la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL)(11). El balance neto del proceso es una reducción de los ácidos grasos que circulan libres por el plasma y un descenso del peso corporal, además de los efectos beneficiosos que presentan sobre el metabolismo de la glucosa, normalizando los niveles de glucosa en plasma y proporcionando una mayor captación de ésta(9).

Para nuestro trabajo, se decidió utilizar acetato y propionato al ser los AGCC mayoritarios producidos en el intestino y que pasan a la sangre (como se comenta más arriba) y teniendo en cuenta resultados previos obtenidos con estos dos ácidos grasos sobre su efecto en el metabolismo de otro tipo celular *in vitro* en el laboratorio en que se ha realizado el presente trabajo.

El *ácido acético* o *acetato*, en su mayor parte, es captado por el hígado, donde sirve como sustrato para la síntesis de colesterol, ácidos grasos de cadena larga y como co-sustrato para la síntesis de glutamina y glutamato, además de servir como sustrato energético(9). También es capaz de metabolizarse a CO₂ en los tejidos periféricos, como son el corazón, tejido adiposo, riñones y músculo(9).

El acetato, también es capaz de regular la expresión de genes que codifican enzimas implicados en el uso y la oxidación de ácidos grasos, como la acetil-CoA oxidasa (ACO), la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), y la proteína desacoplante-2 (UCP-2), a través de la vía mediada por el receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales (PPAR- γ) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)(12).

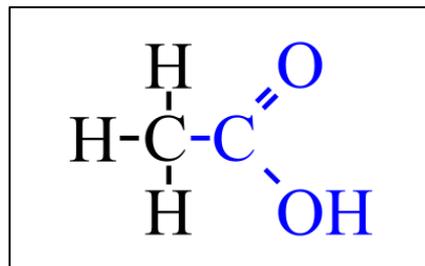


Fig.1. Representación molecular del Ácido acético (1)

En cuanto al *ácido propiónico*, la mayoría es captado por el hígado, donde actúa como precursor de la gluconeogénesis(9) además de tener un efecto importante en la inhibición de la síntesis endógena de colesterol en el hígado y de presentar un papel regulador de la adipogénesis(13), aunque algunos de estos efectos aún están en estudio.

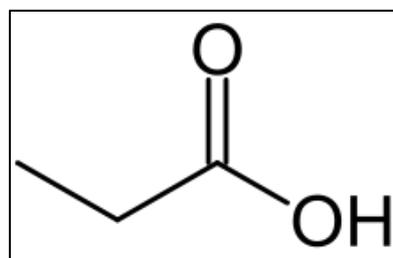


Fig.2. Representación molecular del Propionato (2).

Así pues, el tratamiento de las células musculares durante su diferenciación con AGCC y Aicar ha despertado nuestro interés para poder estudiar y observar el posible efecto que pueden

tener sobre la expresión de diferentes genes. Los genes de interés en este estudio han sido el PGC1 α , UCP3, CPT1b, PDK4, FAS, IL6 y FNDC5.

La PGC1 α o (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), es un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético(14). Este coactivador es el inductor central de la biogénesis mitocondrial en las células y se encarga de controlar el metabolismo oxidativo mediante un proceso de remodelación celular (15). Interactúa con PPARgamma, lo que facilita su interacción con múltiples factores de transcripción. Se trata de un importante regulador en la determinación del tipo de fibra muscular, de la misma manera que puede verse involucrado en controlar otros estados fisiológicos como la presión arterial, la regulación de la homeostasis del colesterol celular o el desarrollo de la obesidad entre otros(14). La expresión de este factor transcripcional, se produce con mayor abundancia en aquellos tejidos que tienen una mayor demanda en la producción de energía (como el músculo) y esta inducida por múltiples factores como el frío, el ayuno en el corazón, o el ejercicio en el músculo esquelético(15). En este último, la expresión de la PGC1 α se enriquece principalmente en las fibras de contracción lenta, que son las fibras más oxidativas. Estudios realizados en animales, demostraron que el ejercicio y el entrenamiento de resistencia a corto plazo, podían activar la expresión de la PGC1 α en el músculo esquelético(15). También se ha podido comprobar, que la expresión de PGC1 α es suficiente para conducir el programa de contracción lenta del músculo esquelético, además de jugar un papel importante como mediador del metabolismo energético, así como en la adaptación estructural del músculo esquelético al ejercicio. Es importante destacar el papel que ejerce en la regulación del metabolismo de la glucosa en el músculo, donde se ha observado que la inhibición de la oxidación de la glucosa con un aumento en la captación de ésta en los músculos (mediado por el GLUT4) serviría para poder recuperar las reservas de glucógeno muscular perdidas y prepararse para el siguiente episodio de ejercicio intenso(15).

Las UCPs o (proteínas *desacoplantes mitocondriales*), se caracterizan por desacoplar la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP con la disipación de la energía en forma de calor y produciendo un efecto sobre el metabolismo energético. Además se encargan de facilitar la transferencia de los aniones desde el interior de la membrana mitocondrial interna al exterior de la membrana mitocondrial interna. Se cree, que el origen de estos genes proteicos reside en proteger a las mitocondrias del estrés oxidativo. Los niveles de expresión de este gen aumenta cuando las fuentes de AG de las mitocondrias exceden su capacidad de oxidación y esta proteína permite la exportación de estos AG de las mitocondrias(16). Existen tres tipos de proteínas desacoplantes, la UCP1, UCP2 y la UCP3, pero para este trabajo sólo nos centraremos en la última de ellas, ya que de las tres es la que se ha asociado más claramente con un papel relacionado con el manejo de ácidos grasos como combustible y se ha descrito una importante inducción de su expresión cuando se incrementa el aporte de ácidos grasos de cadena larga a las células musculares(17). Aparte de los AGCL, situaciones fisiológicas como el ayuno(donde se produce un incremento importante de ácidos grasos libres que llegan al músculo, liberados por el tejido adiposo) o el ejercicio actúan como fuertes promotores de la expresión de la UCP3 en el músculo esquelético. Además, como se comentaba más arriba en general para las UCPs, se ha visto que la UCP3 tiene un papel importante en la regulación de las ROS y en la regulación del metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético(18).

La CPT1b o (*Carnitina palmitoiltransferasa*) es una enzima clave en la beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga en el músculo esquelético, regulando su entrada a la mitocondria, para ser oxidados y generar energía(19). El transporte de los ácidos grasos del citoplasma a la mitocondria para su oxidación tiene lugar gracias a su unión con moléculas de carnitina. Este sistema de transferencia (CPT) es necesario, debido a que los AGCL no son capaces de penetrar por sí solos la membrana mitocondrial y sí lo hacen unidos a carnitina. Los AGCL deben ser activados en la membrana mitocondrial externa, donde se encuentran en forma de Acil-CoA, pero para poder ser oxidados una vez activados, deben llegar a la matriz

mitocondrial. Para ello, deben unirse a la CPT1b, que permite formar el complejo carnitina acil-CoA, que permite el paso de los AGCL desde la membrana externa hacia la matriz mitocondrial. Una vez en la matriz, la CPT2b, se encarga de revertir el proceso, separando el acil-CoA de la carnitina, permitiendo así la oxidación del AG(20).

La *PDK4* o (*piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4*); se trata de una proteína localizada en la matriz de la mitocondria y que inhibe el complejo piruvato deshidrogenasa al fosforilar una de sus subunidades, contribuyendo de esta manera a la regulación del metabolismo de la glucosa, limitando la oxidación de la misma, es decir, impidiendo la transformación de piruvato en acetil-CoA. Se ha visto que la expresión de esta proteína, está regulada por los glucocorticoides, el ácido retinoico y la insulina(21).

También se ha podido comprobar que los estímulos fisiológicos que inducen la expresión de la PGC1 α en el músculo esquelético, en coordinación también producen un aumento de la expresión de la proteína PDK4, con lo que se podría decir que la expresión de uno depende de la disposición del otro(22).

La *FAS* o (*Ácido graso sintasa*), es una enzima multifuncional que cataliza la biosíntesis de los ácidos grasos en el citoplasma de las células principalmente en el tejido adiposo y el hígado. Se encarga de catalizar la unión del palmitato a partir de un molécula de Acetil-CoA y siete de Malonil-CoA. Esta enzima es expresada, aparte de en el hígado y el tejido adiposo, también en otros tejidos como las glándulas mamarias y desempeña un papel fundamental en la homeostasis energética, convirtiendo el exceso de alimento consumido en lípidos que serán almacenados para su posterior utilización y proporcionando energía mediante la oxidación(23).

