



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE**  
**MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**

**Efecto del tratamiento con metformina en la  
expresión de genes que participan en la vía de  
señalización de la proteína cinasa dependiente de  
AMP (AMPK) en diferentes tejidos de ratas con  
síndrome metabólico**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

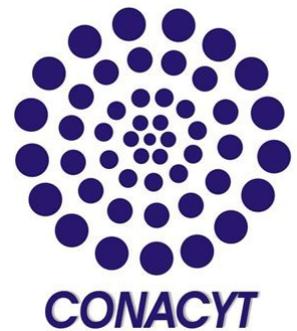
P R E S E N T A

**JORGE ROSAS GARCÍA**

TUTORA: Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

MÉXICO, D.F.MAYO 2013





Este trabajo se realizó en el laboratorio de nutrición experimental del Instituto Nacional de Pediatría y fue financiado por Conacyt con el proyecto 79776.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno ROSAS GARCÍA JORGE,  
con número de cuenta 303287878 de la carrera de Q. F. B.,  
se le ha fijado el día 13 del mes de mayo de 2013 a las 17:00 hrs.,  
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes  
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES
VOCAL *	DRA. KARLA G. CARVAJAL AGUILERA
SECRETARIO	DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
SUPLENTE	M. en C. ARACELI GARCÍA DEL VALLE
SUPLENTE	M. en C. ADRIANA HERNÁNDEZ REYES

*Leonora Aguilar Santelises*  
*Karla G. Carvajal Aguilera*  
*María Isabel Soto Cruz*  
*Araceli García del Valle*  
*Adriana Hernández Reyes*

El título de la tesis que se presenta es: **Efecto del tratamiento con metformina en la expresión de genes que participan en la vía de señalización de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en diferentes tejidos de ratas con síndrome metabólico.**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a 01 de enero de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ  
DIRECTOR  
ZARAGOZA  
DIRECCION

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM por haberme albergado como uno de sus estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por el financiamiento para desarrollar el proyecto 79776.

A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE) por la beca otorgada.

A mí tutora Dra. Karla Carvajal Aguilera por aceptarme en su laboratorio, por sus enseñanzas y por el apoyo que me brindo en mi estancia en el laboratorio.

A quien considero mi co-tutor Dr. Daniel Ortega por su apoyo y enseñanzas transmitidas.

A mi asesora de tesis Dra. Isabel Soto Cruz, por apoyarme en la culminación de mi tesis y cuyas aportaciones fueron muy valiosas.

A mi revisora de tesis Mtra. Leonor Aguilar Santelises por su apoyo en la culminación de mi tesis y cuyas aportaciones fueron muy valiosas.

A las maestras Araceli García del Valle y Adriana Hernández Reyes por su disposición y apoyo en la culminación de este trabajo.

Agradezco a los integrantes del laboratorio de nutrición experimental:

A mi compañera y amiga Elizabeth Moreno de quien he aprendido mucho.

A la Mtra en C. Silvia, gracias por el apoyo en el laboratorio.

A Reyna gracias por apoyarme a mí y a todos los integrantes en el laboratorio, tu trabajo es indispensable.

A Marco gracias por el apoyo en los seminarios y si todo sale según el plan habrá más trabajo con los adipocitos.

A Ma. De la Luz porque me apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio, sin tu ayuda hubiera tardado más y mira que me tarde.

A M en C Jaime Balderas gracias por el apoyo y los sabios consejos.

Al Dr. Bryan Phillips, gracias por el apoyo.

A mis compañeros en este viaje llamado "La Tesis" Karla Figueroa y Fernando Navarro, fue un gusto y un honor estar con ustedes.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Ma. Inés García y Jorge Rosas quienes me han apoyado siempre y han sido un ejemplo en mi vida, prometo no darles más dolores de cabeza.

A mis hermanas Adriana y Karina quienes siempre me han apoyado.

A mis amigos Daniel, Oscar y a mi mejor amiga Marian, con quienes pasé los mejores años de mi vida y a quienes recordaré siempre.

## **ABREVIATURAS**

**AACE**= Asociación americana de clínicos endocrinólogos

**ACC-1** = Acetil carboxilasa-1

**ADP**= Difosfato de adenina

**AMP**= Monofosfato de adenina

**AMPK**= Cinasa dependiente de AMP

**ATP** = Trifosfato de adenina

**CaMKK $\alpha$**  = Cinasa de la Proteína cinasa dependiente de Calmodulina/Ca<sup>2+</sup> alfa

**CaMKK $\beta$**  = Cinasa de la Proteína cinasa dependiente de Calmodulina/Ca<sup>2+</sup> beta

**CBS** = Cistationina- $\beta$ -Sintasa

**cDNA** = Ácido Desoxirribonucleico complementario

**cm** = Centímetros

**dL**= Decilitros

**DM2** = Diabetes Mellitus tipo II

**Dusp4** = Fosfatasa de especificidad dual

**ECNT**= Enfermedades crónicas no transmitibles

**Egr1**= Factor de transcripción inmediato

**EIGR**= Grupo europeo para el estudio de la resistencia a la insulina

**G6Pase**= la glucosa-6-fosfatasa

**PEPCK** = Gluconeogénicos Fosfoenol piruvato carboxicinas

**HDL**= Lipoproteína de alta densidad – Colesterol

**HMG-CoA reductasa** = 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa

**HSL**= la lipasa sensitiva a hormonas

**IDF**= Federación internacional de diabetes

**IFG** = Alteración de glucosa en ayuno (por sus sigla en inglés)

**IGT** = Alteración de la tolerancia a la glucosa (por sus sigla en inglés)

**IMC** = Índice de masa corporal

**i.p.** = Intraperitoneal

**KDa** = Kilodalton

**LDL**= Lipoproteína de baja densidad

**LKB1**= Cinasa de hígado B 1

**mg**= Miligramos

**mmHg**= Milímetros de mercurio

**NCEP ATP III** = Panel III del tratamiento del adulto programa nacional de educación sobre el colesterol

**OMS** = Organización mundial de la salud

**PP2C alfa** = Proteína fosfatasa 2Calfa

**HGP** = Producción de Glucosa hepática

**ChREBP**= Proteína de unión de elementos de respuesta a carbohidratos

**PUFAs**= Ácidos grasos poliinsaturados

**Ser** = Serina

**SIK2**= Cinasa inducida por sal 2

**SM**= Síndrome metabólico

**SREBP1** = Proteína de unión a esteroides 1c

**TA** = Tejido adiposo

**TGF-β** = Factor de crecimiento transformante beta

**Thr** = Treonina

**TMC** = Tejido muscular cardiaco

**TME** = Tejido muscular esquelético

**TH** = Tejido hepático

**UKPDS** = Estudio prospectivo sobre la Diabetes del Reino Unido

## INDICE

### RESUMEN

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>(12)</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....</b>	<b>(14)</b>
<b>2.1</b>	<b>Definición del síndrome metabólico.....</b>	<b>(14)</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Cronología del síndrome metabólico.....</b>	<b>(14)</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Definición según la OMS.....</b>	<b>(16)</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Definición según el grupo europeo para el estudio de la resistencia</b>	
<b>2.1.4</b>	<b>a la insulina (EIGR).....</b>	<b>(16)</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Definición según el panel III del tratamiento del adulto</b>	
	<b>programa nacional de educación del colesterol</b>	
	<b>(NCEP ATP III).....</b>	<b>(17)</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Definición según la asociación americana de clínicos</b>	
<b>2.1.7</b>	<b>endocrinólogos (AACE).....</b>	<b>(17)</b>
<b>2.1.8</b>	<b>Definición según el congreso global de la federación internacional de</b>	
	<b>diabetes (IDF).....</b>	<b>(18)</b>
<b>2.2</b>	<b>La cinasa dependiente de AMP (AMPK).....</b>	<b>(20)</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Estructura de AMPK.....</b>	<b>(21)</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Fosforilación de AMPK.....</b>	<b>(23)</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Función de AMPK.....</b>	<b>(26)</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Las consecuencias transcripcionales de la activación de AMPK.....</b>	<b>(29)</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Potencial de AMPK en SM.....</b>	<b>(29)</b>
<b>2.2.6</b>	<b>AMPK media los efectos metabólicos de las adipocinas.....</b>	<b>(29)</b>
<b>2.2.6.1</b>	<b>Leptina.....</b>	<b>(30)</b>
<b>2.2.6.2</b>	<b>Adiponectina .....</b>	<b>(30)</b>
<b>2.2.7</b>	<b>AMPK en tejido hepático (TH).....</b>	<b>(32)</b>
<b>2.2.7.1</b>	<b>AMPK y el metabolismo de lípidos.....</b>	<b>(32)</b>
<b>2.2.7.2</b>	<b>AMPK y el metabolismo de la glucosa.....</b>	<b>(34)</b>
<b>2.2.8</b>	<b>AMPK en tejido adiposo(TA).....</b>	<b>(36)</b>
<b>2.2.9</b>	<b>AMPK en el metabolismo de la glucosa.....</b>	<b>(36)</b>
<b>2.2.10</b>	<b>AMPK en el metabolismo de lípidos.....</b>	<b>(36)</b>

2.2.11	AMPK en músculo esquelético(TME).....	(37)
2.2.12	AMPK en el metabolismo de la glucosa y lípidos.....	(37)
2.3	AMPK en muscular cardiaco (TMC).....	(38)
2.3.1	AMPK en el metabolismo de la glucosa.....	(38)
2.3.2	AMPK en el metabolismo lípidos.....	(39)
2.4	Metformina.....	(41)
2.4.1	Efectos secundarios.....	(41)
2.4.2	Contraindicaciones.....	(42)
2.4.3	Cronología de la metformina.....	(42)
2.4.4	Metformina y AMPK.....	(42)
2.4.5	Farmacocinética.....	(45)
2.5	Blanco mamífero de rapamicina (mTOR).....	(48)
2.6	mTOR y la resistencia a la insulina.....	(51)
2.7	AMPK y mTOR.....	(52)
2.8	Coactivador 1 alfa del receptor activado proliferador	
2.9	de peroxisomas (PGC1alfa).....	(55)
2.10	PGC1-alfa y AMPK.....	(56)
2.11	Regulación metabolismo oxidativo mitocondrial.....	(56)
2.12	PGC1alfa en TH.....	(57)
2.13	PGC1alfa en TMC.....	(59)
2.14	PGC1-alfa TME....	(59)
2.15	PGC1alfa en TA.....	(60)
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	(61)
4	OBJETIVO.....	(62)
5	HIPÓTESIS.....	(63)
6	METODOLOGÍA.....	(64)
6.1	Ratas con SM.....	(64)
6.2	Extracción de RNA.....	(65)
6.3	Análisis por qRT-PCR .....	(66)
6.4	Determinación de leptina sérica.....	(67)
6.5	Determinación de la adiponectina sérica.....	(67)
6.6	Determinación de glucosa sérica.....	(68)
6.7	Determinación de insulina sérica.....	(68)
6.8	Determinación de triglicéridos sanguíneos.....	(68)

6.9	Diagrama.....	(69)
7	RESULTADOS .....	(70)
7.1	Características del modelo de rata con SM.....	(70)
7.2	Cambios en la expresión de genes en TMC.....	(71)
7.3	Cambios en la expresión de genes en TME.....	(72)
7.4	Cambios en la expresión de genes en TA.....	(73)
7.5	Cambios en la expresión de genes en TH.....	(74)
8	DISCUSIÓN .....	(75)
8.1	Cambios en la expresión de genes en TMC.....	(76)
8.2	Cambios en la expresión de genes en TME.....	(77)
8.3	Cambios en la expresión de genes en TA.....	(78)
8.4	Cambios en la expresión de genes en TH.....	(79)
9	CONCLUSIONES.....	(81)
10	REFERENCIAS.....	(82)

## RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es una agrupación de anomalías antropométricas, fisiológicas y bioquímicas que incrementan el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes Mellitus tipo II. La cinasa dependiente de AMP (AMPK) regula el metabolismo energético fosforilando proteínas y regulando la expresión de genes claves, resultando en la reducción del almacenamiento de energía e incrementando su utilización.

**Objetivo.** Evaluar los efectos del tratamiento con la metformina en la expresión de genes que participan en la vía de señalización de AMPK y de esta misma en diferentes tejidos de ratas con SM.

**Metodología.** El SM fue inducido mediante la alimentación con sacarosa al 30% en el agua de beber durante 16 semanas, adicionalmente un grupo con SM fue tratado con metformina durante 5 semanas más y como control fueron utilizadas ratas con agua simple *ad libitum*. Después se aisló tejido adiposo (TA), hepático (TH), muscular cardíaco (TMC) y muscular esquelético (TME). A partir de RNA total, se obtuvo cDNA mediante retrotranscripción y se evaluó la expresión de AMPK alfa1, AMPK alfa 2, mTOR y PGC1-alfa mediante qRT-PCR.

**Resultados.** El TMC y el TA fueron de los más afectados junto con el TH y el por el SM donde las isoformas de AMPK resultaron alteradas y el tejido menos afectado fue el TME, así como PGC-1 alfa y mTOR cuyas alteraciones fueron diferentes según el tejido estudiado. Finalmente, el tejido menos afectado fue el TME donde se alteró la expresión de PGC-1alfa y de AMPK alfa 1. El tratamiento con metformina revierte completamente las alteraciones en TMC, TA y en TH parcialmente, a diferencia del TME donde si bien no fue tan afectado por el síndrome metabólico, si lo fue por el tratamiento con metformina.

**Conclusiones** El síndrome metabólico induce alteraciones en la expresión de genes que participan en la vía de señalización de la AMPK e incluso las isoformas catalíticas de AMPK se ven afectadas; es importante señalar que estas alteraciones se presentan de manera tejido específica y el tratamiento con metformina revierte tales alteraciones casi en su totalidad.

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el mundo experimenta una grave epidemia de enfermedades crónicas con alta mortalidad cardiovascular. Entre las principales causas de esta epidemia de acuerdo con reportes recientes, se encuentran los factores de riesgo asociados con la dieta y el estilo de vida. (Figura 1)

Estas enfermedades crónicas presentan factores de riesgo como son índice de masa corporal (IMC) elevado (obesidad), hipertensión, hiperglicemia en ayuno y dislipidemias. Es importante señalar que tienen un componente genético, sin embargo se ha observado un incremento en sus prevalencias tan importantes y en tan poco tiempo, que la influencia del medio ambiente resulta innegable. (1,5)

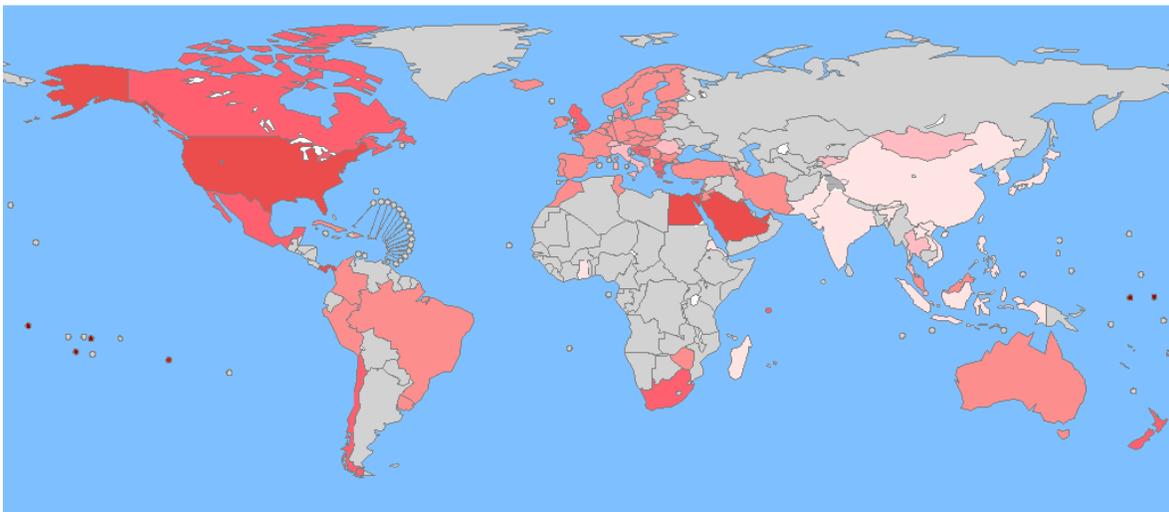
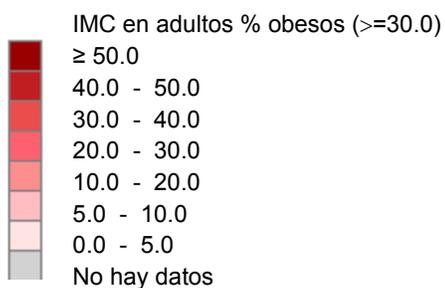


Figura 1. Obesidad Mundial en adultos IMC >30.0, según la OMS



México se encuentra en una transición epidemiológica que presenta grandes retos al sistema de salud y a la sociedad. A principios del siglo pasado, las primeras causas de mortalidad se relacionaban con enfermedades infecciosas y parasitarias, salud materno-infantil y deficiencias alimentarias. Sin embargo para la segunda mitad de ese siglo, las enfermedades crónicas no transmitibles (ECNT) comenzaron a cobrar importancia y sus complicaciones se han convertido en la primera causa de mortalidad en el país.