La *IL6* o (*Interleucina 6*), es una citoquina perteneciente al grupo de citoquinas tipo 1, producida por un gran número de células, principalmente fibroblastos, monocitos y células endoteliales. En su producción, también participan un gran número de células del sistema inmune, como células T o macrófagos(24). Se ha visto que el IL6 puede actuar tanto de forma autocrina como paracrina en el tejido adiposo, así como también de forma endocrina en otros tejidos periféricos, como el músculo esquelético, produciendo alteraciones en el peso corporal, la homeostasis energética y la sensibilidad a la insulina(25). Se ha visto que la presencia de IL6 muscular se ve aumentada con un ejercicio prolongado y que su concentración en el plasma sanguíneo depende del ejercicio, de la duración, la intensidad y la masa del músculo. Esta proteína es expresada en las fibras musculares al inicio del ejercicio y se libera del músculo durante la actividad física(25). En cuanto a sus efectos, a pesar de haber sido clásicamente clasificada como una interleucina pro-inflamatoria, presenta un importante papel antiinflamatorio en el músculo que se ha asociado a efectos saludables sobre la salud, además de promover la sensibilidad a la insulina. La IL6 también presenta un importante papel en la producción de glucosa endógena durante la actividad muscular(4-26) y presenta una importante relación con la proteína quinasa AMPK, que es activada por el AMP. La activación de la AMPK producida por un aumento de la IL6 estimula la oxidación de los ácidos grasos promoviendo una mayor absorción de glucosa. Además de todos estos efectos, la IL6 presenta una tasa de transcripción mucho mayor que otros genes del músculo y ésta se encuentra modulada por la disponibilidad de carbohidratos presentes en el músculo, así que se considera que es capaz, como la propia AMPK, de actuar como un sensor de disponibilidad energética (27-28).

FNDC5 (*proteína que contiene dominio tipo III de Fibronectina 5*) es una proteína del músculo, con 5 dominios y que es inducida por el ejercicio. Al producirse un aumento del ejercicio, se induce la expresión del PGC1- α , que participa en la adaptación al ejercicio, produciendo una activación del gen muscular de la *FNDC5*. Ésta presenta una serie de características similares a las proteínas de membrana tipo I y por lo tanto puede ser troceada y liberar de esta forma, una proteína mucho más pequeña, la *Irisina*. Por ello, la *FNDC5* es precursora de la *Irisina*(29). Boström et. al. propusieron que la *Irisina* y su precursor, la *FNDC5*

promovían o inducían la conversión de adipocitos blancos en marrones, así como también una inducción de la termogénesis (los adipocitos marrones están especializados en termogénesis) (30), lo que suponía un incremento en el desacoplamiento de los niveles de la proteína desacoplante 1(UCP1)(principal efector termogénico en adipocitos marrones) tanto en cultivos como en modelos con ratones(31). También se ha observado, que un sobreexpresión (en modelos transgénicos) de este factor impide un aumento de la grasa en ratones(31). También cabe destacar otros efectos que tiene sobre el organismo, ya que la expresión de FNDC5 tiene un efecto muy beneficioso sobre el cerebro, estimulando la expresión de determinados genes y produciendo una mejora en la capacidad cognitiva, el aprendizaje y la memoria(32).

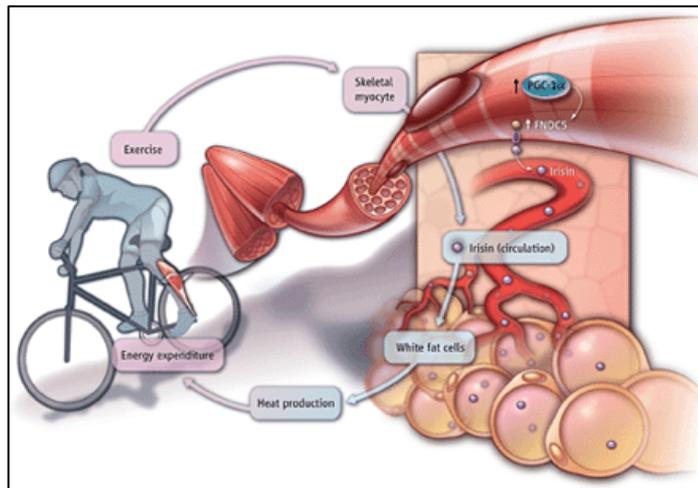


Fig.3. Ciclo de la inducción y liberación de la Irisina (3).

Por otro lado, también se ha considerado oportuno introducir en este estudio el AICAR, para poder observar el efecto que tiene por si solo y principalmente el efecto que ejerce en combinación con los AGCC sobre la expresión de determinados genes.

El AICAR, es un análogo del AMP, capaz de estimular la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) y que es capaz de simular los efectos del ejercicio físico en el metabolismo, produciendo unos importantes efectos sobre la obesidad, diabetes y la tensión. Presenta varios efectos sobre el organismo, como mejorar la utilización de las grasas como fuente de energía, mejorar la cantidad de las mitocondrias y la función de éstas, aumentar la expresión de proteínas regeneradoras del tejido muscular, etc. También tiene un efecto positivo, al aumentar la captación de glucosas antes y después del ejercicio(33, 34).

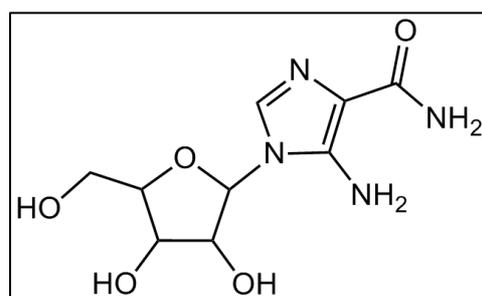


Fig.4. Representación molecular del AICAR (4).

Basándonos en todas las evidencias recopiladas anteriormente, y teniendo en cuenta la importancia del músculo energético en cuanto a la disposición de energía así como el efecto de los AGCC sobre el músculo y sobre la regulación del metabolismo energético, con este trabajo se intentará estudiar el posible efecto que tiene los AGCC y el AICAR aplicados durante la diferenciación de células musculares sobre los diferentes genes estudiados, todos ellos muy relacionados con el metabolismo energético, y poder determinar si su expresión se ve afectada o no, apártate de poder obtener las conclusiones pertinentes sobre dicho estudio.

2. Objetivos

Los principales objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

- La realización de cultivos celulares con células C2C12 en combinación con diferentes tratamientos, AICAR y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), acetato y ácido propiónico; la extracción y purificación del RNA y su posterior análisis para poder determinar las variaciones en la expresión de diferentes genes.
- Describir el perfil de los AGCC utilizados y su papel sobre las células musculares y la expresión de determinados genes.
- Familiarizarse, aprender y adquirir manejo en las diferentes técnicas de cultivos celulares, en el uso de material de laboratorio, así como en el análisis de datos estadísticamente.
- Aprender los principales aspectos relacionados con diseñar y llevar a cabo un trabajo experimental original y poder extraer las conclusiones más apropiadas derivadas de los resultados obtenidos.

3.Diseño experimental: Materiales y métodos

Para el desarrollo de este experimento en el laboratorio, se utilizó un stock de células musculares presente en el Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología de la UIB, obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células C2C12 son una línea celular comercial procedentes de ratón, que habían sido mantenidas en nitrógeno líquido (un medio apropiado de crionización) para su conservación.

Una vez obtenidas las muestras, tuvo lugar el inicio del trabajo en el laboratorio con el tratamiento de las células. Se descongelaron previamente las células, para poder realizar el cultivo adecuadamente y observar el crecimiento y la diferenciación de las mismas. Una vez obtenida una confluencia celular óptima se aplicaron los diferentes tratamientos, basados en la utilización de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente Acetato y Propionato.

Obtenido el cultivo celular se realizó una purificación y extracción del ARN celular y una vez comprobada la calidad del RNA, éste fue retranscrito a cDNA, el cual fue utilizado para poder analizar la expresión de diferentes genes (PGC1 α , UCP3, CPT1b, PDK4, FAS, IL6 y FNDC5) mediante un análisis cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-qPCR).

Una vez obtenidos los datos, éstos fueron analizados por medio de programas estadísticos con los que se pudieron obtener los datos finales que han sido presentados y explicados en el apartado de resultados y discusión.