### MORTALIDAD PROPORCIONAL (% DE MUERTES TOTALES, TODAS LAS EDADES)

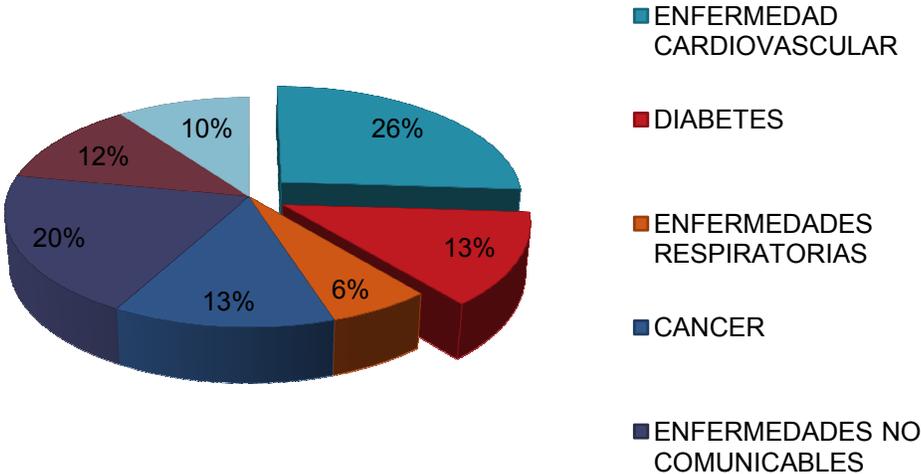


Figura 2. Mortalidad Proporcional en México, según la OMS 2010.

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.1 Definición del síndrome metabólico(SM)

Una definición general del SM agrupa anomalías antropométricas, fisiológicas y bioquímicas que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus tipo II. <sup>(2,4, 6)</sup> (Figura 3)

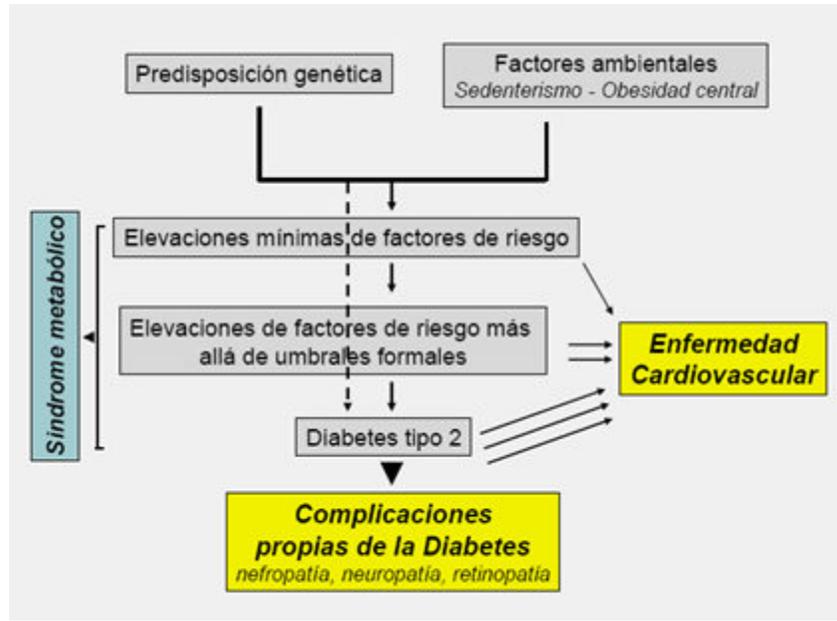


Figura 3. Síndrome metabólico (Horacio Carbajal y Martín R. Salazar)

### 2.2.1 Cronología del SM

Existen antecedentes que señalan la existencia de una relación en cuanto a las anomalías metabólicas incluso antes de la primer definición del SM llamada síndrome X por Gerald Reaven en 1988, a partir de esta definición se ha debatido sobre el nombre, la fisiopatología, sus componentes, los niveles de corte e incluso sobre el significado del SM. <sup>(6)</sup>



Figura 4. Línea del tiempo de la evolución del SM

**A) 1923.** Kyle y col. evidencian una relación en cuanto a las alteraciones metabólicas, la cual involucraba la aparición de hipertensión, hiperglicemia, obesidad e hiperuricemia.

**B) 1956.** Vague y col. sugieren que la obesidad abdominal puede predisponer a la diabetes y a enfermedades cardiovasculares.

**C) 1981.** Ruderman y col. Señalaron la existencia de individuos metabólicamente obesos con pesos normales, caracterizados por hiperinsulinemia y posiblemente con aumento de tamaño en sus células adiposas.

**D) 1987.** Fujioka y col. propusieron una nueva clasificación de obesidad (obesidad de la grasa visceral vs obesidad de la grasa subcutánea).

**E) 1988.** Gerald Reaven propuso el nombre de síndrome X para describir el fenómeno en el cual los individuos presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria, niveles altos de triglicéridos y bajos de colesterol HDL e hipertensión los cuales significaban factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares.

**F) 1999.** La Organización mundial de la salud (OMS) introdujo el nombre de Síndrome Metabólico basado en la resistencia a la insulina.

**G) 2001.** El panel III del tratamiento del adulto programa nacional de educación del colesterol (NCEP ATP III) acuñó el nombre de síndrome metabólico.

**H) 2003.** La asociación americana de clínicos endocrinólogos (AAACE) regresó al nombre de Síndrome de Resistencia a la Insulina (SRI).

**I) 2004.** Ridker y col. propusieron la inclusión de la proteína C reactiva de alta sensibilidad y fue establecido como un fuerte factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares.

**J) 2010.** La OMS limitó la utilidad del SM como una herramienta para el manejo clínico ó estudios epidemiológicos.

### **2.1.2 Definición según la OMS**

La OMS define al síndrome metabólico como la presencia de intolerancia a la glucosa ó Diabetes Mellitus, y/ó resistencia a la insulina junto con dos o más componentes como: <sup>(7)</sup>

- Presión arterial elevada  $\geq 140/90$  mmHg
- Elevación en los triglicéridos plasmáticos  $\geq 150$  mg/dL y/ó disminución de la HDL-C  $< 35$  mg/dL en hombres y  $< 39$  mg/dL en mujeres.
- Obesidad Central: Relación cadera/cintura  $>0.9$ m en hombres y  $> 0.85$ m en mujeres y/ó Índice de masa corporal  $>30$  Kg/m<sup>2</sup>
- Microalbuminuria: Grado de excreción de albúmina urinaria  $\geq 20$   $\mu$ gm/min ó la relación albúmina/creatinina  $\geq 30$   $\mu$ gm/min

### **2.1.3 Definición según el grupo europeo para el estudio de la resistencia a la insulina (EIGR)**

El EIGR propuso una modificación a la definición de la OMS, usando el término síndrome de resistencia a la insulina en lugar de síndrome metabólico. <sup>(7)</sup>

De acuerdo con la EIGR los criterios diagnósticos incluyen la elevación de la insulina plasmática más dos de los siguientes factores:

- Obesidad Abdominal: La circunferencia de la cintura  $\geq 94$  cm en hombres y  $\geq 80$  cm en mujeres.
- Hipertensión:  $\geq 140/90$  mmHg ó en tratamiento antihipertensivo.
- Elevación en los triglicéridos:  $\geq 150$  mg/dL y/ó una disminución de la HDL-C  $<39$  mg/dL tanto para hombres como para mujeres.
- Elevación en la glucosa plasmática: alteración en la glucosa en ayunos, pero no diabetes.

#### **2.1.4 Definición según Panel de tratamiento del adulto III programa nacional de educación sobre el colesterol (NCEP ATP III)**

De acuerdo con el NCEP ATP III, un sujeto tiene Síndrome Metabólico si tiene tres o más de los siguientes criterios: <sup>(7)</sup>

- Obesidad Abdominal: Circunferencia de la cintura  $\geq 102$  cm en hombres y  $\geq 88$  cm en mujeres
- Hipertrigliceridemia:  $\geq 150$  mg/dL
- Disminución en la HDL-C:  $< 40$  mg/dL en hombres y  $< 50$  mg/dL en mujeres
- Elevada presión sanguínea:  $> 130/85$  mmHg
- Alteración en la glucosa en ayunas:  $> 110$  mg/dL

EL NCEP ATP III considera el estado proinflamatorio y el estado protrombótico como componentes del síndrome metabólico aunque no están incluidos en los criterios que definen al síndrome metabólico.

#### **2.1.5 Definición según la asociación americana de clínicos endocrinólogos (AACE)**

La AACE al igual que el EGIR prefiere usar el término síndrome de resistencia a la insulina en lugar de síndrome metabólico. <sup>(7)</sup>

- Algún grado de intolerancia a la glucosa (IFG/IGT)
- Metabolismo anormal del ácido úrico (Concentración plasmática de ácido úrico, aclaramiento renal de ácido úrico)
- Dislipidemia (Triglicéridos, HDL-C, diámetro de partícula de la LDL, acumulación postprandial de lipoproteínas ricas en triglicéridos)
- Cambios hemodinámicos (actividad sistémica de los nervios simpáticos, retención renal de sodio, presión arterial)
- Factores protrombóticos (inhibidor-1 del plasminógeno activado, Fibrinógeno)
- Marcadores de inflamación (Proteína C-reactiva, conteo de células blancas)

- Disfunción endotelial (Adhesión celular mononuclear, concentración plasmática de moléculas de adhesión celulares, concentración plasmática de dimetilarginina asimétrica, vasodilatación endotelio-dependiente).

### **2.1.6 Definición según el congreso global de la federación internacional de diabetes (IDF)**

Esta definición identifica a la obesidad central como un componente esencial del síndrome metabólico y define a la obesidad central (basada en raza-y género específicos (Tabla 1), más dos de los siguientes parámetros:<sup>(7)</sup>

- Elevación en los triglicéridos:  $\geq 150$ mg/dL ó historia de un tratamiento específico a esta anormalidad en los lípidos
- Reducción de la HDL-Colesterol:  $<40$  mg/dL en hombres y  $< 50$  mg/dL en mujeres ó historia de un tratamiento específico a esta anormalidad en los lípidos.
- Elevada presión arterial: Presión arterial sistólica  $\geq 130$  mmHg ó diastólica  $\geq 85$  mmHg ó tratamiento de hipertensión diagnosticada.
- Elevación en los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas  $\geq 100$  mg/dL o diagnóstico previo de DM2.

**Tabla 1. Valores de corte de obesidad central según su país/grupo étnico descrito por la IDF, la cual identifica la obesidad central como un componente esencial del SM**

País/Grupo étnico	Valores de Circunferencia de la cintura	
	Hombres	Mujeres
Europeos	≥94cm	≥80 cm
Asiáticos basados en China, - india	≥90 cm	≥80 cm
Chinos	≥90 cm	≥80 cm
Japoneses	≥90 cm	≥80 cm
Etnias de América central y del sur	Usar las recomendaciones de los asiáticos del sur hasta contar con datos específicos disponibles para esas poblaciones	
Africanos Sub-Sahara	Usar datos europeos hasta contar con datos específicos disponibles	
Mediterráneos del Este y Medio oriente (Árabes)	Usar datos europeos hasta contar con datos específicos disponibles	

## 2.2. LA CINASA DEPENDIENTE DE AMP (AMPK)

### 2.2.1 Estructura de AMPK

AMPK en mamíferos existe como un complejo heterotrimérico que consiste en una subunidad alfa de 63 KDa, una subunidad beta de 43 KDa y una subunidad gamma de 38 KDa. Distintos genes codifican las tres subunidades de AMPK, con genes separados que codifican para cada isoforma de las subunidades. <sup>(15)</sup>

Las subunidades alfa y beta tienen dos isoformas y la Gamma tiene tres isoformas. Dos cDNA's codifican las subunidades alfa con el gen de alfa 1 codificando a una proteína de 548 aminoácidos y la subunidad alfa 2 codificando una proteína de 552 aminoácidos. (Figura 5)

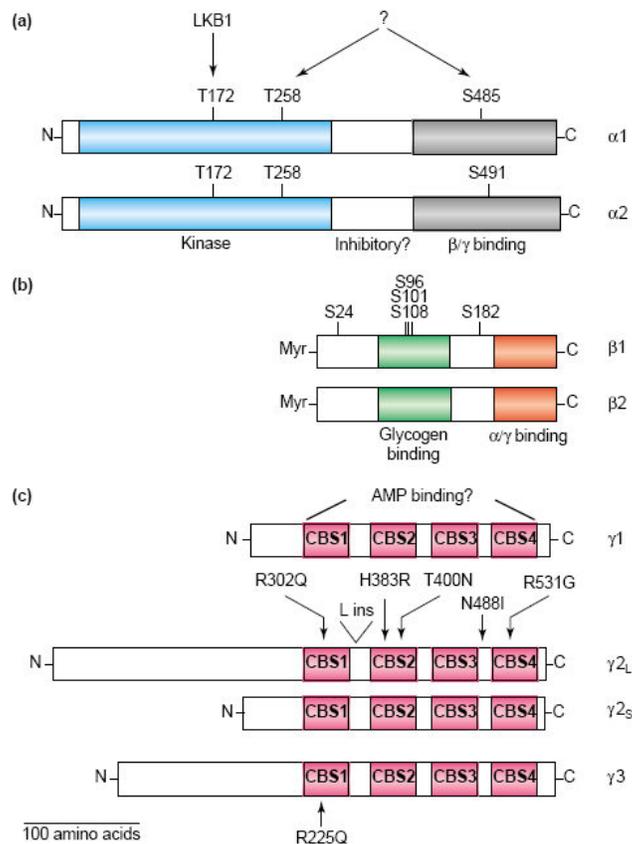


Figura 5. Subunidades e Isoformas de AMPK <sup>(36)</sup>

En ambas isoformas la región N-terminal cubre el dominio catalítico de proteína cinasa de serina-treonina con numerosos sitios regulatorios que son fosforilados por cinasa río arriba.

Se han identificado sitios de fosforilación por cinasas río arriba en las subunidades alfa, dentro de los que se encuentran la Thr 172, tanto en la subunidad alfa 1 y alfa 2, la Thr 258 en alfa 2, Ser 173/485/497 en alfa 1 y Ser 491 en alfa 2. El sitio más importante de fosforilación es la Thr 172 localizada en el asa de activación del sitio catalítico, esta fosforilación es crítica para la activación de la AMPK.

La región C-Terminal de las subunidades catalíticas no es directamente responsable de la actividad catalítica pero está involucrada en la interacción directa con la subunidad beta de AMPK; al igual que la subunidad alfa, la subunidad beta está codificada por dos cDNA's distintos, el cDNA beta 1 codifica para una proteína de 270 aminoácidos y el cDNA beta 2 codifica para una proteína de 271 aminoácidos. Estas subunidades beta comparten un 71% de identidad de los aminoácidos y ambas contienen dominios de unión a glucógeno (aminoácidos del 72 – 151) esta es una característica estructural de las enzimas que metabolizan glucógeno, es por esto que AMPK ha sido localizada en gránulos de glucógeno; este dominio de unión a glucógeno puede ser importante para la localización de la holoenzima y/o sus sustratos blanco. Las subunidades beta también poseen un dominio C-Terminal que es requerido para unir las subunidades alfa y gamma.

A diferencia de las subunidades alfa y beta, la subunidad gamma tiene tres isoformas gamma1, gamma 2 y gamma 3.

El cDNA para la isoforma gamma1 codifica una proteína de 331 aminoácidos. Dado que la subunidad gamma2 tiene dos sitios de inicio de la transcripción, produce transcritos de varios cortes y produce dos proteínas de tamaño distinto (gamma2 a y gamma2 b). La subunidad gamma2a produce dos transcritos de 3.8 y 3.9 Kb. Ambos transcritos codifican una proteína de 569 aminoácidos que

contiene un exceso de 241 aminoácidos localizados en la región N-Terminal; los genes de las otras gamma subunidades carecen de este exceso de aminoácidos.