Cultivo de líneas celulares C2C12 y diferenciación a miotubos

3.1 Descongelación de las células

Se recoge un número ilimitado de células en un vial del tanque de nitrógeno líquido y se colocan en un baño con agua, a 37°C para su descongelación. Una vez las células se hayan descongelado, se limpia perfectamente el exterior del vial con etanol al 70%, para así poder eliminar toda fuente externa de contaminación. Es importante que a partir de este momento y durante todo el proceso del cultivo se mantengan estrictas condiciones asépticas para evitar que no se produzca contaminación.

A continuación se centrifuga el contenido del vial y se le añade con cuidado 9 ml de medio de cultivo caliente completo, con el fin de evitar el choque osmótico. Después de la centrifugación, eliminamos el sobrenadante, resuspendemos con medio de cultivo fresco y cogemos una pequeña alícuota para poder contarlas.

Por lo general, se pueden contabilizar alrededor de unas 7000 células/cm², siempre teniendo en cuenta las células vivas y éstas se colocan en un recipiente adecuado. Después se incuban las células a 37°C en una incubadora humidificada con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se elimina completamente el GM (medio de crecimiento) y se añade uno completamente fresco (35) (Anexo 1).

A partir de este momento, se deja cultivar hasta que las células alcancen el 50% de la confluencia, momento en el cual se dividirá el cultivo general en diferentes subcultivos (Anexo 1).

3.2 Subcultivos de células C2C12

En este momento, es muy importante que los cultivos no alcancen una confluencia del 100%, por ello, es necesario que para su óptima diferenciación y desarrollo, se dividan en diferentes viales una vez hayan alcanzado el 50% de la confluencia. Eliminamos el medio de cultivo antiguo y limpiamos las células con PBS, después dividimos el cultivo en tres placas de 12 pocillos cada una, ya que realizaremos el experimento por duplicado, habiendo en cada placa un duplicado de cada tratamiento. Colocamos 2 ml de tripsina_EDTA al 0,05% y la dejaremos actuar unos minutos para poder desprejar la células del fondo, con el mismo volumen de medio fresco

bloqueamos, pasado ese tiempo la acción de la tripsina, y resuspendemos el precipitado de células en un volumen adecuado de medio de cultivo fresco. Dispersamos de forma equitativa las células en los pocillos e incubaremos a 37°C, renovando el 80% del medio cada dos días (35)(Anexo 2).

3.3 Diferenciación de las células C2C12 a miotubos

Una vez tenemos un número suficiente de células y éstas han llegado al 50% de su confluencia, se inicia la diferenciación de las células en miotubos, para ello se elimina completamente el medio de cultivo y se limpia con PBS. A lo largo del proceso, se va renovando el 70% del medio, añadiendo medio nuevo y suplementado con Arabinocid-C. A partir del quinto día de diferenciación se le añaden los tratamientos, que en nuestro caso se trata de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), concretamente Acetato y Propionato.

Para la extracción de ARN se recogerán las células 24h después de haber aplicado el tratamiento(35)(Anexo 3).

3.4 Tratamientos utilizados durante la diferenciación de las células C2C12

Al quinto día del proceso de diferenciación se añadieron los tratamientos a las células. Cada placa contenía 12 pocillos, y cada tratamiento estaba por duplicado en cada placa. Dos de los pocillos fueron controles, por tanto no se les aplicó ningún tipo de tratamiento. Al resto de pocillos se les añadieron los tratamientos en solitario o conjuntamente.

Los tratamientos aplicados fueron:

- Ácidos grasos de cadena corta (AGCC): Ácido acético y ácido butírico.
- AICAR

En la siguiente imagen quedan recogidos los tratamientos aplicados y su distribución y combinación durante el proceso:

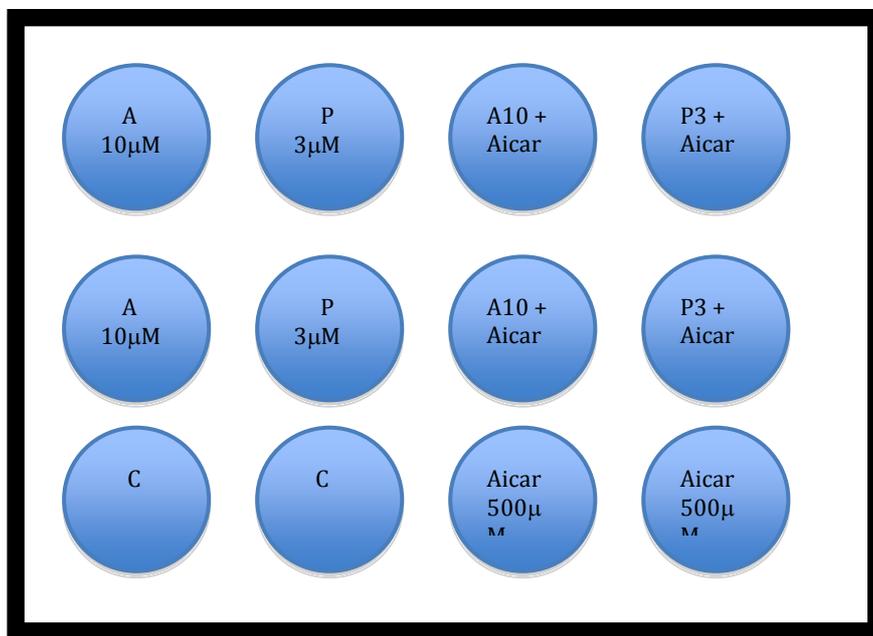


Fig.5.Representación de las placas de cultivos con la distribución de los diferentes tratamientos. Se realizó un duplicado de cada tratamiento. Nomenclatura: C:control; A: acetato; P: propionato. 3 y 10 indican 3 y 10µM. La concentración del Aicar es de 500µM en todo momento. Cabe comentar que las concentraciones seleccionadas para cada tratamiento de acetato y propionato dependen de experimentos anteriores realizados en el laboratorio donde se llevó a cabo la parte experimental, en otro tipo celular. Por otro lado, la concentración de AICAR seleccionada es una concentración utilizada habitualmente en la bibliografía para activar la AMPK (41).

3.5 Extracción y purificación del RNA

El RNA total fue extraído por el método del TRI Reagent (Zymo Research corp) según las indicaciones del fabricante. Nosotros partimos directamente de las células en TRI Reagent, ya que no fue necesario homogenizar, pero sí romper las células pasándolas varias veces con la pipeta. Este compuesto altera la estructura celular y desnaturaliza las nucleasas endógenas, permitiendo así la extracción del RNA y su posterior purificación, debido a la solubilidad de los diferentes compuestos en disolventes orgánicos y acuosos inmiscibles, permitiendo la separación de todos ellos en tres capas delimitadas, encontrándose el RNA en la fase superior acuosa, de donde será recogido y purificado(36) (Anexo 4).

Una vez hemos extraído y purificado el RNA, fue cuantificado para poder observar la concentración de éste y si la extracción se había realizado de forma correcta. Fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington,DE,USA), que se basa en la absorbancia característica de los ácidos nucleicos a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm).

Se midieron diferentes ratios, uno a 280nm que sirve para identificar contaminación por proteínas, se considera un buen ratio para afirmar que no existe contaminación y por lo tanto la purificación es buena unos valores de 2 en mRNA y 1,8 en DNA; y el ratio a 230 nm para descartar contaminación por disolventes orgánicos, un ratio de entre 1,8-2,2 se considera que la purificación es correcta (37).

3.6 Análisis por retrotranscripción (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Para poder analizar los niveles de mRNA de los genes PGC1 α ,UCP-3, CPT1-b, PDK4, FAS, IL6 y FNDC5 utilizamos la técnica RT-qPCR donde se realizó una retrotranscripción del RNA total a su cDNA y después se procedió a la amplificación de un fragmento específico, aumentando el número de copias por q-PCR. Para llevar a cabo la RT, se utilizó la RT mix, que se compone de una serie de reactivos que permiten la transcripción de la cadena, unión de los primers o mejorar la eficiencia de la reacción entre otros. La PCR, se fundamenta en la propiedad natural del DNA polimerasa para replicar las hebras del DNA, por lo cual emplea ciclos de a altas temperaturas combinados con ciclos a bajas temperaturas, para poder separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada proceso de replicación y, a continuación se vuelven a unir a polimerasas para volver a ser duplicadas, este proceso ocurre de forma secuencial y repetida para obtener un gran número de copias(38) (Anexo 5). Existen diferentes tipos de PCR, aunque nosotros utilizamos la técnica de q-PCR (PCR a tiempo real).

Este tipo de PCR, se fundamenta en la incidencia, sobre las muestras, de un haz de luz de una determinada longitud de onda, que permita detectar fluorescencia, gracias a la presencia de un fluorocromo excitado que previamente se había introducido en la muestra, por acción del Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La reacción se produce en un termociclador (Step One Plus TM). Para poder verificar que los resultados obtenidos fuesen correctos y no estuvieran contaminados o mal amplificados se realizó una curva de desnaturalización después de cada PCR siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El umbral de los ciclos (Ct) se calcularon a partir del programa proporcionado por la casa comercial (Step One software versión 2.0) y la expresión relativa de los mRNA de interés se calculó como porcentaje con el gen 18S como gen de referencia (*housekeeping*)(39) (anexo 5).

3.7 Análisis estadístico

Para realizar el análisis de los datos utilizamos la prueba T de Student para Mac. Todos los resultados están expresados como medias \pm S.E.M (error típico de la media) (n=6). Se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos y en todos los casos se ha considerado estadísticamente significativo un nivel mínimo de probabilidad inferior a 0,05 (p<0,05).

4. Resultados

PGC1 α

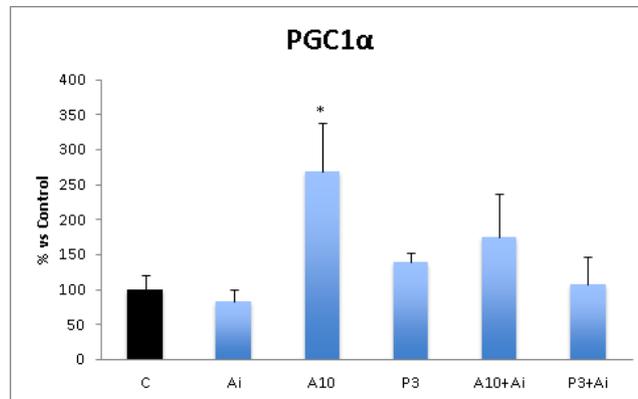


Fig.6. Expresión(a nivel de mRNA) del gen del PGC1 α frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizados mediante la T de Student ($p<0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500 μ M; A10: acetato 10 μ M; P3: propionato 3 μ M.

En la figura 6 se puede observar la expresión del gen del PGC1- α en combinación con los diferentes tratamientos, vemos que se produce un fuerte incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de este gen en las células tratadas con acetato 10 μ M, en comparación con el grupo control. Se puede observar una tendencia al aumento de la expresión en las células tratadas con acetato y AICAR 500 μ M, pero el error que se presenta hace que esta diferencia no sea estadísticamente significativa.

UCP3

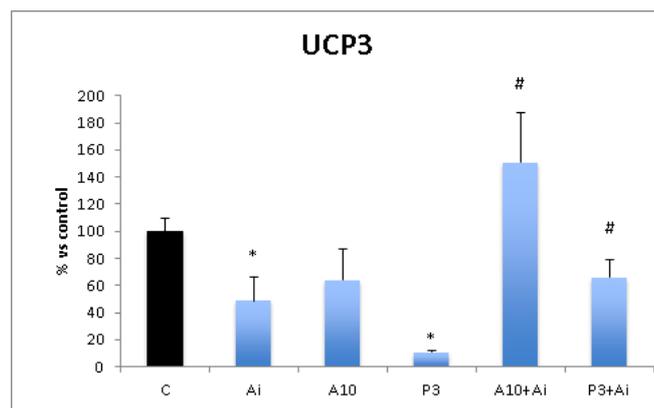


Fig.7. Expresión(a nivel de mRNA) del gen de la UCP3 frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test T de Student ($p<0,05$). # indica diferencias significativas de las muestras tratadas con Aicar y acetato o propionato respecto a los grupos tratados únicamente con acetato 10 μ M o propionato 3 μ M respectivamente, analizados mediante el test T de Student ($p<0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500 μ M; A10: acetato 10 μ M; P3: propionato 3 μ M.

En la figura 7 se puede observar la expresión del gen de la UCP-3 en respuesta a los diferentes tratamientos. Vemos que en presencia de AICAR 500 μ M sufre una inhibición estadísticamente significativa, en la expresión de este gen, de la misma forma que ocurre, cuando las células son tratadas con propionato 3 μ M. Por otra parte, podemos observar un fuerte incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de este gen cuando se combina el acetato 10 μ M con el AICAR 500 μ M en comparación con el tratamiento de acetato solo, de la misma forma que ocurre cuando se combina el propionato 3 μ M con el AICAR 500 μ M, donde también podemos observar un incremento en la expresión de dicho gen al compararlo con el tratamiento de acetato solo, obteniendo en ambos casos un error inferior al 0,05% ($p < 0,05$).

CPT1b

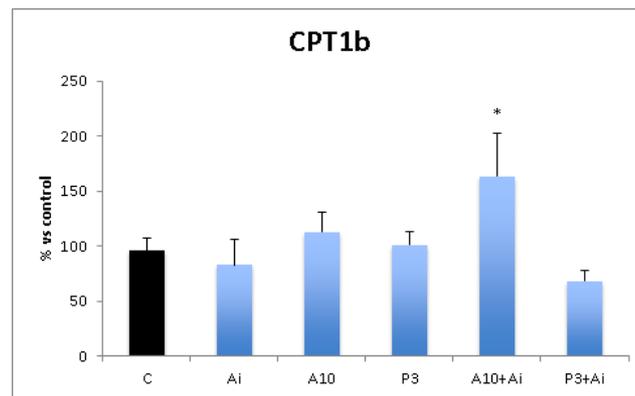


Fig.8. Expresión (a nivel de mRNA)del gen de la CPT1b frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM ($n=6$). *indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test de T de Student ($p < 0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500 μ M; A10: acetato 10 μ M; P3: propionato 3 μ M.

En la figura 8 se puede observar la expresión del gen de la CPT1b en respuesta a los diferentes tratamientos, vemos que se produce un fuerte incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de la CPT1b en las células tratadas con acetato 10 μ M y AICAR 500 μ M en comparación con el grupo control

PDK4

En la figura 9, que se muestra a continuación se puede observar la expresión del gen que codifica para la PDK4 en respuesta a los diferentes tratamientos, vemos que se produce una inhibición, estadísticamente significativa, en la expresión de este gen, en las células tratadas con AICAR 500 μ M y en las tratadas con la combinación de AICAR 500 μ M y acetato 10 μ M en comparación con el grupo control.

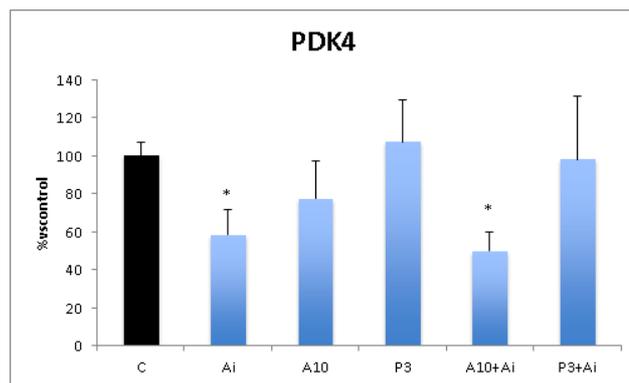


Fig.9. Expresión (a nivel de mRNA) del gen de la PDK4 frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test de T de Student ($p < 0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500 μ M; A10: acetato 10 μ M; P3: propionato 3 μ M.

FAS

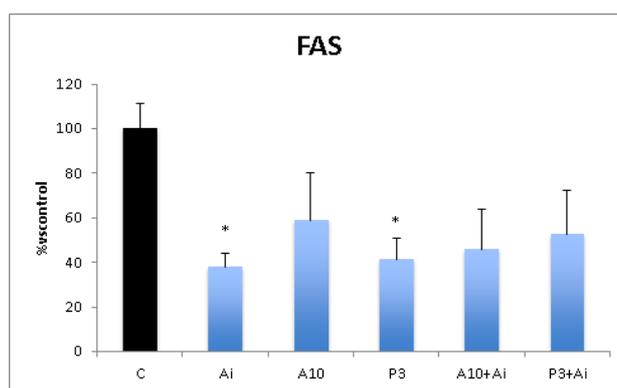


Fig.10. Expresión (a nivel de mRNA) del gen que codifica la proteína FAS frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test de T de Student ($p < 0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500 μ M; A10: acetato 10 μ M; P3: propionato 3 μ M.