La subunidad gamma 2b tiene 2.4 Kb de largo y codifica una proteína de 328 aminoácidos, la característica principal de todas las isoformas gamma de AMPK es la presencia del dominio de unión a nucleótidos AMP/ATP, dentro del complejo heterotrimérico de AMPK en forma de tándem con motivos de homología a Cistationina- $\beta$ -Sintasa (CBS) repetidos en tándem llamados "*Dominios Bateman*."<sup>(22)</sup>

En las isoformas catalíticas se han encontrado tres sitios de fosforilación Thr 172, Thr 258, y Ser 485 en alfa 1 y 491 en alfa 2.

Las subunidades beta son miristoiladas en su región N-terminal y contienen múltiples sitios de fosforilación. El dominio C-terminal está involucrado en la unión de la subunidad alfa y gamma; un dominio putativo de unión a glucógeno han sido identificado entre los residuos 72 – 151 de la subunidad  $\beta$ .

Las subunidades gamma contienen cuatro copias de dominio CBS, los cuales se encuentran involucrados en la unión a AMP.

En mamíferos, hay distintas composiciones órgano específicas de las subunidades de AMPK que conforman la holoenzima.<sup>(27)</sup>

Por ejemplo, la subunidad alfa 1 se expresa ubicuamente mientras que la subunidad alfa 2 se expresa principalmente en corazón, músculo esquelético e hígado, a diferencia del tejido adiposo donde la subunidad alfa 1 es la que se expresa mayoritariamente.(Tabla 2)

**Tabla 2. Distribución de las isoformas de AMPK en distintos tejidos**<sup>(28,29)</sup>

Tejido	Subunidad-alfa	Subunidad-beta	Subunidad-gamma
Tejido adiposo	$\alpha$ -1: 90 % $\alpha$ -2:10%	ND	ND
Corazón	$\alpha$ -1: 30 % $\alpha$ -2:70%	$\beta$ 1< $\beta$ 2	$\gamma$ 1::85% $\gamma$ 2 :15%
Hígado	$\alpha$ -1: 45 % $\alpha$ -2:55%	$\beta$ 1> $\beta$ 2	$\gamma$ 1:90% $\gamma$ 2 :10%
Músculo esquelético	$\alpha$ -1: 20 % $\alpha$ -2:80%	$\beta$ 1< $\beta$ 2	$\gamma$ 1:90% $\gamma$ 2 :10% $\gamma$ 3:ND

### 2.2.2 Fosforilación de AMPK

La región N-Terminal de la subunidad alfa abarca el dominio catalítico serina treonina, el cual cuando se fosforila incrementa la actividad de cinasa.

Entre los diferentes residuos presentes en este dominio, la fosforilación en la Thr 172 es crítica para la activación de AMPK.

Cuando el AMP se une a los dominios Bateman ( los cuales son 4 repeticiones en Tandem de un motivo CBS) dentro de la subunidad gamma, el AMP activa alostéricamente a AMPK, por desplazamiento del ATP unido dentro del subunidad gamma y promueve subsecuentemente la actividad de AMPK.

Por otro lado existen reportes que el AMP no promueve la fosforilación de AMPK sino que actúa vía la inhibición de proteína fosfatasa como por ejemplo (PP2C alfa) que desfosforila a AMPK por lo que deja de estar en su estado activo de cinasa.

Mientras que el mecanismo de cómo los niveles de AMP/ADP/ATP regulan la fosforilación de AMPK no han sido del todo esclarecidos<sup>(22)</sup>, los mecanismos por los cuales cinasas río arriba AMPKKs incrementan la actividad de AMPK han sido bien investigados.

Diferentes cinasas fosforilan el residuo Thr 172 de AMPK incluyendo la cinasa de hígado B1(LKB1), la cinasa dependiente de calmodulina, (CaMKK $\alpha$ ) y (CaMKK $\beta$ ) y la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF)- $\beta$ . En el caso de la cinasa LKB-1, ésta forma un complejo con la proteína reguladora MO25 y la pseudocinasa STRAD para formar una AMPKK.

Adicionalmente a los mecanismos que fosforilan en la Thr 172 y activan a AMPK, se han identificado sitios de inhibición para esta cinasa, y se ha demostrado que AMPK sufre una fosforilación inhibitoria en los residuos serina 485 y 491 de las subunidades catalíticas  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2.<sup>(22)</sup> Este efecto inhibitorio puede ser mediado por una cinasa río arriba como la proteína cinasa B (PKB/AKT) y la proteína cinasa A (PKA).

La unión de AMP o ATP induce un cambio conformacional en el dominio cinasa que protege a AMPK de la desfosforilación en la Thr-172 probablemente catalizada por una proteína fosfatasa 2-C. La combinación de los efectos alostéricos y la fosforilación causa un incremento >1000 en la actividad de cinasa, permitiéndole así responder mejor a pequeños cambios en el estatus energético celular de una manera altamente sensible.

AMPK se activa en respuesta a una variedad de estrés metabólicos que típicamente, pero no exclusivamente, cambian la relación AMP: ATP, ya sea por un incremento en el consumo de ATP (activación de vías biosintéticas) o reduciendo la producción de ATP seguida de una hipoxia, privación de glucosa e inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial con venenos metabólicos (arsenita, oligomicina, dinitrofenol, azida y antimicina A). AMPK juega un papel en la adaptación metabólica en respuesta a un estrés metabólico agudo y crónico.

### 2.2.3 FUNCIÓN DE AMPK

El balance entre la producción y utilización de energía recae en varios sistemas celulares, donde hasta ahora se han identificado varios sistemas claves en el control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular como el de la AMPK. (Figura 6)

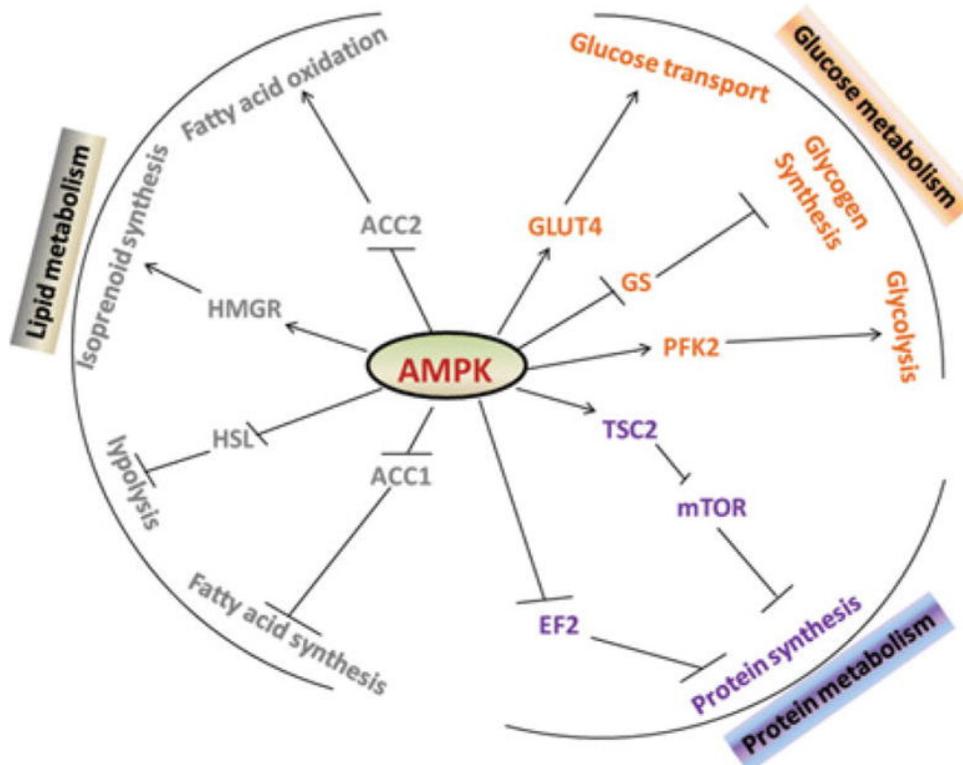


Figura 6. Regulador maestro del metabolismo <sup>(41)</sup>

Esta es una proteína cinasa de serina-treonina conservada filogenéticamente la cual se ha propuesto que actúa como un switch maestro metabólico mediante la adaptación celular al ambiente o a los factores de estrés nutricional,<sup>(8)</sup> ya que es un sensor del balance energético periférico, que se activa cuando el suministro de energía es bajo, respondiendo a un incremento intracelular de AMP y niveles decrecientes de ATP.<sup>(41)</sup>

La AMPK fosforila diversos sustratos con la finalidad de inhibir vías metabólicas consumidoras de ATP y activar a las productoras. (Tabla 3)

**Tabla 3. Enzimas Relacionadas con la actividad de AMPK <sup>(35)</sup>**

Órgano/Tipo celular		Resultado inmediato	Resultado biológico final
Homeostasis de la glucosa- Blancos principales			
Músculo Corazón Hígado	Glucógeno sintasa 6-Fosfofructocinasa 2 Factor de Transcripción CREBP	Actividad enzimática↓ Actividad enzimática↓ Unión al ADN↓	Síntesis de glucógeno↓ Glucolisis↑ Expresión de piruvato cinasa↓
Metabolismo de lípidos- Blancos primarios			
Hígado Músculo Hígado Tejido adiposo	Acetil CoA carboxilasa-1/α Acetil CoA carboxilasa-1/β HMG-CoA reductasa Lipasa sensitiva a hormonas	Actividad enzimática↓ Actividad enzimática↓ Actividad enzimática↓ Activación por PKA↓	Síntesis de ác. grasos↓ Oxidación de ác. grasos↑ Síntesis de colesterol↓ Lipólisis↓
Biogénesis/ Función mitocondrial			
Músculo Músculo Músculo	Factor de transcripción (NRF1) UCP3 Co-activador PGC-1α	Unión a ADN↑ Expresión↑ Expresión↑	Biogénesis mitocondrial↑ Bomba de protones mitocondrial↑ Biogénesis mitocondrial↑

Si bien la acción de la activación en el balance energético sistémico se logra por la rápida y directa fosforilación de enzimas metabólicas, la AMPK también ejerce efectos a largo plazo modificando la expresión de diversos genes. <sup>(9,10,11)</sup> al menos en parte por la fosforilación de factores transcripcionales. (Tabla 4)<sup>(40)</sup>

**Tabla 4. Factores transcripcionales fosforilados por AMPK en hígado**

Blanco	Sitio de fosforilación	Efecto de la Fosforilación	Genes Blancos
ChREBP	Ser <sup>568</sup>	Unión a ADN↓	Genes glucolíticos y lipogénicos
FoxO1	?	Estabilidad de proteínas↓	G6Pasa
HNF4	Ser <sup>304</sup>	Estabilidad de proteínas↓	L-PK, ApoCIII,...
SREBP1c	---	Expresión de genes↓	Genes glucolíticos y lipogénicos
TORC2	Ser <sup>171</sup>	Detención citoplasmática↑	Genes gluconeogénicos

#### **2.2.4 Las consecuencias transcripcionales de la activación de AMPK.**

AMPK modula la transcripción de numerosos genes que incrementan la producción de ATP a través de la glucólisis y el uso de lípidos como un recurso de energía mitocondrial.

Cuando se ha tratado a roedores con compuestos activadores de AMPK, como AICAR, ácido Beta-guanadinopropiónico (un agente que depleta fosfocreatina) o resveratrol, todos incrementan la biogénesis mitocondrial en músculo esquelético. La acción de estos agentes sobre el contenido mitocondrial y en la expresión de genes es altamente deteriorada en modelos con la actividad de AMPK defectuosa, implicando que AMPK es un regulador maestro de los mecanismos de la traducción controlando la biogénesis mitocondrial. <sup>(30)</sup>

#### **2.2.5 Potencial de AMPK en SM**

La importancia de AMPK es que podría tener efectos benéficos en el síndrome metabólico a través de una manera independiente a la insulina al incrementar la utilización de glucosa en músculo, disminuir la producción de glucosa hepática e incrementar la oxidación de ácidos grasos tanto en músculo como en hígado. Mientras que en el tejido adiposo que es un jugador clave en la regulación de la sensibilidad a la insulina, en la liberación de ácidos grasos (lipólisis) y la secreción de hormonas. <sup>(31)</sup>

#### **2.2.6 AMPK media los efectos metabólicos de las adipocinas**

Un gran avance en el entendimiento del metabolismo de las últimas décadas es el reconocimiento de la función endocrina del tejido adiposo, secretando una gran cantidad de hormonas, citocinas y lípidos que cumplen una función sistémica en la homeostasis de la glucosa, lípidos, regulación del peso, presión sanguínea y función inmune. Estas moléculas han sido denominadas adipocinas y muchas de sus acciones metabólicas están mediadas por AMPK. <sup>(47)</sup>

### **2.2.6.1 LEPTINA**

Es una hormona secretada por los adipocitos y juega un papel en la ingesta de alimentos, gasto energético, peso corporal y la función neuroendocrina.

La leptina estimula la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa, y previene la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos.

Adicionalmente a sus efectos en la ingesta de alimentos, controla procesos inmunes e inflamatorios.

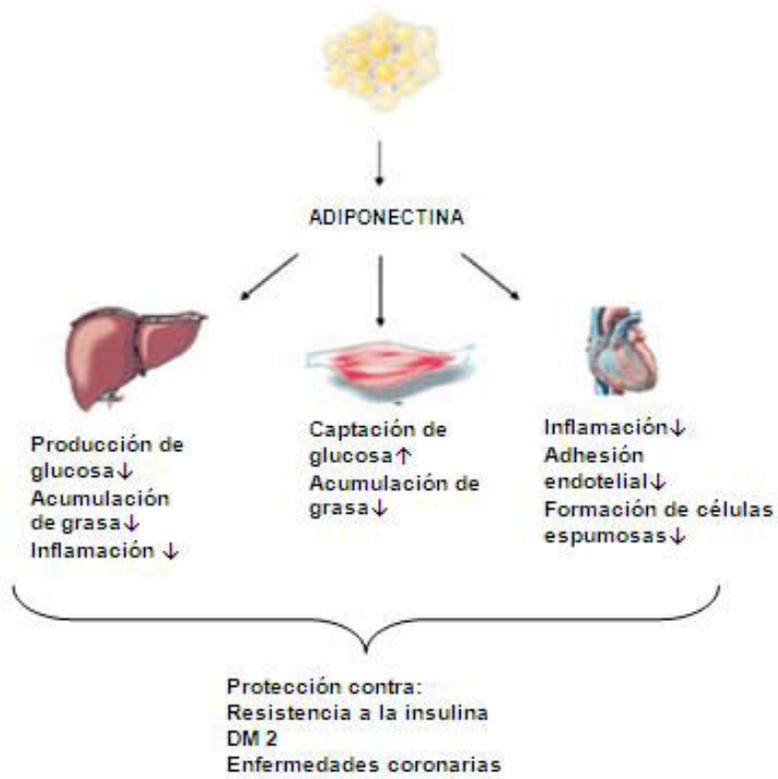
En la obesidad, especialmente en la adiposidad visceral, el tejido adiposo es capaz de producir citocinas inflamatorias o colaborar con su producción en otros tejidos. Además en diabetes tipo 2, aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con la obesidad son causales ligadas a la inflamación. <sup>(38)</sup>

### **2.2.6.1 ADIPONECTINA**

Es una molécula secretada por los adipocitos que circula en complejos macromoleculares, incrementando la oxidación de ácidos grasos y captación de glucosa, inhibe la gluconeogénesis y previene la aterosclerosis por sus efectos directos en la vasculatura. La adiponectina estimula la fosforilación y actividad en músculo y en hígado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. <sup>(35)</sup> A diferencia de otras adipocinas, los niveles circulantes elevados de adiponectina son inversamente relacionados a la obesidad, es también la única adipocina que exhibe propiedades tanto antiinflamatorias como antiaterogénicas<sup>(37)</sup>

También se ha sugerido que la adiponectina pudiera ofrecer protección contra efectos adversos en la salud de la obesidad y desórdenes relacionados con ésta.

En adultos disminuye la adiponectina circulante y esto ha sido relacionado con la resistencia a la insulina, a bajos niveles de colesterol, a diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Además la adiponectina plasmática está inversamente relacionada con triglicéridos sanguíneos.<sup>(37, 47)</sup>



**Figura 7. Efecto de la adiponectina.<sup>(41)</sup>**

## **2.2.7 AMPK en el tejido hepático (TH)**

### **2.2.7.1 AMPK y el metabolismo de lípidos**

AMPK fosforila e inactiva enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos con el fin de mantener el estatus energético del hígado.