En la figura 10 se puede observar la expresión del gen de la FAS en combinación con los diferentes tratamientos, vemos que se produce una importante inhibición, estadísticamente significativa, en la expresión de este gen en las células tratadas con AICAR 500 μ M y en las células tratadas con propionato 3 μ M en comparación con el grupo control. Se puede observar una clara tendencia a una inhibición en la expresión de este gen en los otros tratamientos respecto al control, pero el error que presentan hace que esta diferencia no sea estadísticamente significativa.

FNDC5

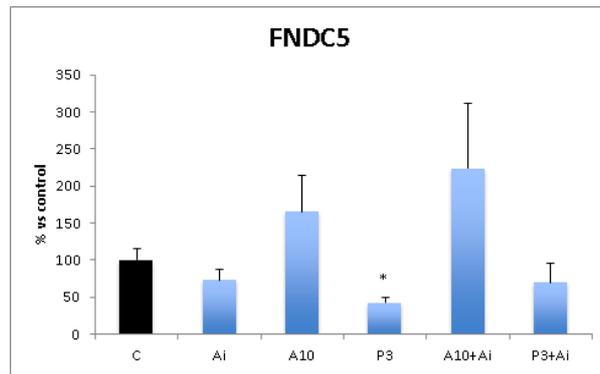


Fig.11. Expresión (a nivel de mRNA) del gen de la FNDC5 frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test de T de Student ($p < 0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500µM; A10: acetato 10µM; P3: propionato 3µM.

En la figura 11 se puede observar la expresión del gen que condifica para la FNDC5 en respuesta a los diferentes tratamientos. Vemos una inhibición estadísticamente significativa en la expresión del gen de la FNDC5 en las células tratadas con propionato 3µM respecto al grupo control. Se puede observar una tendencia al aumento en la expresión de este gen en presencia de los otros tratamientos, principalmente en presencia de acetato 10µM (ya sea solo o en combinación con AICAR), pero el error que se presenta hace que esta diferencia no sea estadísticamente significativa.

IL6

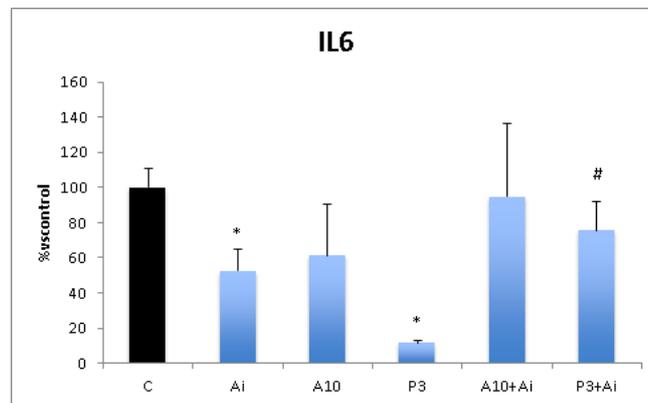


Fig.12. Expresión (a nivel de mRNA) del gen de la IL6 frente a los diferentes tratamientos. Los datos son las medias \pm SEM (n=6). * indica diferencias significativas respecto al grupo control, analizadas mediante el test T de Student ($p < 0,05$). # indica diferencia significativa del grupo tratado con propionato+AICAR respecto al grupo tratado sólo con propionato, analizadas mediante el test T de Student ($p < 0,05$). Abreviaturas: C: control; Ai: AICAR 500µM; A10: acetato 10µM; P3: propionato 3µM.

En la figura 12 se puede observar la expresión del gen de la IL6 en respuesta a los diferentes tratamientos. Se observa que se produce una inhibición importante, estadísticamente significativa, en la expresión de IL6 en los tratamientos con AICAR y propionato 3 μ M con respecto al control. También se puede observar un fuerte incremento, estadísticamente significativo, en la expresión de este gen, en las células tratadas con propionato 3 μ M y AICAR 500 μ M con respecto a las células tratadas con propionato 3 μ M.

5. Discusión

Los genes que codifican para el PGC1 α , la UCP3 y la CPT1b son genes que están íntimamente relacionados con una inducción del metabolismo oxidativo (15, 16,19). El tratamiento de las células en presencia de acetato parece ser que tiene un papel importante en el incremento de la expresión de estos genes, principalmente en el del PGC1 α (fig.6), donde este co-activador transcripcional ve aumentada su expresión pudiendo tener un efecto importante como regulador de otros genes implicados en el metabolismo oxidativo y la mitocondriogénesis, dada su importancia en estos procesos según la bibliografía disponible (14,15), en este caso en las células musculares.

En cuanto a la UCP3 y la CPT1b también se produce un aumento de la expresión en presencia de acetato, pero en particular cuando se hace en presencia del activador de la AMPK, el AICAR (fig.7,8), sobre todo en el caso de la CPT1b (fig.8), mientras que en el caso de la UCP3 lo que específicamente se observa es que la inhibición producida por AICAR es revertida por la presencia de acetato y con una tendencia a incrementar los niveles de expresión por encima de los controles (fig.7). Estos resultados sugieren que, en situaciones fisiológicas en que la AMPK esté activada (como en el ayuno o la actividad física (15)), una mayor concentración de este AGCC podría producir un aumento en la capacidad para la β -oxidación de ácidos grasos (de cadena larga, AGCL) en la mitocondria. Hemos de recordar que la activación de la AMPK regula una mayor activación de la CPT1b (19,20) y que la UCP3 se ha relacionado también con el manejo de ácidos grasos como sustratos energéticos (18). Por otro lado, existen estudios, que relacionan un aumento de la expresión de esta proteína (UCP3) en presencia de AGCL en el músculo (16), con lo que nuestros resultados aportarían la idea de que podría producirse un efecto similar ante la presencia de AGCC, en este caso en presencia de acetato. Por el contrario, no hemos encontrado efectos importantes del tratamiento con propionato en la expresión de estos genes (fig. 6, 8), excepto una inhibición de la expresión de la UCP3 (fig.7). En este sentido, cabe recordar que el acetato es el AGCC que se produce en mayor proporción en el intestino, en relación con el propionato o butirato (8) y es con el que hemos encontrado efectos importantes, lo cual refuerza la idea de un interesante posible papel fisiológico del acetato en el metabolismo de las células musculares.

Cabe comentar también el efecto inhibitorio observado en la expresión de la UCP3 con el tratamiento AICAR, a pesar de no encontrarse publicaciones anteriores donde se encuentre un efecto similar. En cualquier caso, el efecto más destacado en nuestro caso en la reversión de la inhibición de la expresión de la UCP3 al combinar los tratamientos de AICAR y acetato (y la tendencia a incrementarse sobre los controles), como se comenta más arriba.

En cuanto a la proteína PDK4 se ha visto que cuando se activa la AMPK se inhibe su expresión (40), en este caso nuestros resultados concuerdan con dichas observaciones ya que tanto en el tratamiento con AICAR como en el tratamiento combinado de AICAR y acetato se ve la inhibición de la expresión de la PDK4 (fig.9). Esta inhibición de la expresión de la PDK4 cuando se activa la AMPK, dada su función como inhibidora del complejo piruvato deshidrogenasa (21), se asociaría con una menor inhibición de la oxidación total de la glucosa, por lo que es de esperar una mayor capacidad de obtención de ATP a partir de la glucosa, permitiendo una degradación completa de ésta al posiblemente entrar más piruvato en el ciclo de Krebs. A partir de este dato, se podría decir que el resultado obtenido es el esperado, ya que basándonos en estudios realizados anteriormente, se ha comprobado que en otros tejidos implicados en el metabolismo energético como el tejido adiposo blanco, la expresión de la PDK4 se inhibía en presencia de AICAR (40), por lo que se podría esperar que tuviera un efecto similar en el músculo esquelético al ser un órgano implicado en el metabolismo energético, aunque para ello sería oportuno realizar más estudios sobre el efecto de la AMPK en la expresión de este gen en el músculo esquelético. De todas formas, en nuestro caso el objetivo principal era ver qué ocurre en presencia de los AGCC utilizados (acetato y propionato), y lo que los resultados indican es que mientras que el acetato no tiene efecto alguno adicional sobre la expresión de la

PDK4, el propionato combinado con AICAR revierte el efecto inhibitorio del AICAR (fig.9), lo que podría indicar que la presencia de propionato podría favorecer una menor oxidación total de la glucosa en aquellos casos en que la AMPK se activa.