AMPK coordina los cambios en el metabolismo del hígado mediante la regulación entre la oxidación y la biosíntesis de ácidos grasos.

Las enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), acetil CoA carboxilasa (ACC-2), que son enzimas claves en la síntesis de colesterol y ácidos grasos respectivamente son fosforiladas e inactivadas por AMPK. La fosforilación de estas enzimas se logra rápida y directamente por AMPK, aunado a esta acción se ha demostrado que presenta efectos a largo plazo en la expresión de genes. <sup>(38)</sup>

La activación de AMPK por AICAR o mediada por la sobre expresión de una forma constitutiva activa de la subunidad catalítica  $\alpha$  2 inhiben la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos, preservando la glucosa para vías productoras de ATP en lugar de la síntesis de lípidos.

Por otro lado, la activación de AMPK reduce la expresión del elemento regulador de la proteína de unión a esteroides 1c (SREBP1) y la proteína de unión de elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP), los cuales son factores de transcripción que juegan un papel clave en la regulación de genes glucolíticos y lipogénicos por insulina y glucosa, respectivamente. En el caso de ChREBP se ha reportado que AMPK lo fosforila directamente y modula su unión a ADN.

Los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) son conocidos como represores de la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos e inducen el papel de AMPK en la mediación de los efectos de los PUFAs en la transcripción de genes.

En la síntesis del colesterol, AMPK bloquea la conversión de HMG-CoA a mevalonato. Uno pudiera esperar un efecto perjudicial en la homeostasis del

colesterol cuando la actividad de AMPK es alterada. Sin embargo, en el hígado de ratones “*knockout*” para la isoforma alfa 2 los niveles plasmáticos de colesterol HDL y total no se vieron afectados. Estos resultados sugieren que la actividad de la isoforma remanente alfa 1 en ratones *Knockout* a AMPK alfa2 es suficiente para controlar la síntesis del colesterol y que HMG-CoA es un blanco para ambas isoformas.

ACC es una importante enzima que controla de la síntesis de malonil-CoA, un precursor crítico para la biosíntesis de ácidos grasos y un potente inhibidor de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria vía la regulación alostérica de la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) la cual cataliza la entrada de grasas acil-CoA de cadenas largas a la mitocondria. La inhibición de ACC por AMPK permite un descenso en el contenido de malonil-CoA y subsecuentemente un deceso en la síntesis de ácidos grasos concomitante con un incremento en la  $\beta$ -oxidación.

La sobre expresión de AMPK alfa-2-CA en el hígado incrementa la concentración de cuerpos cetónicos, marcadores de la  $\beta$ -oxidación hepática.

La fosforilación de ACC por AMPK es impedida en hepatocitos con ambas subunidades suprimidas, contribuyendo a un incremento intracelular de los niveles de malonil CoA y triglicéridos acumulándose en el hígado.

Estos resultados sugieren que AMPK regula el metabolismo de los lípidos en gran medida a través de la estimulación de la oxidación de ácidos grasos.<sup>(43)</sup>

### **2.2.7.2 AMPK y el metabolismo de la glucosa**

El efecto hipoglucémico de la activación de AMPK es consistente con la abolición de la producción de Glucosa hepática (HGP), como sugiere la disminución de la expresión de genes gluconeogénicos Fosfoenol piruvato carboxicinas (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pase) en células hepáticas que expresan AMPK-CA o tratadas con AICAR.

La fosfatasa de especificidad dual Dusp4 y el factor de transcripción inmediato (Egr1) han sido identificados como blancos transcripcionales de AMPK los cuales son necesarios para reprimir la producción hepática. Debido a Egr1 y Dusp4 actúan secuencialmente para mediar el efector inhibidor de AMPK en la gluconeogénesis hepática, el incremento de la proteína Egr1 es acompañado de un aumento en la unión con el promotor Dusp4 permitiendo la expresión de Dusp4 e inhibición de la transcripción de los genes de PEPCK y G6Pase.

TORC2 media la transcripción dependiente de CREB de PGC1 $\alpha$  y su subsecuente blanco gluconeogénico PEPCK y G6Pasa. TORC2 es regulado por múltiples vías de señalización en respuesta a cambios en niveles de glucagón e insulina o al estatus energético intracelular.

El co-activador traduccional de actividad regulada 2 CREB (TORC2) ha sido identificado como un componente pivote en el programa gluconeogénico. TORC2 media la transcripción dependiente de CREB de PGC1-alfa y sus subsecuentes blancos gluconeogénicos PEPCK y G6Pasa.

TORC2 es regulado por múltiples vías de señalización en respuesta a cambios en los niveles intracelulares de insulina y glucagón o el estatus energético celular.

La fosforilación en la Ser 171 de TORC2 fue inicialmente identificada como una cinasa inducida por sal 2 (SIK2) una proteína cinasa relacionada con AMPK. Recientemente se ha encontrado que la activación de AMPK fosforila a TORC2 y regula la translocación citoplasmática de TORC2 en cultivos de hepatocitos primarios.

Interesantemente, en ausencia de LKB1, la expresión de algunos genes claves en la gluconeogénesis hepática están aumentados y el fármaco metformina no reduce más los niveles de glucosa sanguíneos.

LKB1 fosforila y activa numerosas cinasas incluyendo a los miembros de las familias de AMPK y SIK.

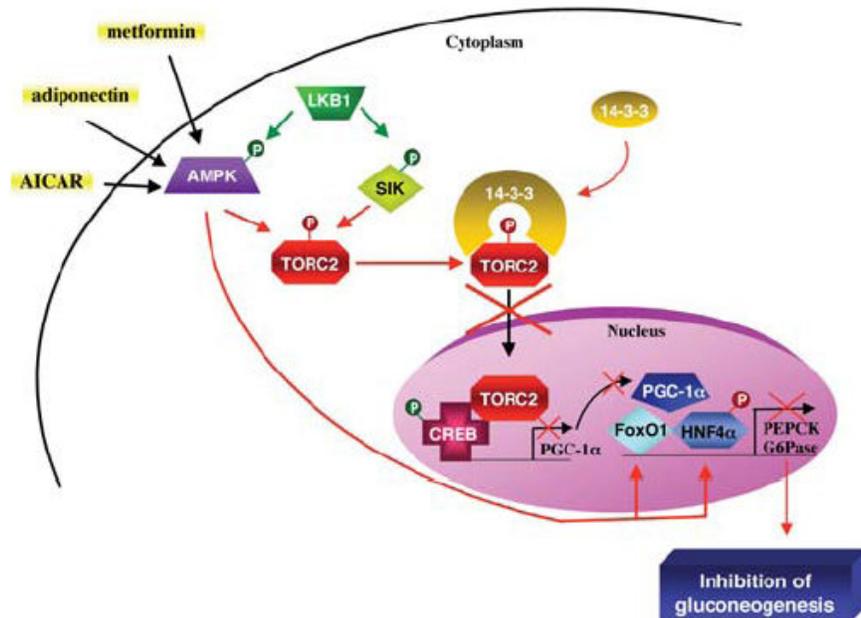


Figura 7. Mecanismo de inhibición de la gluconeogénesis mediada por AMPK<sup>(35)</sup>

## **2.2.8 AMPK en tejido adiposo (TA)**

### **2.2.8.1 AMPK en el metabolismo de la glucosa**

En años recientes un blanco directo de AKT (AS160) Substrato de AKT de 160 kDa, ha sido implicado en la translocación mediada por insulina de GLUT 4 y la captación de glucosa tanto en adipocitos como en músculo esquelético. Se ha sugerido que AS160 está involucrada en la regulación del transporte de glucosa durante la contracción/ejercicio, al ser blanco de AMPK, sin embargo existe también evidencia que propone la inactivación de AS160 por AMPK mediante la activación con AICAR en adipocitos de cultivos primarios y aunque el mecanismo por el cual sucede esta inhibición no está aún esclarecido, el impedimento en la captación en adipocitos limita la producción de glicerol-3fosfato, implicado en la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos, lo cual es compatible con la idea de que en condiciones de estrés o de un incremento en la demanda energética, AMPK se activa para apagar vías consumidoras de energía.<sup>(42)</sup>

### **2.2.8.2 AMPK en el metabolismo de lípidos**

Bajo condiciones de activación prolongada de AMPK, el metabolismo del tejido adiposo blanco pudiera ser remodelado con un fin oxidativo más que de almacenamiento, el incremento en la oxidación de grasa en el adipocito es acompañada de un aumento en la fosforilación de AMPK, del PGC1-alfa, de contenido mitocondrial aumentado y una disminución de enzimas lipogénicas.<sup>(42)</sup>

La activación de AMPK en tejido adiposo resulta en la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y la lipólisis basal debido a la fosforilación de la Acetil carboxilasa-1 (ACC-1) y la lipasa sensitiva a hormonas (HSL); aunado

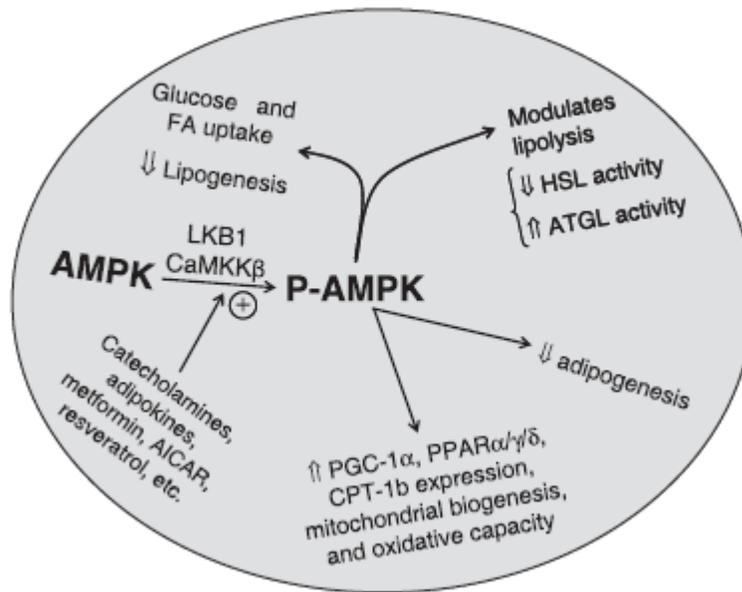


Figura 8. Papel de AMPK en tejido adiposo (figura modificada) <sup>(42)</sup>

## 2.2.9 AMPK en músculo esquelético (ME)

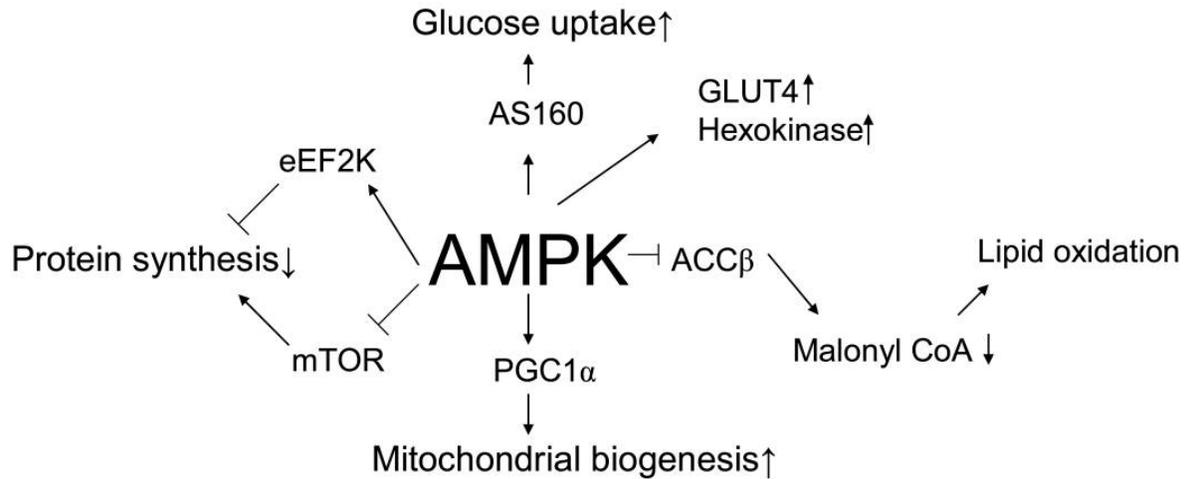
### 2.2.9.1 AMPK en el metabolismo de la glucosa y lípidos

En músculo esquelético la activación de AMPK por AICAR ha sido demostrado que transloca GLUT 4 a la membrana plasmática, ésta vía de AMPK es distinta a la vía de la insulina y puede ser una vía de proveer combustible, en forma de glucosa a los requerimientos energéticos durante el ejercicio. <sup>(48)</sup>

La activación de AMPK en músculo esquelético resulta en una mayor captación por glucosa por el mecanismo ya mencionado vía GLUT4.

La contracción muscular tiene como blanco la activación de AMPK y se ha sugerido que la proteína AS160 está también involucrada en la regulación del transporte de glucosa durante la contracción y el ejercicio. También, la activación de AMPK ocasiona una disminución de la concentración de malonil-CoA, un importante mediador en la oxidación de ácidos grasos.

Por otro lado la activación de AMPK ocasiona un aumento en la biogénesis mitocondrial.<sup>(45)</sup>



**Figura 9. Efecto de la activación de AMPK en ME.**<sup>(45)</sup>

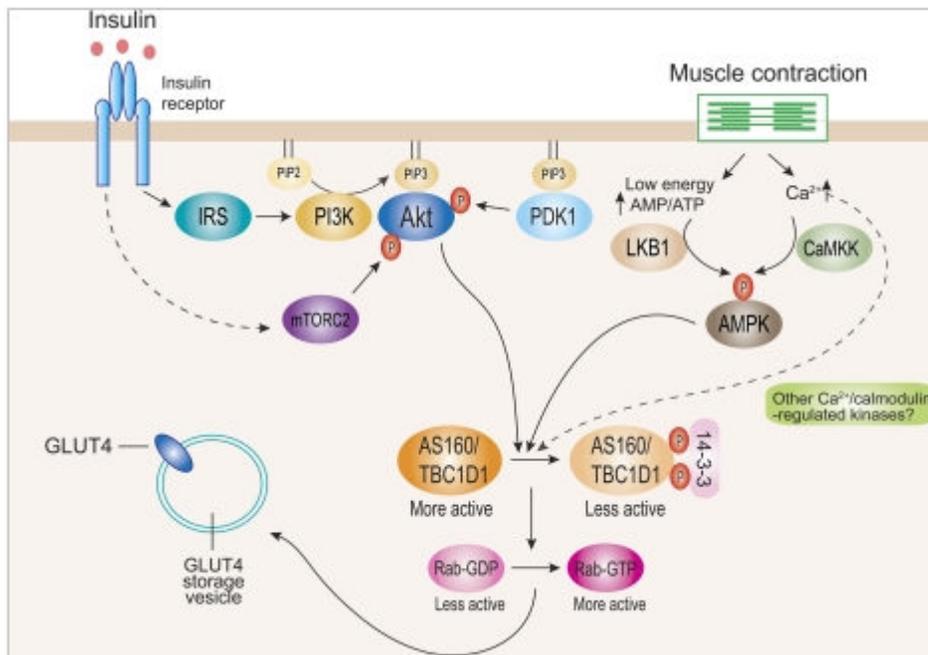
## 2.2.10 AMPK en corazón

### 2.2.10.1 AMPK en el metabolismo de la glucosa

La captación de glucosa en el adipocito ocurre principalmente por los transportadores de glucosa (GLUT's) mediante una vía dependiente o independiente de la insulina.

La captación de glucosa vía GLUT4 depende de la estimulación por insulina y por contracción muscular, mientras que la captación por glucosa vía independiente de la insulina ocurre principalmente vía GLUT1.

Incluso existe más de un mecanismo por el cual AMPK promueve los niveles de GLUT4 en la membrana plasmática mediante un grupo de proteína Rab GTP-asa activadas (Rab-GAPs), las cuales contienen dominios Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC).<sup>(22)</sup>



**Figura 10. Vías de señalización para la translocación de GLUT4.**<sup>(44)</sup>

La estimulación por insulina y la contracción dependen de que la captación de glucosa ocurra vía GLUT4 el cual transloca hacia la membrana del sarcolema desde depósitos intracelulares.