En cuanto a la ácido graso sintasa (FAS), se sabe que es uno de los principales enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos (23). Su expresión se encuentra en general inhibida en presencia de todos los tratamientos (aunque en algunos debido al error experimental elevado no vemos que dicha inhibición sea estadísticamente significativa). En el caso del AICAR, como se ha comentado anteriormente activa la AMPK que se encarga de activar los procesos catabólicos del organismo, presentando a su vez un papel inhibitorio de las vías anabólicas(23); dado que la FAS es una enzima de una vía típicamente anabólica (para sintetizar AG necesita consumir grandes cantidades de energía), podemos decir que el resultado obtenido es el que se esperaba en aquellas muestras en que se ha tratado con AICAR.

Por otro lado, la inhibición de la expresión de este gen en presencia de los AGCC, que es significativa para el caso del tratamiento con propionato, indica un posible papel de estos AGCC en la inhibición de la síntesis de los AGCL en células musculares. Podríamos darle un posible significado fisiológico comentando que se encarga de sintetizar AGCL en el citoplasma celular o de convertir el exceso de alimento en lípidos que serán almacenados (23) y por ello, ya que los tratamientos usados son también AG (aunque de cadena corta), cabría pensar que la expresión del gen disminuyera, puesto que la célula ya dispone de más AG que potencialmente también se podrían utilizar como sustrato energético en caso necesario. En cualquier caso, esta especulación es un poco aventurada, ya que el catabolismo de los AGCC, es conocido en órganos como el hígado pero poco conocido en otros tipos celulares (9); estos resultados lo que si nos sugieren es que sería interesante poder estudiar con más profundidad el efecto de estos AGCC sobre la regulación de la expresión de la FAS en células musculares y también sobre la activación de la misma, para ver si se confirma esta posible regulación de la FAS por AGCC y los posibles mecanismos implicados.

Por último nos queda comentar lo observado para el caso de la expresión de los genes que codifican para mioquinas, en este caso para la FNDC5 (proteína precursora de la mioquina Irisina) y para la IL6.

En el caso de la FNDC5, el único efecto estadísticamente significativo que hemos observado es una inhibición de su expresión en presencia de propionato (fig.11). Aunque el descubrimiento de la Irisina es relativamente reciente(30) y aún queda mucho por estudiar sobre su regulación y sus funciones, una de las funciones principales que se le ha atribuido es su capacidad de inducir una marronización del tejido adiposo blanco (es decir, de hacer que se incremente en número de adipocitos marrones tipo BRITE, capaces de disipar energía en forma de calor, dentro de los depósitos de tejido adiposo blanco en mamífero, proporcionando una posible defensa frente al sobrepeso) (30). Por ello, el efecto inhibitorio del propionato sobre la expresión de la Irisina en las células musculares podría repercutir, dentro de un contexto del organismo completo, en una posible menor capacidad de marronización del tejido adiposo blanco y en el balance energético global. De nuevo para poder comprobar el efecto que realmente tienen los AGCC sobre la expresión de este gen, sería necesario ampliar la duración del estudio y tener en cuenta otros factores, debido a que no podemos obtener referencias de trabajos anteriores, al disponer de muy poca información relacionada con el tema, como se comenta más arriba, pero se propone que dichos estudios serían de interés dada la posible importancia fisiológica de este efecto. La expresión de este gen, también está relacionada nuevamente con la expresión del PCG1- α (que regula directamente la expresión de FNDC5 promoviéndola (30)), en nuestros resultados se observa, aunque no significativa, una tendencia al aumento de la expresión de la FNDC5 en presencia de acetato y de acetato combinado con AICAR. En este sentido, cabría plantear que más estudios sobre el efecto del acetato solo o en combinación con la activación de la AMPK, tanto *in vivo* como *in vitro*, podrían ser de interés.

Finalmente, se puede observar una disminución importante en la expresión de la IL6 cuando las células son tratadas tanto con AICAR como con propionato (que no se observa al combinar los tratamientos) (fig.12). En el caso del tratamiento con AICAR, existe bibliografía que indica que la activación de la AMPK induce la expresión de la IL6 al cabo de unas 24 horas aproximadamente en el mismo sistema de cultivo celular de C2C12 (41), de forma que estamos observando un efecto contrario al esperado. Este resultado contrario tal vez podría deberse a un error durante el proceso experimental con lo que sería necesario posiblemente incrementar el número de muestras tratadas con AICAR y posiblemente el tiempo del tratamiento para poder comprobar si realmente ha sido un error experimental.

Por otro lado, se ve que la presencia del propionato como tratamiento, por sí solo, provoca una clara inhibición de la expresión de la IL6, que es revertida cuando se combina con AICAR (es decir, cuando la AMPK está activada)(fig.12), en este caso sí que podríamos observar como la activación de la AMPK en combinación con el propionato produciría un incremento en la expresión de este gen (en comparación con la inhibición que le había causado la presencia de propionato). En cualquier caso, dadas las posibles funciones de la IL6 secretada por el músculo como posible mioquina favoreciendo la sensibilidad a la insulina y también la marronización (25), se plantea que también valdría la pena ampliar los estudios del posible papel del propionato en su regulación, tal vez valorando diferentes concentraciones de propionato y combinando estudios *in vivo* con estudios *in vitro*.

En general, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los AGCC, acetato y propionato tienen efectos diferenciados en la regulación de la expresión génica en células musculares de genes relacionados con el metabolismo oxidativo. De esta forma, en general el tratamiento con acetato parece potenciar la capacidad de oxidación de lípidos de estas células mientras que el principal efecto observado para el propionato estaría relacionado con una posible inhibición de la producción de dos mioquinas principales (Irisina e IL6) por parte de las células musculares.

6. Conclusión

Los estudios en mamíferos realizados en el músculo esquelético y en presencia de AGCC son muy escasos, existiendo muy poca bibliografía sobre el efecto de los AGCC en el músculo esquelético, por ello es difícil poder extraer conclusiones debido a la cantidad de trabajo que aún queda por realizar sobre este tema.

Con los resultados obtenidos tras el tratamiento de las células musculares con AGCC, podemos concluir que:

1. Los AGCC, acetato y propionato presentan un efecto en la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo energético en las células musculares.
2. El acetato presenta, en general, un efecto positivo incrementando la expresión del PGC1 α , la UCP3 y la CPT1b y por tanto se sugiere que podría potenciar la capacidad de oxidación lipídica en las células musculares, con un efecto matizado por la activación o no de la AMPK.
3. El propionato, presenta un efecto inhibitorio en la expresión de mioquinas, Irisina e IL6 en las células musculares, así como en la enzima FAS.
4. Dada su capacidad de regulación de la expresión génica en células musculares y puesto que sus niveles pueden ser modulados por la dieta, los AGCC acetato y propionato, pueden tener efectos interesantes sobre el metabolismo global en mamíferos y sobre la salud, siendo además estos efectos diferentes y particulares considerando el tipo específico de AGCC.

Finalmente, la novedad de este estudio tanto por la utilización de células musculares, como por el uso de AGCC principalmente, sugiere que sería importante profundizar en esta investigación y seguir trabajando en este campo debido a la relevancia que presentan estos datos sobre el efecto de los AGCC en la expresión de genes implicados en el metabolismo oxidativo.

7. Agradecimientos

A la Dra. Ana M. Rodríguez, por su dedicación e implicación y por toda la ayuda prestada en todo momento, además de permitirme la realización de un trabajo novedoso. A Xisco García, por todo el apoyo y la ayuda prestada durante todo el proceso de trabajo y por su paciencia al enseñarme a realizar todas las técnicas de laboratorio necesarias para la realización del trabajo. A Petar Petrov, por la ayuda ofrecida en enseñarme a realizar cultivos celulares y todas las técnicas relacionadas con el proceso.