### 2.2.10.2 AMPK en el metabolismo de lípidos

AMPK facilita el reclutamiento de LPL hacia la vasculatura coronaria la cual hidroliza las lipoproteínas en triglicéridos para liberar ácidos grasos. Además AMPK promueve la captación de ácidos grasos vía la translocación y retención del transportador de ácidos grasos CD36 en la membrana plasmática. Por otro lado la acilación de ácidos grasos por ACSL 1 a acil-CoA genera suficiente AMP para activar a AMPK. Coordinadamente AMPK inhibe a ACC-2 y subsecuentemente la producción de malonil-CoA mitigando de esta manera la inhibición de CPT1. En paralelo AMPK mitiga el consumo de energía inhibiendo la síntesis de triglicéridos y de glucógeno por el bloqueo de GPAT y GS respectivamente.

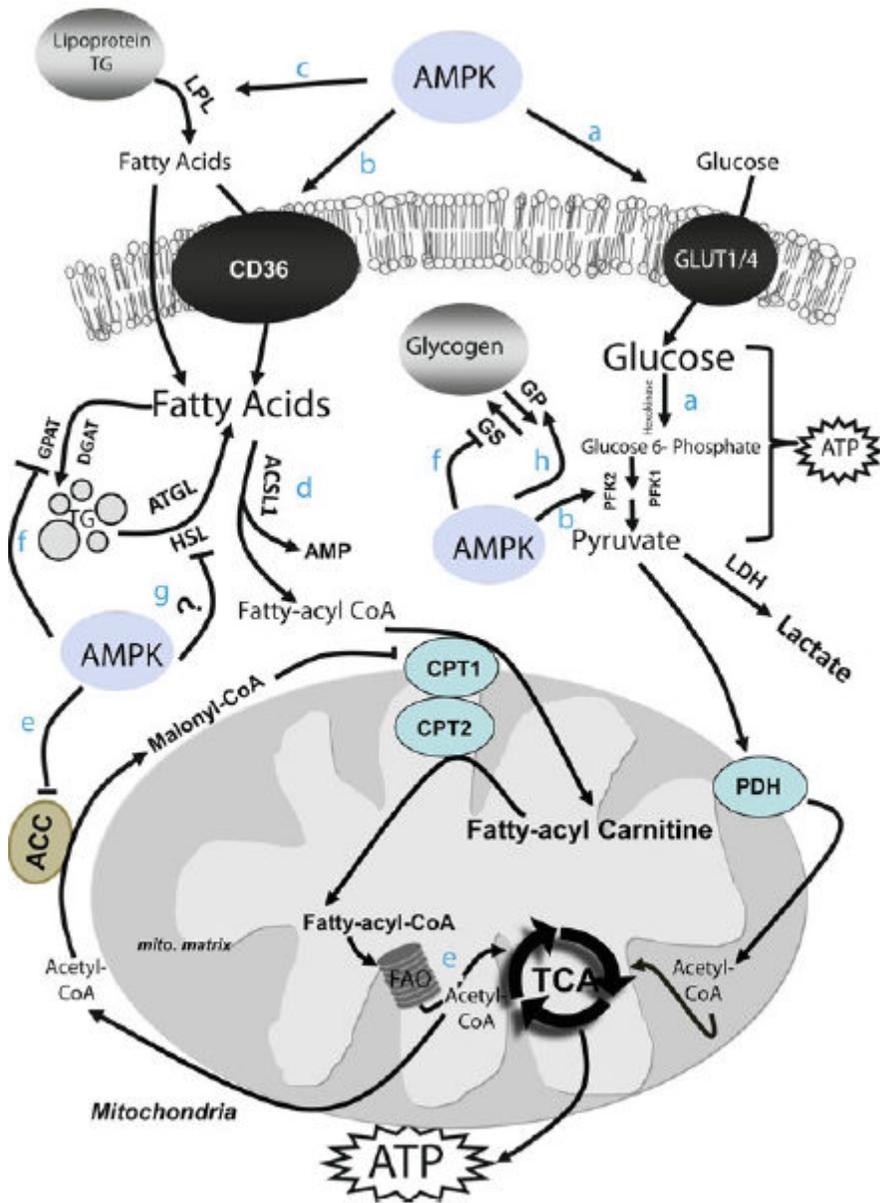


Figura 11. Metabolismo energético en corazón. (22)

## 2.3 METFORMINA

La metformina (1,1-dimetilbiguanida), es un derivado de la biguanida, las cuales se identificaron en la planta *Gallena Officinalis* y cuyos extractos se utilizaban en la edad media para la Diabetes por sus propiedades antihiper glucemiantes.<sup>(26)</sup>

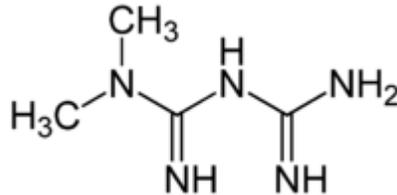


Fig. 12. (1,1-dimetilbiguanida) Metformina

El principal efecto de este fármaco procedente de la familia de las biguanidas es disminuir la producción hepática de glucosa e incrementar la captación de glucosa periférica, es por eso que ahora es un fármaco de primera elección en el tratamiento de la hiperglucemia de individuos con diabetes Mellitus tipo II, y es recomendada en conjunto con un cambio de estilo de vida (dieta, control de peso y actividad física).<sup>(25)</sup>

Independientemente a la mejora en el control glicémico, también tiene efectos favorables sobre los lípidos reduciendo los triglicéridos, LDL y el colesterol total.

Y parece tener un efecto anoréxico, contribuyendo a la disminución de peso en los obesos sin producción de hiperinsulinemia y sin causa de hipoglucemia.

### 2.3.1 Efectos secundarios:

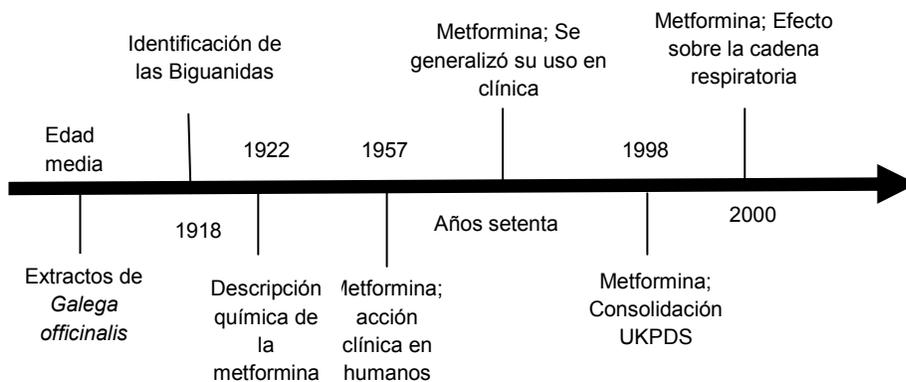
- Presenta alteraciones gastrointestinales: diarreas, vómitos, náuseas y dolor abdominal.
- Alteraciones gustativas.
- Acidosis láctica (descrita principalmente con butformina y fenformina) sólo en pacientes con insuficiencia renal.

- Efecto anoréxico.
- Sabor metálico y reducción de los niveles de vitamina B<sub>12</sub>

### 2.3.2 Contraindicaciones:

Está contraindicado en pacientes con Diabetes Mellitus tipo I, insuficiencia renal, alcoholismo, insuficiencia hepática, insuficiencia respiratoria, desnutrición importante, gestación o lactancia.

### 2.3.3 Cronología de la metformina



### 2.3.4 Metformina y AMPK

Se ha demostrado que numerosos compuestos activan AMPK incluyendo los fármacos antidiabéticos como la metformina, tiazolidinedionas y los fármacos que disminuyen el colesterol como las estatinas.<sup>(24)</sup> Y aunque la Metformina no activa directamente a AMPK, existe bastante evidencia que la activación de AMPK por metformina es secundaria a su efecto sobre la mitocondria, siendo esta el blanco primario de este fármaco.

Uno de los más grandes avances en el entendimiento del mecanismo celular de la metformina fue descubierta alrededor del año 2000 por dos grupos independientes que reportaron por primera vez que este miembro de la familia de las biguanidas inducía una ligera y específica inhibición del complejo 1 de la cadena respiratoria. Esta observación inicial fue hecha en hígados perfundidos de

roedores pero después fue expandida a otros tejidos, incluyendo músculo esquelético, células endoteliales, células pancreáticas tipo Beta, y neuronas.

Aunque el mecanismo por el cual se da esta inhibición selectiva no está esclarecido, el resultado es una disminución de los niveles de ATP, lo que se traduce en un incremento celular del ratio de AMP sobre ATP resultando en un desbalance entre la producción y consumo de ATP y una consiguiente activación de AMPK.

Aunado a esto, se ha demostrado que el metil succinato, un sustrato del complejo 2 de la cadena respiratoria pasando la inhibición del complejo 1, antagoniza la activación de AMPK inducida por metformina en líneas celulares pancreáticas beta. <sup>(25)</sup>

La acción preferencial de la metformina en hepatocitos se debe a la expresión predominante del transportador orgánico de cationes 1 (OCT1), el cual se ha demostrado que facilita la captación de la metformina.

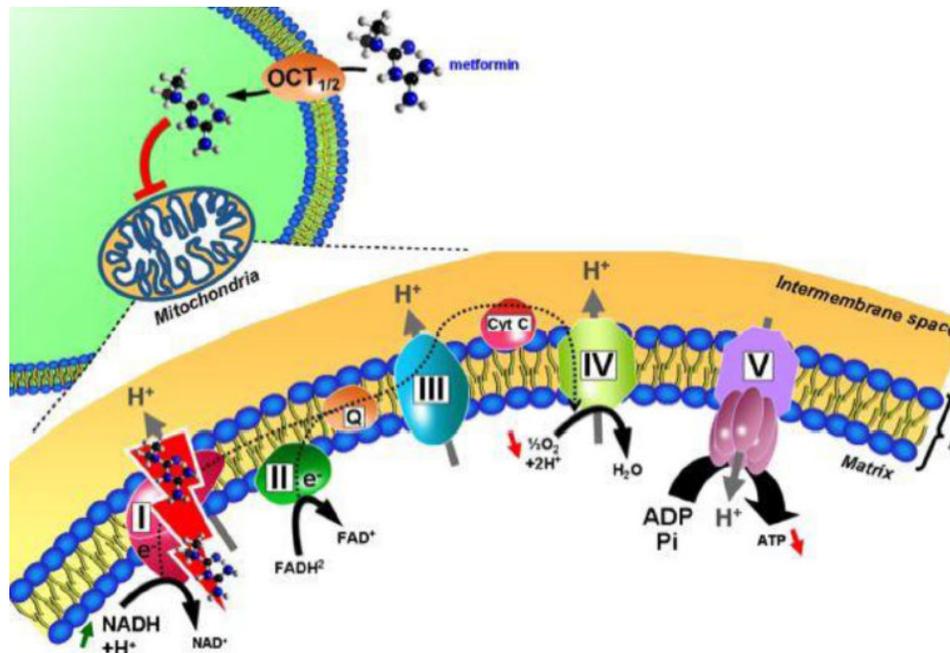


Figura 13. Mecanismo de acción de la metformina sobre la cadena respiratoria. <sup>(20)</sup>

La metformina es una de las drogas antidiabéticas más prescritas mundialmente, y ha sido bien documentado que el tratamiento con metformina activa AMPK tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>(17,11)</sup>

En músculo esquelético la metformina estimula la captación de glucosa coincidente con la activación de AMPK.

Los efectos benéficos de la metformina sobre los lípidos circulantes han sido ligados a la reducción de hígado graso, se ha reportado que la metformina activa AMPK en hepatocitos por lo que provee un blanco capaz de mediar los efectos metabólicos benéficos de la metformina.<sup>(18)</sup>

### 2.3.5 Farmacocinética

Después de la administración oral, la absorción de la metformina por el tracto gastrointestinal es rápida. La metformina es detectada en plasma en los primeros (15 o 30) minutos y rápidamente alcanza la Tmax (15 a 120) minutos, para dosis de (50, 100 y 200) mg/Kg. <sup>(46)</sup>

#### Perfil de concentración plasmática de metformina vs tiempo en rata

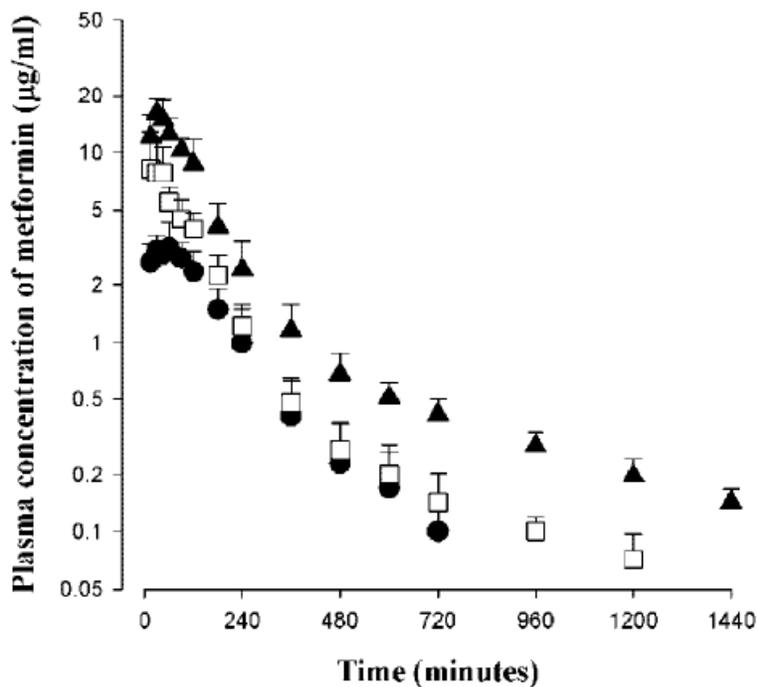


Figura 14. Perfil de concentración plasmática de metformina vs tiempo <sup>(46)</sup>

Perfiles de tiempo de concentración arterial plasmática después de una administración oral a dosis de (● 50;n=8, □ 100;n=7, ▲ 200;n=7) mg/kg de rata. Las barras representan la desviación estándar.

La biodisponibilidad de la metformina a una dosis de 100 mg/Kg es de 29.9%, la cantidad total de metformina del tracto gastrointestinal incluyendo heces (GI24h) fue de 4.78%

La dosis de la fracción oral no-absorbida (Funabs) a una dosis de 100 mg/kg de éste estudio realizado por (Young H y col.) puede ser estimada por la siguiente ecuación.  $0.0478 = F (no\ absorbida) 0.299 - 0.0131P$

Donde 0.299 y 0.0131 son la F y la fracción recuperada del tracto gastrointestinal a las 24 h GI24h. La Funabs calculada fue de 4.39% indicando la contribución de la excreción gastrointestinal (incluyendo la excreción biliar) de la droga absorbida del total de la droga recuperada del tracto gastrointestinal después de la administración oral a dosis de 100 mg/kg fue casi despreciable, 0.392%.

Después de una administración oral de metformina a una dosis de 100 mg/kg la fracción no absorbida fue aproximadamente de 4.39%, el valor de F es de 29.9% y el efecto de primer paso hepático y gastrointestinal fue aproximadamente de 11.3 y 53.8, respectivamente en ratas. La baja F de metformina en ratas es debida al considerable efecto de primer paso gastrointestinal. <sup>(46)</sup>

**Tabla 5. Parámetros Farmacocinéticos de la metformina en rata obtenidos por Young H et al <sup>(46)</sup>**

Parámetro	50 mg/kg (n=7)	100 mg/kg (n=7)	200 mg/kg (n=7)
Peso	256 ± 19.9	268 ± 12.5	276 ± 19.5
ABC <sup>a</sup>	644 ± 86.2	1220 ± 238	2630 ± 490
C max <sup>a</sup>	3.40 ± 0.484	9.57 ± 4.08	18.0 ± 3.14
T max	30 ( 15 – 120)	30 (15 – 45)	30 (15 – 45)
Vida media terminal (min)	(191 ± 45.7) <sup>b</sup>	356 ± 152	409 ± 138
Cl R (mL/min/kg)	37.4 ± 3.54	38.4 ± 10.8	39.6 ± 9.13
Ae 0 -24 h	52.5	50.1 ± 7.93	50.0 ± 10.8
GI 24-h (% dosis)	6.81 ± 2.41	4.78 ± 0.544	5.98 ± 2.15
F%	34.1	29.9	28.7

Valores expresados como promedio ± DS excepto los rangos de Tmax

## 2.4 Blanco de Rapamicina en mamífero (mTOR)

El control en la síntesis de proteínas es complejo e involucra la fosforilación y desfosforilación de diversos factores de transcripción y proteínas ribosomales.

La síntesis de proteínas involucra la interacción de un complejo entre la maquinaria traduccional, la biogénesis ribosomal y la señalización por aminoácidos. Una de las proteínas que es mediadora central de este proceso es el blanco de rapamicina en mamífero(mTOR).

mTOR es una proteína cinasa serina/treonina que regula múltiples procesos celulares como el crecimiento celular, ciclo celular, supervivencia y la autofagia.

mTOR es activado por diversos agentes anabólicos, incluyendo la insulina y ciertos aminoácidos como la glutamina y leucina. <sup>(40)</sup>

mTOR forma dos complejos funcionales, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 existe como un complejo multiprotéico que está compuesto por mTOR, Raptor, mLST8 (GβL) y PRAS40 mientras que mTORC2 consiste en mTOR, Rictor, mSin1 (MAPKAP1), Protor (PRR5) y mLST8.

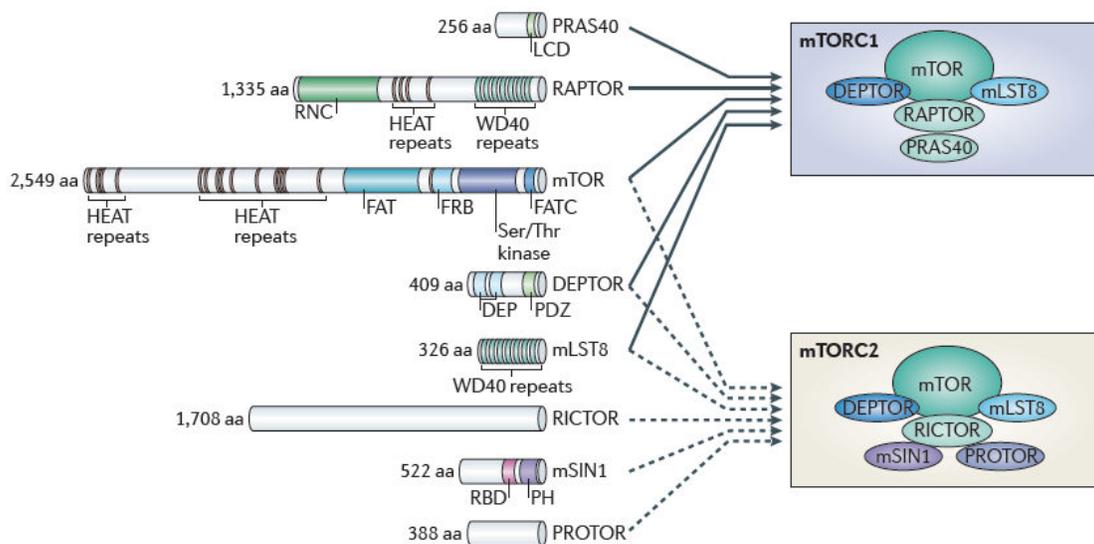


Figura 15. Subunidades de los complejos de mTOR <sup>(41)</sup>

mTORC2 participa en la organización de la actina citoesquelética y el blanco directo por el cual mTORC2 media la señalización de la actina citoesquelética es aún desconocido.

mTORC1 parece tener un papel importante en la adipogénesis ya que el tratamiento con rapamicina previene la diferenciación de los adipocitos y su acumulación de lípidos. El mecanismo por el cual mTOR controla la adipogénesis es pobremente entendido aunque es probable que el receptor nuclear PPAR y esté involucrado ya que el tratamiento con rapamicina inhibe la actividad de PPAR y.

PPAR y juega un papel crítico en la adipogénesis y la acumulación de lípidos y es además responsable del almacenamiento eficiente de energía.

La regulación del metabolismo de la grasa por mTORC1 también involucra a la vía de S6K1. La pérdida de la actividad de TOR correlaciona con una disminución de grasa, sugiriendo que la vía de TOR pudiera ser normalmente requerida para la acumulación de grasa. Adicionalmente de ser un depósito de almacén de grasa, el tejido adiposo secreta hormonas que regulan el apetito y otros aspectos de la fisiología animal, sugiriendo que pudiera haber más implicaciones en el control de la adipogénesis con mTOR, es por esto que mTOR pudiera jugar un rol importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas como obesidad y diabetes Mellitus tipo 2.

Estudios recientes han evidenciado la existencia de una retroalimentación negativa de la vía de sensora de nutrientes TSC-mTOR-S6K1 hacia la vía río arriba de respuesta a la insulina IRS-PI3K-PDK1-AKT. Se ha demostrado que el incremento en la disponibilidad de aminoácidos puede inhibir la señalización a través de la vía de la insulina. La sensibilidad a la rapamicina de este efecto sugiere que la inhibición es mediada por una retroalimentación negativa de mTOR a un componente de esta vía de la insulina. <sup>(37)</sup>

La señalización de TSC-mTOR-S6K1 atenúa la fosforilación de PI3K e inactiva las proteínas IRS. En particular, S6K1 regula ambos a nivel transcripcional y a través de una fosforilación directa, así impidiendo la función de IRS1. La activación constitutiva de la señalización de mTOR-S6K1 induce una retroalimentación negativa para atenuar PI3K vía inhibición de IRS. Por otro lado ratones “*knockouts*” a S6K, debido a la pérdida de la inhibición de IRS, son hipersensibles a la insulina y no son hipoglicémicos.<sup>(42)</sup>

La configuración de cada complejo se conserva desde levaduras hasta mamíferos. mTORC1 está directamente regulada por la energía celular y el estatus nutricional, mientras que mTORC2 no lo está. mTORC1 juega un papel esencial en la regulación de la traducción, la autofagia y es sensible a la inhibición por rapamicina. Raptor un componente de mTORC1 que funciona como una proteína andamio que recluta substratos como la cinasa S6K, eIF4E y 4EBPs para fosforilación por mTOR. Por otro lado Raptor juega un papel en la localización intracelular de mTORC1 en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos, los cuales son esenciales para la activación de mTOR.<sup>(27)</sup>

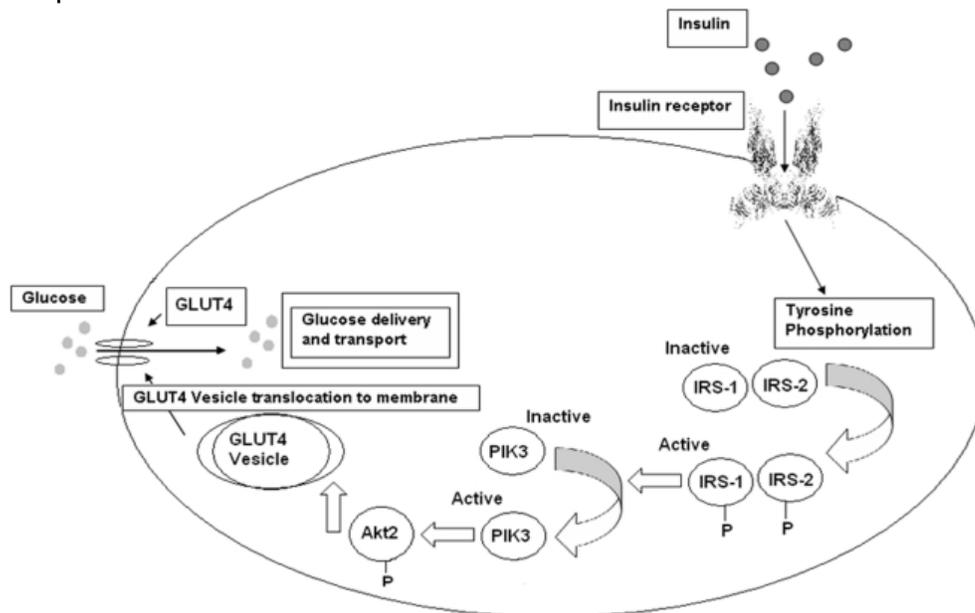
La traducción de proteínas comienza con la unión de la subunidad 40S a la estructura-5C' caperuza del mRNA para localizar el codón de inicio de la traducción de la proteína. Este proceso es facilitado por eIF4E con su unión al F4G y la formación de una unión estrecha con 4E-BP1. Siguiendo estímulos que promueven la síntesis de proteínas, mTOR actúa inhibiendo la fosforilación de 4E-BP1 en cualquiera de los siguientes residuos Thr37, Thr46, Thr70 o Ser65. Por lo que mitiga la inhibición de eIF4E y facilita la traducción de proteínas.

La cinasa p70S6 puede fosforilar la proteína ribosomal S6 la cual promueve la traducción de mRNA selectivos y contribuye a incrementar la síntesis de proteínas. En respuesta a la activación de mTOR, la cinasa p70S6 experimenta fosforilación sensible a la rapamicina en la Thr389 y Thr 421/424 que son importantes para la actividad de cinasa.

### 2.4.1 mTOR y la resistencia a la insulina

La insulina es una potente hormona anabólica y es esencial para el apropiado desarrollo de los tejidos, para el crecimiento y para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en todo el cuerpo. Esta hormona es secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas en respuesta a niveles circulantes elevados de glucosa y aminoácidos después de ingerir comida.

La insulina regula la homeostasis de la glucosa en varios sitios reduciendo la liberación glucosa hepática (vía inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis) e incrementando la captación de glucosa, principalmente en músculo esquelético y tejido adiposo.



**Figura 16. Vía de señalización de la insulina<sup>(39)</sup>**

La señalización TSC-mTOR-S6K1 atenúa la fosforilación de PI3K y la inhibición de las proteínas IRS tanto a nivel transcripcional como postraduccional mediante fosforilación directa. Es de ésta manera como la activación de la señalización mTOR-S6K1 induce una retroalimentación negativa para atenuar PI3K vía inhibición de IRS.<sup>(37)</sup>

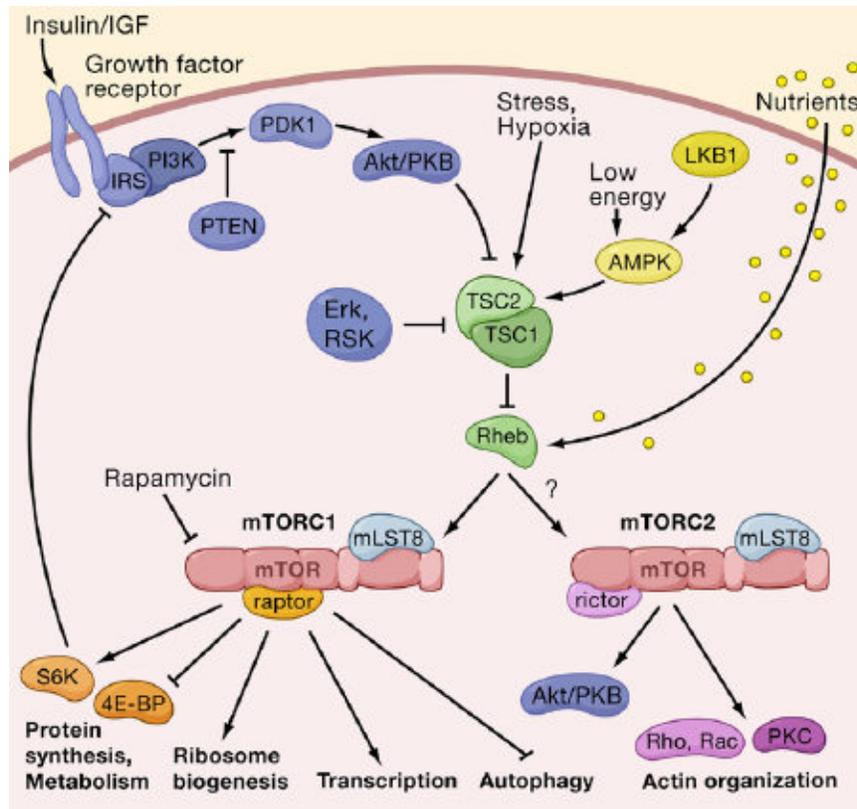


Figura 17. mTOR y la resistencia a la insulina<sup>(37)</sup>

#### 2.4.2 AMPK y mTOR

La síntesis de proteínas y la activación de mTORC son procesos consumidores de energía y por lo tanto la inhibición de síntesis de proteínas es un mecanismo adicional para conservar energía. Consistente con esto, se ha demostrado que la activación de AMPK inhibe la síntesis de proteínas en músculo esquelético, hígado y músculo cardíaco.

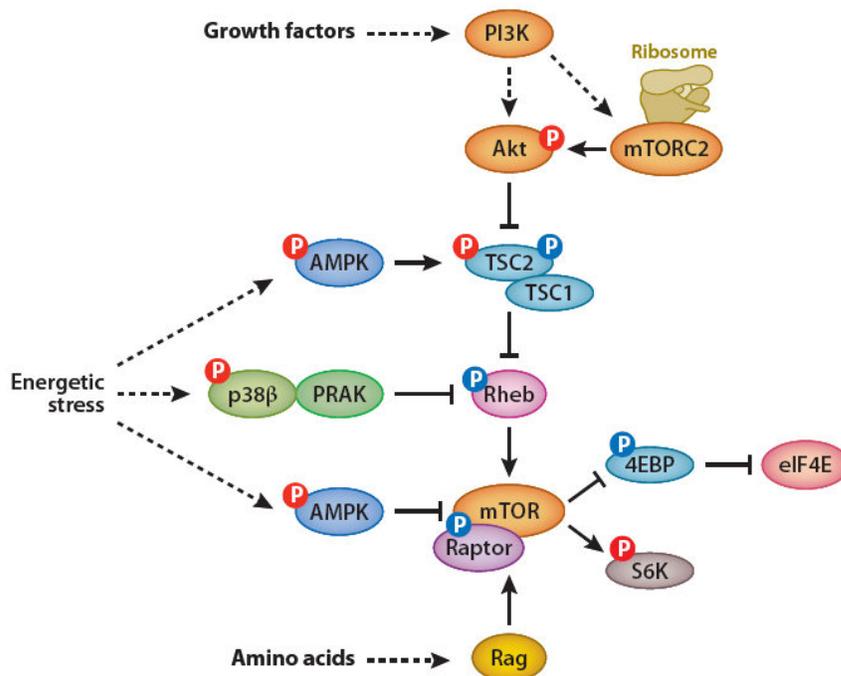
AMPK media esta inhibición por cuatro distintos mecanismos:

AMPK fosforila el complejo de esclerosis tuberoso (TSC) en la Ser 1387 el cual aumenta la actividad Rheb GAP resultando en la inhibición de la señalización de mTORC1.

Para que la síntesis de proteínas continúe ininterrumpida, mTOR en asociación con Raptor es obligatoria la formación del complejo mTORC1. Por otro lado ha

sido demostrado que AMPK también interrumpe la síntesis de proteínas por la fosforilación directa de mTOR, uniéndose a Raptor en la Ser722 y Ser792 permitiéndole así unirse proteínas 14-3-3 a este blanco de raptor degradarse y por lo tanto causar la inhibición del complejo mTOR. Fosforilando directamente el factor de elongación eucarionte cinasa 2 en la Ser 398 y por lo tanto activando esta cinasa.

AMPK modula la actividad de mTOR por la fosforilación inhibitoria directa en la Thr 2446 y así inhibiendo mTOR.



**Figura 18. Mecanismos de inhibición de mTOR por AMPK<sup>(12)</sup>**

Tomando en cuenta estos estudios muestran que AMPK juega un rol mayor en la regulación de la síntesis de proteínas por la influencia de múltiples vías involucradas en la regulación de la traducción.

Adicionalmente del rol de mTOR en el inicio de la traducción, también está envuelto en la biogénesis mitocondrial, ya que estudios provenientes de células de mamíferos han demostrado que la actividad de TOR está ligada a la disponibilidad de nutrientes para regular la biogénesis mitocondrial.