8. Referencias

1. http://www.asemgalicia.com/biblioteca/monograficos_documentos/El%20musculo%20esquelético.pdf.ASEM. Federación Española de Enfermedades Neuromusculares. El músculo esquelético.2003.
2. <http://www.ht.org.ar/histologia/NUEVAS%20UNIDADES/unidades/unidad4/Muses.htm>. Aldana H.J., Histología. El músculo esquelético. Facultad de Medicina. Universidad de Moron. 2005.
3. De Lange P., Moreno M., Silvestri E., Lombardi A., et al., 2007 Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB J.* 21, 3431-3441.
4. Pedersen B.K., Febbraio M.A., 2012 Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 457-465.
5. Trayhurn P., Drevon C.A., Eckel J., 2011 Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle: adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch.Physiol. Biochem.* 117, 47-56.
6. Pedersen B.K., Febbraio M., 2005 Muscle-derived interleukin-6—a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain beba Immun.* 19(5):371-6
7. <http://hormonologiahoy.blogspot.com.es/2013/09/el-musculo-esquelético-unorgano.html>.Hormonología Hoy: El músculo esquelético: un órgano endocrino.
8. Soldavini J., Kaunitz J.D., 2013 Pathobiology and potencial therapeutic value of intestinal short-chain fatty acids in gut inflammation and obesity. *Dig. Dis Sci* 58, 879151.
9. Den Besten G., Van Eunen K., Groen A. K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B.M. 2013 The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolismo. *J. Lipid Res.* 54, 2325-40.
10. Harris K., Kassis A., Major G., Chou C.J. 2012 Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes* 2012, 879151.
11. Kimura I., Inoue D., Hirano K., Tsujimoto G., 2014 The SCFA receptor GPR43 and Energy Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5,85.
12. Kondo T., kishi M., Fushimi T., Kaga T., 2009 Acetic acid upregulates the expresión of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *J Agric Food Chem* 57, 5982-6
13. Arora T., Sharma R., Frost G., 2011 Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factos? *Appetite* 56, 511-5
14. Wang j., Zhuang J., Iyer S., Lin X.Y. et al. Sequence features and chromatic structure around the genomic regions bound by 119 humans transcription factors. *Genome Research* 22(9), 1798-1812.
15. <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/pgc1-sp.php>.©1996-2013, Michael W King, Ph. D. PPARy coactivador-1 (PGC-1).
16. UCP3 uncoupling proteína 3 (mitochondrial, proton carrier) [Homo sapiens(human)] 2014 NCBI. Gen ID: 7352.
17. Samec S., Seydoux J., Dullo AG. 1998 Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of termogénesis or regulators of lipids as fuel substrate?. *FASEB J.* 12(9).715-24.
18. Schrauwen P, Hesselink, M 2002 UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J.Exp.Biol.* 205(Pt 15):2275-85.

19. Lan He, MD, PhD,¹ Teayoun Kim, PhD,¹ Qinqiang Long, PhD,¹ Jian Liu, MD, PhD,¹ Peiyong Wang, MD, PhD,¹ Yiqun Zhou, PhD,¹ Yishu Ding, MD,¹ Jeevan Prasain, PhD,² Philip A. Wood, PhD,³ and Qinglin Yang, MD, PhD¹ 2012 Carnitine Palmitoyltransferase-1b (CPT1b) Deficiency Aggravates Pressure-Overload-Induced Cardiac Hypertrophy due to Lipotoxicity. *PMC* 126(14): 1705-1716.
20. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CPT1B> ©2014, Genetics Home Reference.
21. PDK4 pyruvate dehydrogenase Kinase, isozyme 4 2014 NCBI. Gen ID: 5166
22. Adam R. Wendel, Janice M. Huss, Paul J. Schaeffer, Vicent Giguère, Daniel P. Kelly 2005 PGC-1 α coactivates PDK4 Gene expresión via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol.Cell.Biol.* vol. 25 no. 24: 10684-10694
23. Chakravarty B., Gu Z., Chirala S. S., Wakil S. J., Quiococho F.A., 2004 Human fatty acid synthase: Structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *Current Issue.* vol. 101 no.44 15567-15572.
24. Pedersen B.K., Åkerström C.A., Nielsen A.R., Fischer C.P 2007 Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 103: 1093-1098.
25. Sánchez-muñoz F., García-macedo R., Alarcón-Aguilar F., Cruz M., 2005 Adipocytokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells. *Gac. Méd. Mex.* Vol 141 no. 6.
26. Pedersen B.K., 2011 Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. *Brain Behav. Immun.* 117, 47-56.
27. Al-Khalili L., Bouzakri K., Glund S., Lönnqvist F. et al., 2006 Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 20, 3364-3375.
28. Steinberg G.R., Rush J.W., Dyck D.J., 2003 AMPK expresión and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am.J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E648-654.
29. Kelly D.P., 2012 Irisin, Light my Fire. *Science* 336
30. Boström P., et al. 2012 A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of White fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463-468.
31. Wu J¹, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. 2012 Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in Mouse and human. *Cel.* 150(2):366-76
32. https://www.phoenixpeptide.com/catalog/pnxfoget.php?id=pnxnews_000000744&title=Compound&sum=Function&gclid=Cj0KEQjwveufBRDlsNb3kb-twMIBEiQASNH0xkE8kPSnuryKIUqa0_8mtkyOhs8BR5qvdIZ2tp97szsaAnpF8P8HAQ. © 2014 Phoenix Pharmaceuticals, INC. IRISIN.
33. <http://www.adipogen.com/ag-cr1-0061/aicar.html>. ©2012, AdipoGen® International
34. Laurie J. Goodyear, Ph.D 2008 The exercise Pill-Too good to be true? *Joslin Diabetes Center Harvard Medical School, Boston, USA. N. Engl. J. Med.* 359(17):1842-4.
35. http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CRL1772.aspx?geo_country=es#general-information © 2014 ATCC
36. Direc-zol™ RNA MiniPrep. Catalog Nos. R2050, R2051, R2052, R2053. Instruction Manual. Ver.1.0.5 ZYMO RESEARCH CORP.
37. <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> 2008 nanodrop ND-1000

38. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA 1998 Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
39. Pfaffl MW 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
40. Wan Z, Ritchie I, Beaudoin M.S., Castellani L., Chan C.B., Wright D.C. 2012 IL-6 Indirectly modulates the induction of glycerogenic enzymes in adipose tissue during exercise. DOI: 10.1371/Journal.pone.0041719.
41. Sánchez J., Nozhenko Y., Palou A., Rodríguez A.M., 2013 Free fatty acid effects on myokine production in combination with exercise mimetics. *Mol.Nutr.Food Res.* 57, 1456-1467

Bibliografía imágenes

1. http://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_acético
2. http://es.wikipedia.org/wiki/Ácido_propiónico
3. Kelly D.P., 2012 Irisin, Light my FIRE. *Science* vol. 336 no. 6077 pp. 42-43
4. <http://www.adipogen.com/ag-cr1-0061/aicar.html> © 2014 Adipogen International Pictures.

9. Anexos

9.1 Anexo 1: Protocolo para la descongelación de las células

Debemos tomar un frasco que contenga un número determinado de células del tanque de nitrógeno líquido y colocarlo en un pequeño recipiente para llevar a cabo el procedimiento en el laboratorio de cultivos celulares. El vial debe colocarse en un baño a 37°C con una agitación continua, hasta que las células se hayan descongelado y es importante que la tapa del vial se encuentre fuera del agua, ya que el agua del baño, puede ser un importante foco de contaminación y de esta forma se reduce la posibilidad de contaminar el cultivo. Una vez el contenido esté bien descongelado, es importante rociar y desinfectar bien el frasco con etanol al 70%, a partir de este momento y durante todo el proceso recultivo, será muy importante mantener en todo momento las condiciones asépticas y por lo tanto todo lo que entre en la campana de cultivos debe haber sido desinfectado previamente. Transferimos el contenido en un frasco de 50 ml y añadimos gota a gota 9 ml de medio de cultivo para evitar así el choque osmótico, a continuación centrifugamos durante 5 min a 1300 rpm.

Eliminamos el sobrenadante, que contiene DMSO 1-2% y resuspendemos el precipitado celular con medio de cultivo fresco (1-2 ml) y tomamos una alícuota para hacer un recuento. Por lo general encontramos unas 7000 células vivas /cm².

Después del conteo, incubamos el cultivo a 37°C durante 24h en una incubadora humidificadora con un 5% de CO₂, pasado ese tiempo, se elimina completamente el GM, para eliminar posibles células sueltas, se añade GM completamente nuevo y se deja incubar hasta que las células hayan alcanzado el 50% de la confluencia (aproximadamente 2 días)

Reactivos

- Growth media (GM): 10% FBS, 1% penicilina/streptomicina (P-4458, sigma), suero fetal bovino (10270, Gibco, Life Technologies).
- High-glucose DMEM 30-2002 (ATCC).

9.2 Anexo 2: Protocolo para realizar un subcultivo de células C2C12

Para realizar un subcultivo y que este sea viable, es muy importante que las células no alcancen el 100% de su confluencia, ya que cuando los cultivos son concluyentes se inicia la fusión de las células y se agota la población de mioblastos en el cultivo, por ello cuando el cultivo haya alcanzado aproximadamente el 50% de la confluencia es cuando se debe separar y realizar los subcultivos.