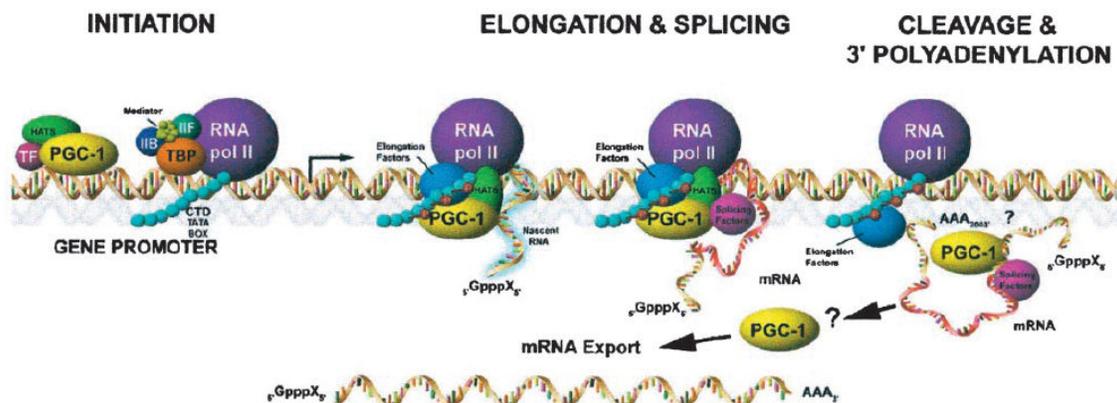
La biogénesis ribosomal las actividades coordinadas de las tres polimerasas (Pol I, Pol II y Pol III) y consume una gran cantidad del total de energía celular.

Un estudio reciente demostró que AMPK fosforila directamente a TIF-IA en la Ser 635 e inhibe la síntesis de rRNA, destacando una interacción de AMPK y mTOR a nivel de la transcripción. <sup>(27,32)</sup>

## 2.5 Coactivador 1 alfa del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PGC1-alfa)

La familia de los coactivadores PGC-1 (PPAR $\gamma$  coactivador-1) es una integrante de las vías de señalización celular, el control celular y el metabolismo sistémico.

Los coactivadores PGC-1 tienen un papel importante en la regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial, mantenimiento de la glucosa, lípidos y en la homeostasis energética. Tienen una potente actividad transcripcional unida a dominios heterólogos de ADN o cuando se unen a un factor transcripcional mientras que no se han encontrado codificando ninguna actividad histona aciltransferasa (HAT). En su secuencia primaria, se unen a proteínas en su región N-terminal, incluyendo CBP, p300 y SRC-1. Estas proteínas acetilan histonas y remodelan la estructura de la cromatina permitiendo el acceso de factores adicionales para la activación de genes.



**Figura 19. Modelo de cómo PGC-1 alfa media la activación de genes.** (43)

Muchos procesos biológicos son controlados a nivel de transcripción de genes por la unión de factores de transcripción. Estudios recientes han revelado un modelo de regulación por proteínas coactivadoras conocidas como la familia de coactivadores PGC1. Estos factores son altamente sensibles a una variedad de factores ambientales como la temperatura, el estatus nutricional o la actividad física y coordinadamente regulan las vías metabólicas y procesos biológicos de una manera tejido específica.

Notablemente los coactivadores juegan un papel crítico en el mantenimiento de la glucosa, lípidos y homeostasis energética y están involucrados en condiciones patológicas como obesidad, diabetes, neurodegeneración y cardiomiopatías.

### **2.5.1 PGC-1alfa y AMPK**

PGC-1 alfa es un integrador del circuito regulatorio de involucrado en el control transcripcional del metabolismo energético celular, incluyendo función y biogénesis mitocondrial.

Existen varios mecanismos que explican cómo es que AMPK impacta en PGC-1 alfa. AMPK puede fosforilar directamente a PGC1 alfa en la Thr 177 y en la Ser 538 en ensayo in vitro. La fosforilación de PGC-1 alfa puede no afectar directamente su actividad intrínseca como coactivador pero se libera de su proteína represora p160 myb y/o permite la desacetilación y subsecuente activación por SIRT1<sup>(33)</sup>

### **2.5.2 REGULACIÓN DEL METABOLISMO OXIDATIVO MITOCONDRIAL**

PGC-1 alfa coactiva factores transcripcionales como NRF-1 y NRF-2 y los receptores hormonales nucleares como PPAR $\alpha$  y PPAR $\beta$ , ERR $\alpha$  y TR. Todos estos factores regulan directamente la expresión de ciertos genes codificadores nucleares mitocondriales.

NRF-1 y 2 son blancos de PGC-1 $\alpha$  y son capaces de estimular la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) una proteína de la matriz mitocondrial esencial para la replicación y transcripción del ADN mitocondrial. La estimulación mitocondrial por PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  que codifican genes mitocondriales codificados por los dos genomas permitiendo así incrementar la capacidad enzimática para la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Importantemente, PGC-1 $\alpha$  y  $\beta$  induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del grupo heme, transporte de iones, traducción mitocondrial e importe de proteínas y pueden estimular la biogénesis mitocondrial e incrementar la función respiratoria.

La pérdida de PGC-1 $\alpha$  desencadena en una deficiente funcional significativa en el metabolismo oxidativo en múltiples tejidos y representa intolerancia al ejercicio.

### **2.5.3 PGC1 alfa EN HÍGADO**

La expresión de PGC1 alfa en hígado es inducida en el nacimiento y en un hígado adulto seguido de un ayuno. La transición de un estado alimentado a uno ayunado involucra distintos cambios metabólicos en el hígado para facilitar la adaptación del organismo a la privación de nutrientes. Estos cambios incluyen la activación de la gluconeogénesis,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la síntesis y secreción de cuerpos cetónicos. Un cambio en la utilización de glucosa a ácidos grasos y cetonas por los tejidos periféricos es crítico para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sistémica y la supervivencia de los organismos en periodos de escasez.

Estudios en cultivos de hepatocitos e in vivo han demostrado que PGC-1 alfa es suficiente para activar casi todos los aspectos de la respuesta al ayuno hepático, incluyendo gluconeogénesis,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, cetogénesis y homeostasis ácido biliar.

Ha sido demostrado ampliamente que PGC-1 alfa coactiva diversos factores transcripcionales en distintos tipos celulares (**Tabla 6**). Es altamente improbable que estas vías sean activadas simultáneamente en la presencia de PGC-1 alfa. Es posible que la disponibilidad de los ligandos y modificaciones postraduccionales de los factores de transcripción y/o PGC1 pudiera contribuir a promover selectivamente.

**Tabla 6. Blancos de factores transcripcionales de PGC1 alfa**

Blancos de los Factores de Transcripción de PGC-1 alfa		Función
NRF-1	+	Genes mitocondriales
NRF-2	+	Oxidación de ácidos grasos
PPAR $\alpha$	+	Oxidación de ácidos grasos
PPAR $\beta/\delta$	+	Inducción UCP1/GyK
ERR $\alpha, \beta, \gamma$	+	Genes mitocondriales
TR $\beta$	+	Inducción de Cpt-1
LXR $\alpha, \beta$	+	Secreción de lipoproteínas
FXR	+	Metabolismo de triglicéridos
GR	+	Gluconeogénesis
Sox9	+	Condrogénesis
MEF2	+	Genes de fibra lenta
FOXO1	+	Gluconeogénesis
HNF4 $\alpha$	+	Gluconeogénesis

#### **2.5.4 PGC-1 EN CORAZÓN**

PGC1-alfa es altamente expresado en corazón, un órgano con una demanda extremadamente alta de ATP. Donde mucho de este suministro proviene de la oxidación de ácidos grasos aunque la glucosa también puede ser usada como sustrato para la oxidación mitocondrial. Y existen muchos estudios que señalan a PGC-1 alfa como un regulador crucial del metabolismo oxidativo mitocondrial en el corazón. La expresión transgénica de PGC1alfa en corazones de ratones ocasiona una biogénesis mitocondrial aumentada que el aparato contráctil es desplazado, lo cual resulta en una cardiomiopatía dilatada.<sup>(34)</sup>

#### **2.5.5 PGC 1 alfa EN ME**

La habilidad de PGC1-alfa para controlar múltiples vías en un complejo programa biológico es también ilustrado en músculo esquelético. En este caso, PGC-1 alfa funciona como un “*rheostat*” sensitivo que responde a la entrada neuromuscular y a la actividad contráctil.

Ha sido demostrado que AMPK es requerido para inducir la expresión de PGC-1alfa aunque los blancos transcripcionales de la acción de AMPK sobre el promotor de PGC1alfa aun no están claros.

Importantemente la expresión transgénica de PGC1alfa en fibras musculares de contracción rápida en ó cerca de los niveles fisiológicos permiten la activación de programas genéticos característicos de fibras musculares de acción lenta. El músculo esquelético de estos ratones es resistente-fatiga inducida indicando un cambio de funcionalidad del tipo de fibras musculares por PGC1 alfa.

PGC-1 alfa es capaz de de acoplar las armas metabólicas y contráctiles de fibras musculares y transforma la funcionalidad de fibras de contracción rápida en más oxidativas fibras de contracción lenta.<sup>39)</sup>

### **2.5.6 PGC-1alfa EN TEJIDO ADIPOSO**

El rol fisiológico mayor del tejido adiposo blanco es como almacén de grasa para suministrar energía proveniente de los lípidos cuando es necesaria por otros tejidos. Esto se logra por una vía altamente regulada a través de la cual los triglicéridos almacenados en los adipocitos son hidrolizados y los ácidos grasos liberados al plasma.

Recientemente muchos estudios centran su atención en la regulación de la biogénesis mitocondrial en el tejido adiposo. En gran medida por el papel de la mitocondria del tejido adiposo en la regulación del metabolismo de los combustibles en todo el cuerpo. Un ejemplo de esto se presenta en un modelo de ratones con resistencia a la insulina y diabetes tipo II donde el contenido mitocondrial en el tejido adiposo se encuentra disminuido.

La sobreexpresión de PGC-1 alfa en el tejido adiposo desencadena en un incremento en la expresión de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y de enzimas envueltas en la oxidación de ácidos grasos.

Por otro lado existen estudios donde correlacionan la expresión de mRNA de PGC-1 alfa con la sensibilidad de todo el cuerpo a la insulina. Colectivamente estos descubrimientos destacan la importancia de PGC-1 alfa en el tejido adiposo.

El proceso de la biogénesis mitocondrial involucra la regulación coordinada tanto de genes nucleares como mitocondriales. Un importante participante en este proceso es PGC1-alfa en músculo esquelético o adipocitos blancos inducen la biogénesis mitocondrial, mientras la delección de este gen desencadena en la reducción del contenido mitocondrial.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

México como otros países, se encuentra experimentando una transición epidemiológica que presenta grandes retos al sistema de salud y a la sociedad. A principios del siglo pasado, las primeras causas de mortalidad se relacionaban con causas infecciosas y parasitarias, materno-infantil y deficiencias alimentarias. Sin embargo, en la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles como el síndrome metabólico comenzaron a cobrar importancia y sus complicaciones se han convertido en la primera causa de mortalidad en el país. <sup>(1)</sup>

Dado que este tipo de enfermedades crónicas metabólicas conllevan un desbalance de los sistemas reguladores de la homeostasis energética y éstos participan más activamente en diversos sistemas celulares como adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos y miocitos esqueléticos, resulta indispensable entender la biología fundamental del balance energético, particularmente en un sistema clave del control de las enzimas que modulan la homeostasis energética celular como la cinasa dependiente de AMP(AMPK), en los tejidos antes mencionados para descubrir nuevos enfoques de abordaje terapéutico de las enfermedades metabólicas como el síndrome metabólico.

Se propone también investigar los efectos del tratamiento con metformina sobre la vía de señalización de esta proteína, evaluando la expresión de genes involucrados en la homeostasis energética, lo cual ayudaría a comprender el papel de AMPK como regulador energético y la participación de su desregulación en el desarrollo de síndrome metabólico.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos del tratamiento con la metformina en la expresión de genes que participan en la vía de señalización de AMPK y de esta misma en diferentes tejidos de ratas con síndrome metabólico.

##### **Objetivos particulares**

1. Inducir el síndrome metabólico en ratas mediante una dieta alta en carbohidratos.
2. Evaluar los cambios en la expresión de mTOR, PGC1, AMPK (alfa1 y alfa2), asociados al síndrome metabólico mediante la técnica de qRT-PCR.
3. Evaluar si la activación de AMPK por el tratamiento con metformina de las ratas con síndrome metabólico revierte las alteraciones en la expresión de mTOR, PGC1alfa, AMPK alfa1 y alfa2, mediante la técnica de qRT-PCR.

## **5. HIPÓTESIS**

EL síndrome metabólico altera la expresión de genes relacionada con la vía AMPK. El tratamiento con metformina, el cual es ampliamente usado en enfermedades crónicas metabólicas, tiene un efecto sobre la activación de AMPK, por lo que este fármaco podría tener un efecto restablecedor en la expresión de estos genes.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Ratas con síndrome metabólico

A 10 ratas Wistar machos de 200-250g se les indujo el síndrome metabólico mediante alimentación con una dieta alta en carbohidratos que contenía 30% de sacarosa en el agua de beber *ad libitum*, la cual les fue administrada durante 16 semanas. Finalizado este tiempo, se les cuantificaron los triglicéridos en sangre con el instrumento Accutrend GCT mediante el uso de tiras reactivas.

A 5 ratas con síndrome metabólico se les administró Metformina vía oral (100mg/kg) hasta encontrar una disminución significativa en sus niveles de triglicéridos sanguíneos.

Otras 5 ratas fueron utilizadas como control y se alimentaron con una dieta sin sacarosa al 30% en el agua de beber.

Para analizar el efecto sobre la expresión de genes, las ratas fueron sacrificadas por una sobredosis de pentobarbital i.p e inmediatamente se extrajeron con la mayor rapidez posible sus diferentes tejidos: tejido adiposo, hepático, muscular cardíaco y esquelético, los cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 C hasta su análisis. Aunado a la extracción, se pesó únicamente el tejido adiposo proveniente de los cojinetes retroperitoneales para cuantificar el incremento en grasa visceral y se extrajo sangre periférica la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener suero, el cual se guardó a -70 para análisis bioquímicos.

## 6.2 Extracción de RNA

La extracción del RNA total para el análisis de expresión genética de los diferentes tejidos de rata: adiposo, hepático, muscular cardiaco y esquelético se llevo a cabo utilizando el reactivo Trizol (gibco) siguiendo las instrucciones del fabricante. <sup>(24)</sup>

El procedimiento constó de 4 fases:

1) Fase de homogenización. Los diferentes tejidos fueron homogenizados con el reactivo Trizol mediante el uso del equipo politrón.

2) Fase de separación. Después de la homogenización se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente para después adicionarles 0.2 mL de cloroformo por cada ml de Trizol; se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos, y se centrifugaron a 12 000 g X 15 minutos a 4°C, y al final se obtuvieron dos fases (orgánica y acuosa)

3) Fase de precipitación. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al cual se le añadió 0.5 mL de alcohol isopropílico por cada mL de Trizol, las muestras se incubaron de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y después fueron centrifugadas a 12 000 g X 10 minutos a 4°C.

4) Fase de lavado. Se removió el sobrenadante y al “*pellet*” se le adicionó 1 mL de etanol al 75%, se mezclaron las muestras en un vortex y se centrifugo a 7,500g X 10 minutos a 4°C.

5) Cuantificación. El RNA total obtenido se cuantificó mediante el uso del nanodrop 1000 Spectrophotometer.

6) El RNA se purificó (cuando fue necesario) con el kit RNeasy de QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA) para eliminar la contaminación con DNA genómico y proteínas y se volvió a cuantificar en el nanodrop 1000 Spectrophotometer.

### **6.3 Análisis por qRT-PCR <sup>(24)</sup>**

El DNA complementario fue generado por retrotranscripción utilizando la enzima M-MLV Transcriptasa Reversa (Invitrogen) y hexámeros al azar (desoxi-NTP6) (Amersham Bioscience), empleando el protocolo establecido para la enzima M-MLV Transcriptasa Reversa y utilizando el equipo Perkin Elmer 2400 Geneamp PCR System.

Cada muestra fue de 1 ng de RNA total, 1  $\mu$ L de oligos (desoxi-NTP6), 250 ng de random primers y 13  $\mu$ L de agua grado biología molecular. Se calentaron las mezclas de reacción a 65°C por 5 min en un termociclador e inmediatamente se recolectaron en hielo. Posteriormente se adicionaron 4  $\mu$ L de “*First Strand Buffer*” y 2 $\mu$ L de DTT. Se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 5 minutos y por último se agregaron 20  $\mu$ L de la enzima M-MLV RT; la muestra se incubó a 25°C por 10 minutos, seguido de una incubación a 37°C por 50 minutos, al final se detuvo la reacción calentando las muestras a 70°C.

El cDNA resultante fue utilizado como templado para la amplificación por PCR.

El análisis de expresión relativa se llevó a cabo por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando el método descrito por Applied Biosystems y mediante el uso de sondas TaqMan. La expresión de cada RNA mensajero fue examinado y normalizado con el RNA ribosómico (rRNA) 18S con el método  $2^{-\Delta CT}$ . La reacción se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (7000 SDS instrument).