Para poder realizar un subcultivo que sea viable, primero debemos retirar el medio de cultivo de los frascos y colocarlo en un tubo estéril y a continuación limpiar la capa celular dos veces con PBS caliente. Después añadiremos 3 ml de 0,05% de solución Tripsina-EDTA, para un frasco de 75 cm² y se deja incubar unos 5 minutos. A continuación se bloquea el efecto de la Tripsina-EDTA con medio nuevo. Es importante colocar la misma cantidad de medio fresco que de Tripsina-EDTA y se debe pipetear varias veces para que el bloqueo de la Tripsina-EDTA sea efectivo y poder obtener una buena suspensión celular.

Recogemos una pequeña alícuota de células (30 ml aproximadamente) y lo mezclamos con 30 ml de Tryptan blue; que es un colorante que no puede penetrar en las células, por lo que solo se teñirán las que estén muertas y se realiza un conteo en la cámara de conteo. La perfecta dilución es cuando encontramos entre 50 y 100 células en cada cuadrado.

Finalizado el conteo, se incuban los cultivos a 37°C y se añade un 80% de GM fresco cada dos días, dejando siempre un 20% del medio antiguo.

Reactivos

- PBS, pH 7,4: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y fosfato sódico mono-/di-básico 10 mM.
- Tripsina-EDTA.
- Tryptan blue
- Growth media (GM): 10% FBS, 1% penicilina/streptomina (P-4458, sigma), suero fetal bovino (10270, Gibco; Life Technologies), DMEM 30-2002 (ATCC).

9.3 Anexo 3: Protocolo para la diferenciación de las células c2c12 a myotubos

Después de dos días de crecimiento, observamos que las células han alcanzado casi el 90% de la confluencia por lo que ya están listas para quitar el medio de crecimiento (GM) y poner el medio de diferenciación (DM).

Una vez observado el estado de confluencia, lavamos 2 veces con PBS para eliminar así restos de suero fetal del GM. Al eliminar el suero fetal, eliminamos una importante fuente de nutrientes para el crecimiento celular, lo que les supone un indicador para iniciar la diferenciación. En el primer lavado con PBS se elimina el 90% del medio de los pocillos, dejando un 10% y se añade 1 ml de PBS, se deja actuar 1 minuto. En el segundo lavado, se elimina el primer PBS y se añade 1 ml de PBS nuevo y se deja actuar 1 minuto.

Una vez eliminado el PBS, se añaden en cada pocillo 2 ml de DM, esto debe hacerse rápidamente para evitar que las células se sequen. Es importante que cada vez que se elimina o añade medio, se haga en un por un lateral de la placa y nunca directamente sobre la monocapa de células, para evitar así que se puedan dañar.

Durante el proceso de diferenciación, el cambio de medio y la adición de los diferentes reactivos y tratamientos se realiza según la información recogida en la siguiente tabla:



Fig.13. Esta tabla recoge el proceso y los pasos de cambio de medio y de adición de los diferentes reactivos y tratamientos a lo largo de todo el proceso. Abreviaturas: DM: medio de diferenciación; Ara-c: Arabinocid-C; PBS: Buffer fosfato salino.

Una vez añadidos los tratamientos, se dejan incubar 24h y pasado este tiempo, ya se puede realizar el raspado de las células. Se elimina completamente el medio de cultivo y se colocan 1ml de Tripsina-EDTA, dejándolo actuar unos minutos. Con la Tripsina, conseguiremos que las células se despeguen del fondo de los pocillos y así será más fácil poder recogerlas. Con la punta de una pipeta, vamos raspando el fondo de cada pocillo varias veces a la vez absorbemos y soltamos varias veces el contenido celular. Una vez realizado este proceso, transferimos todas las células a tubos eppendorf independientes y perfectamente rotulados según cada tratamientos y número de pocillo y finalmente fueron guardadas en a -80°C.

Reactivos

- Medio de diferenciación (DM): DMEM 30-2002 (ATCC), 2% de cuero de caballo (16050-122, Gibco, Life Technologies), 1% penicilina/sterptomocina (P-4458, sigma).
- PBS, pH 7,4: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y fosfato sódico mono-/di-básico 10 mM.
- Ara-C (sigma)
- Tripsina-EDTA.

9.4 Anexo 4: Protocolo de extracción y purificación del RNA en columnas (Direct-zol™ RNA miniPrep)

El RNA total fue extraído por el método del *TRI Reagent* (Zymo Research) según las indicaciones del fabricante.

Las muestras celulares fueron descongeladas y homogenizadas con la ayuda de una pipeta y se cetrifugó la muestra durante 1 minuto a 12000 g. Se recogió el sobrenadante de cada muestra y en un eppendorf nuevo se le añadieron 500 µl de etanol absoluto, se vortearon las muestras y se colocaron en las columnas de extracción. Con los colectores El volumen máximo de cada columna es de 700µl por lo se realizará en dos tandas de 500µl, ya que el volumen total es de 1 ml. Una vez colocadas las muestras en la columna se centrifugaron 1 minuto a 13000g. Seguidamente se recogió el sobrenadante y se guardó a -80°C. La columna se transfirió a un nuevo colector y se añadieron 400 µl de RNA Prewash y se centrifugaron las muestras 1 minuto a 13000g y se descartó el liquido acumulado en el colector. A continuación se añadieron 700µl de RNA Wash Buffer y se centrifugó 1 minuto a 13000g. Retirar el liquido del colector y volver a centrifugar 2 minutos a 13000g. Seguidamente se coloca la columna en un tubo eppendorf y se ponen 25µl de Dnasa/Rnasa-Free Water en el centro de la columna y se centrifugan todas las muestras a 18000g durante 1 minuto. El eluyente obtenido contiene todo el RNA y se debe guardar rápidamente en hielo o congelarlo a -80°C.

EL RNA total de las muestras fue cuantificado por espectofotometría usando el espectofotómetro NanoDrop ND-100, utilizando para ello 2µl de cada muestra. Para poder valorar el estado del RNA y que éste no estaba contaminado, se midió el ratio 260/230 nm, que determina el grado de contaminación de la muestra por presencia de proteínas y el ratio 260/230 nm, que determina el grado de contaminación de la muestra por solventes orgánicos.

Reactivos

- Etanol absoluto.
- Direct-™ RNA PreWash
- RNA Wash Buffer
- ADnasa/ARNasa-Free Water

9.5 Anexo 5: Protocolo del análisis de la expresión génica por RT-qPCR

Para poder determinar los niveles de expresión del mRNA de los genes PGC1a, FNDC5, CPT1b, UCP3, FAS, IL6 y PDK4 se utilizó la técnica de la RT-qPCR.

5.1- Retrotranscripción (RT): para la determinación del mRNA se utilizó la reacción de la RT: se emplearon 0,25µg del RNA de la muestra de RNA total que se llevaron a un volumen final de 5µl con agua libre de ARNasas y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 60°C en el termociclador Perkin Elmer 2720. Seguidamente se le añadieron a las muestras 7,5µl de la RT-mix, preparada de tal forma que las concentraciones finales de cada tubo fueran: 1,25µl de 10 x Buffer, 1,25µl de 25mM MgCl₂, 2µl de 2,5mM nucleótodos(dNTPs), 0,5µl de random hexamers, 0,5µl de inhibidores de ARNasas, 0,5µl de transcriptasa reversa MuLV RT (*Murine leukemia Virus Reverse Transcriptase*) y 1,5µl de agua. Las condiciones de la reacción fueron: 15 min a 20°C, 30 min a 42°C, 5 min a 95°C e indefinidamente 4°C.

5.2- PCR a tiempo real: Se utilizaron 2µl de una dilución (desde 1/5 a 1/50 dependiendo de la cantidad de mRNA) del producto de la RT. A la muestra se le añadió 9µl de la PCR-mix que contenía: 3,1µl de agua libre de ARNasas, 0,45µl de cada gen cebador (*primer forward/reverse*) específico para rata y 5µl de una mezcla comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* que contiene el fluoróforo necesario para la detección.

La reacción tuvo lugar en un termociclador (StepOnePlus™) donde se llevó a cabo una desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de temperatura donde había una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, seguida de una elongación de 1 min a 60°C. Para poder verificar la pureza de los productos obtenidos, se realizó una curva de desnaturalización (*Melt Curve*) después de cada PCR siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Reactivos

- Agua libre de ARNasas.
- RT-Mix: Buffer, MgCl₂, DNTPs, random hexámers, inhibidores de ARNasas, transcriptasa reversa MuLV RT.

PCR-Mix: Gen cebador(primers), Power SYBR Green PCR Master Mix