#### **Análisis Estadístico**

El análisis para establecer los cambios de expresión genética con significancia estadística entre los grupos control y experimentales fue con la prueba ANOVA de una vía.

**Tabla 7. Tabla de sondas TaqMan.**

<b>Sonda</b>	<b>Nombre del gene</b>	<b>Símbolo del gene</b>
<b>Rn00569558_m1*</b>	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	Prkaa1
<b>Rn00576935_m1*</b>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit	Prkaa2
<b>Rn00580241_m1*</b>	PGC-1 alpha peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Ppargc1a
<b>Rn00571541_m1*</b>	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Mtor

#### **6.4 Determinación de leptina sérica**

La determinación de leptina sérica se realizó a partir de suero, por medio del ALPCO Immunoassays, Leptin (Mouse and Rat) High Range ELISA, realizado mediante un formato tipo sandwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una microplaca de 96 tubos, después de haber detenido la reacción la microplaca se coloca en un módulo de luminiscencia Turner Biosystems.

#### **6.5 Determinación de adiponectina sérica**

La determinación de adiponectina sérica se realizó a partir de suero, por medio del ALPCO Immunoassays, Adiponectin (Rat) High Range ELISA, realizado mediante un formato tipo sandwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una microplaca de 96 tubos, después de haber detenido la reacción la microplaca se coloca en un modulo de luminiscencia Turner Biosystems.

## **6.6 Determinación de glucosa sérica**

La determinación de Glucosa sérica se realizó a partir de suero, por medio Kit enzimático de glucosa oxidasa SIGMA GAGO-20, donde la glucosa es oxidada a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la glucosa oxidasa, el peróxido de hidrogeno reacciona con el o-dianisidino en presencia de la peroxidasa y produce un producto colorido (café).

El o-dianisidinoóxidado reacciona con el ácido sulfúrico y forma un producto con un color más estable. El color rosa intenso se mide en el espectrofotometro a 540 nm y es proporcional a la concentración de glucosa.

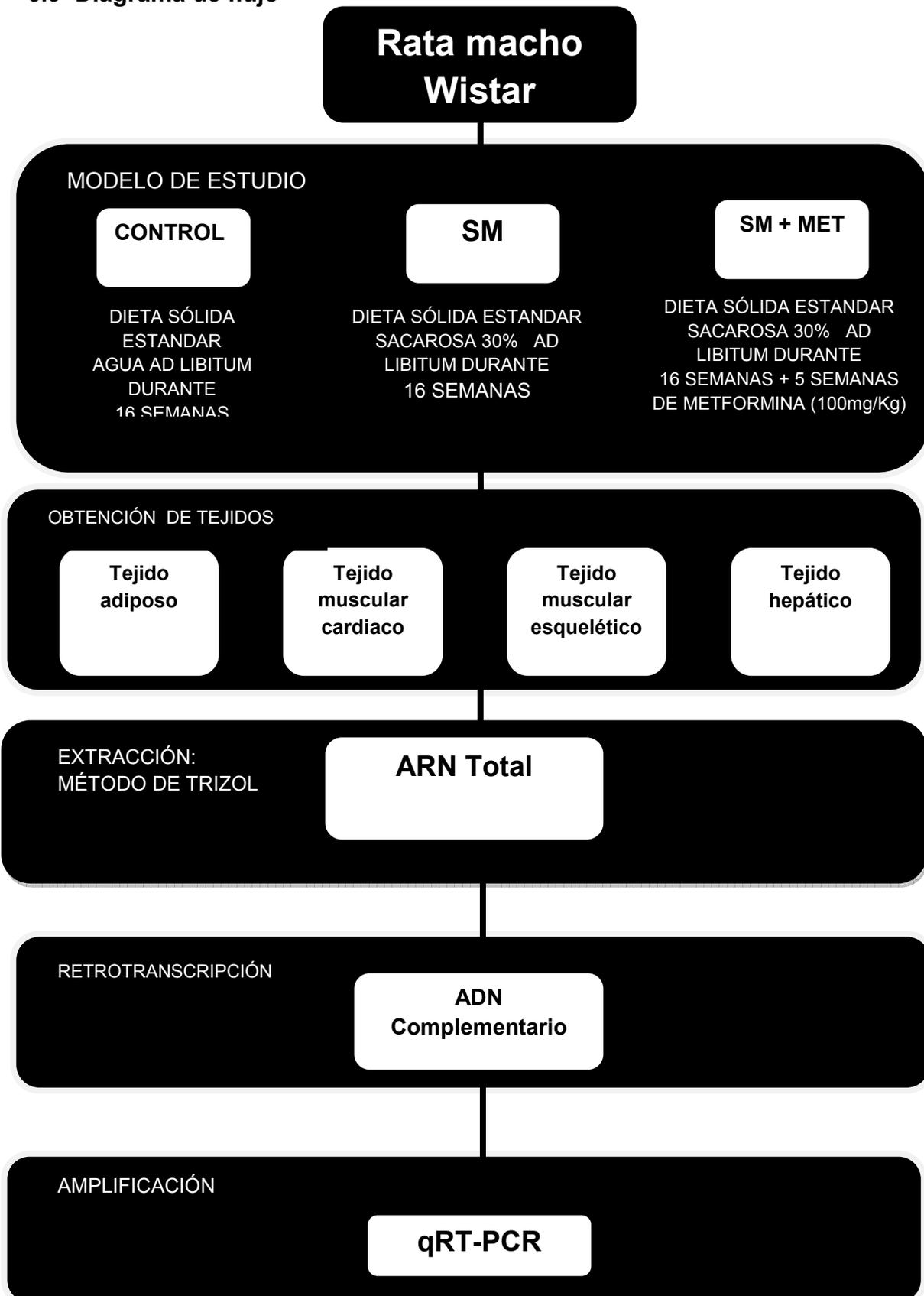
## **6.7 Determinación de insulina sérica**

La determinación de insulina sérica se realizó a partir de suero, por medio del ALPCO Inmunoassays, Insulin (Rat) High Range ELISA, Cat 80-INSRTH-E01,E10 realizado mediante un formato tipo zandwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una microplaca de 96 tubos, después de haber detenido la reacción la microplaca se coloca en un modulo de luminiscencia Turner Biosystems.

## **6.8 Determinación de triglicéridos sanguíneos**

La determinación de triglicéridos se realizó por punción de la cola y con el instrumento Accutrend GCT Cat No. 04451660001 mediante el uso de tiras reactivas, donde cada tira reactiva tiene una zona reactiva que contiene los indicadores. Cuando se aplica sangre se produce una reacción química y la zona reactiva cambia de color. El instrumento registra este cambio de color y convierte la señal de medición en el resultado mostrado utilizando los datos previamente introducidos mediante la tira de codificación.

## 6.9 Diagrama de flujo



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características del modelo de rata con síndrome metabólico

Al término de las 16 semanas de dieta se cuantificaron diversos parámetros de los grupos Control y SM, después de 5 semanas más se cuantificaron estos mismos parámetros en el grupo SM+Met.

**Tabla 8. Características del modelo de rata con Síndrome Metabólico.**

Variable	Control 16 semanas de agua ad libitum	SM 16 semanas de sacarosa al 30% ad libitum	SM + Met 16 semanas de sacarosa al 30% ad libitum + 5 semanas de metformina (100mg/dL)
Incremento de peso (g)	188.38 ± 24.8 n=25	175.48 ± 25.15 n=50	162.05 ± 13 n=10
Gasa abdominal (g)	7.27 ± 2.6 n=25	*16.19 ± 4 n=50	*,^11.25 ± 0.7 n=10
% Grasa abdominal	1.7 ± 0.4 n=25	*3.52 ± 1.6 n=50	^2.54 ± 0.64 n=10
Adiponectina (ng/mL)	0.98 ± 0.32 n=9	*1.61 ± 0.44 n=10	*1.51 ± 0.46 n=9
Triglicéridos (mg/dL)	115.2 ± 13.3 n=9	*238.2 ± 53 n=10	*,^152.5 ± 3.54 n=9
Leptina (pg/mL)	238.8 ± 33.30 n=9	*572.1 ± 30.2 n=10	*,^278.6 ± 33.9 n=9
Glucosa (mg/dL)	132.1 ± 5.5 n=9	131.3 ± 9.1 n=10	*, ^ 115.7 ± 9.4 n=9
Insulina (ng/mL)	5.64 ± 0.38 n=9	*9.20 ± 0.25 n=10	^6.24 ± 0.47 n=9

Tabla 8. En esta tabla se muestran parámetros bioquímicos relacionados con el síndrome metabólico y el efecto del tratamiento con metformina en estos mismos parámetros. Donde las alteraciones de estos parámetros bioquímicos que se presentan en el modelo de SM, son revertidas o muestran una tendencia a revertirse con el tratamiento con metformina.

\*p ≤ 0.05 : vs Control

^p ≤ 0.05 : vs SM

ANOVA de 1 vía Comparación múltiple Newman-Keuls

HOMA IR = (Glucosa mmol/L x Insulina ng/mL) / 22.5

## 7.2 Cambios en la expresión de genes en Tejido Muscular Cardíaco

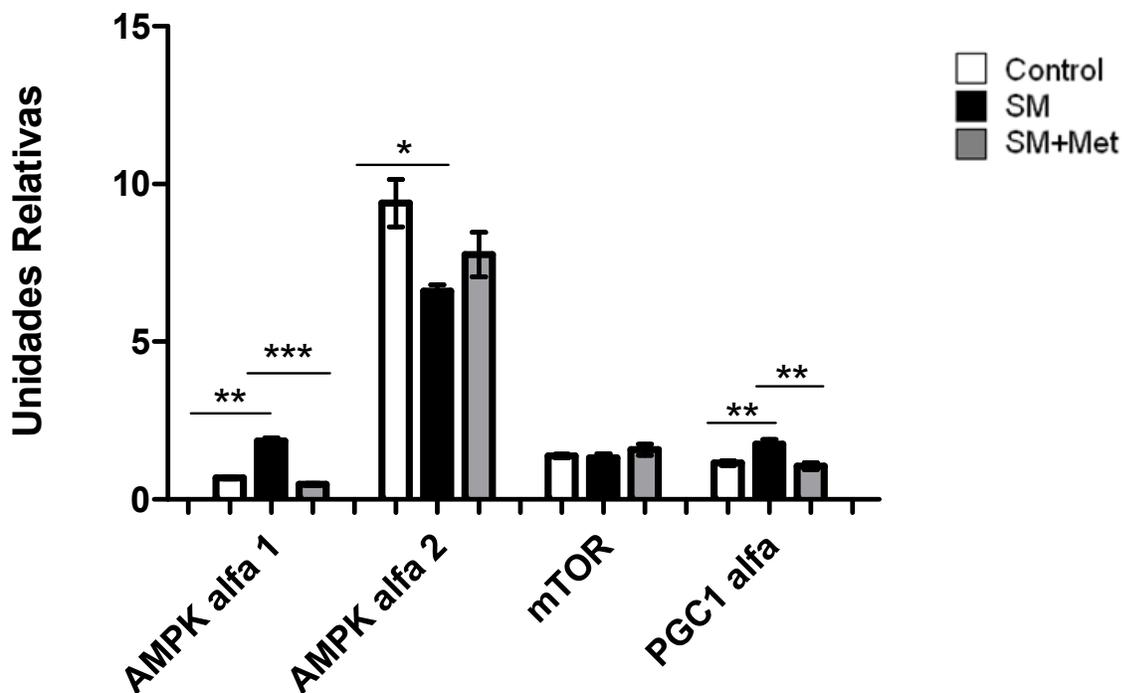


Figura 19. Expresión de genes codificantes para AMPK alfa1, alfa2, mTOR y PGC-1alfa en tejido muscular cardíaco. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.05$ )

En el tejido muscular cardíaco las isoformas catalíticas de AMPK en el síndrome metabólico se vieron afectadas de manera contraria, aumentó la expresión de la isoforma alfa 1 y se redujo la de alfa 2, aumentó la expresión de PGC1 alfa y mTOR no presentó cambios en el síndrome metabólico con respecto al control.

El tratamiento con metformina restableció los niveles de expresión de los genes codificantes de la isoforma catalítica alfa 1 de AMPK y PGC1 alfa, que habían sido alterados por el Síndrome metabólico, lo cual no se alcanzó con la isoforma alfa 2 de la AMPK; aunque se observa una tendencia a restablecerla, sin embargo no es significativa.

### 7.3 Cambios en la expresión de genes en Tejido Muscular Esquelético

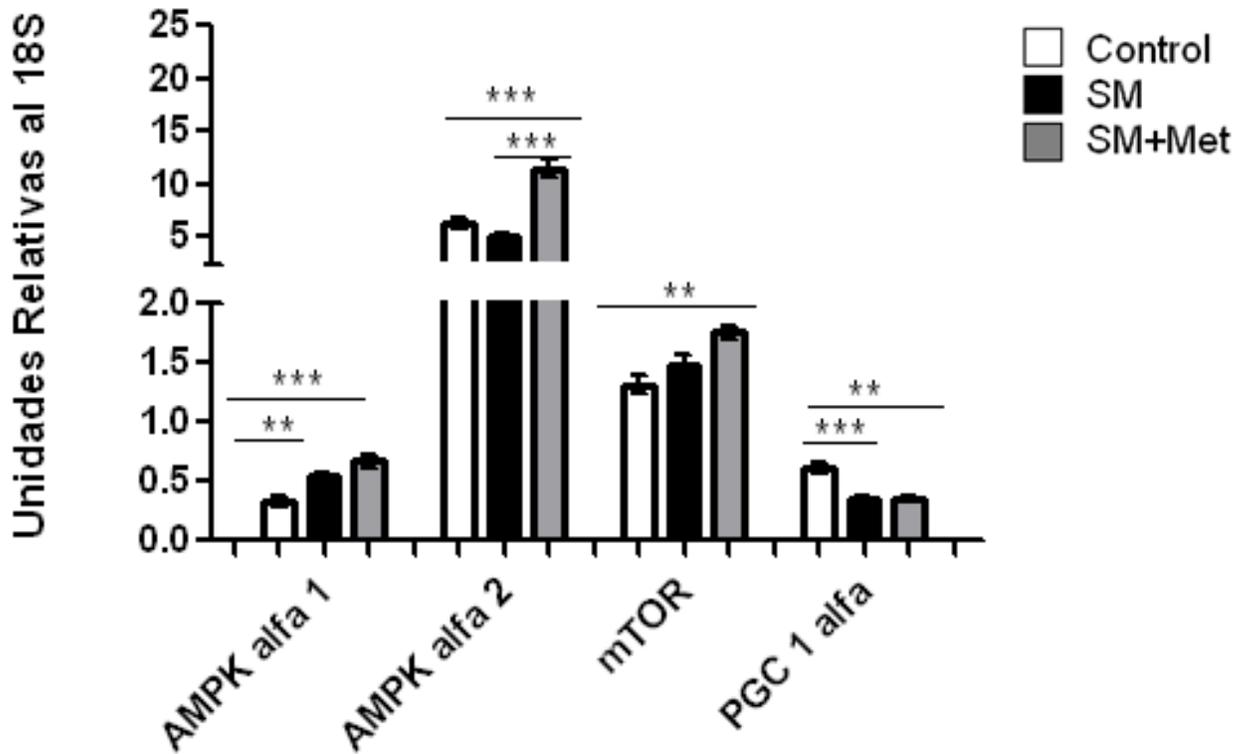


Figura 21. Expresión de genes codificantes para AMPK alfa1, alfa2, mTOR y PGC-1alfa en tejido muscular esquelético. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.05$ )

En el músculo esquelético la expresión únicamente se vio alterada por el síndrome metabólico en la isoforma alfa 1 de AMPK y en PGC-1 donde la isoforma alfa 1 de AMPK aumentó casi al doble y en PGC1alfa disminuyó prácticamente a la mitad respecto al control. En el caso de la isoforma alfa 2 de AMPK y mTOR no se vio alterada. El tratamiento con metformina mostró únicamente en PGC1 alfa una tendencia a revertir esta alteración causada por el síndrome metabólico, sin embargo no es significativa. Interesantemente, con el tratamiento de metformina la isoforma alfa 2 de AMPK aumentó su expresión comparado con el grupo con síndrome metabólico e incluso con el grupo control. Por último la isoforma alfa 1 y mTOR no se vio alterada por el tratamiento con metformina, sin embargo existe una ligera tendencia a revertir esta alteración aunque sin ser significativa.

#### 7.4 Cambios en la expresión de genes en Tejido Adiposo

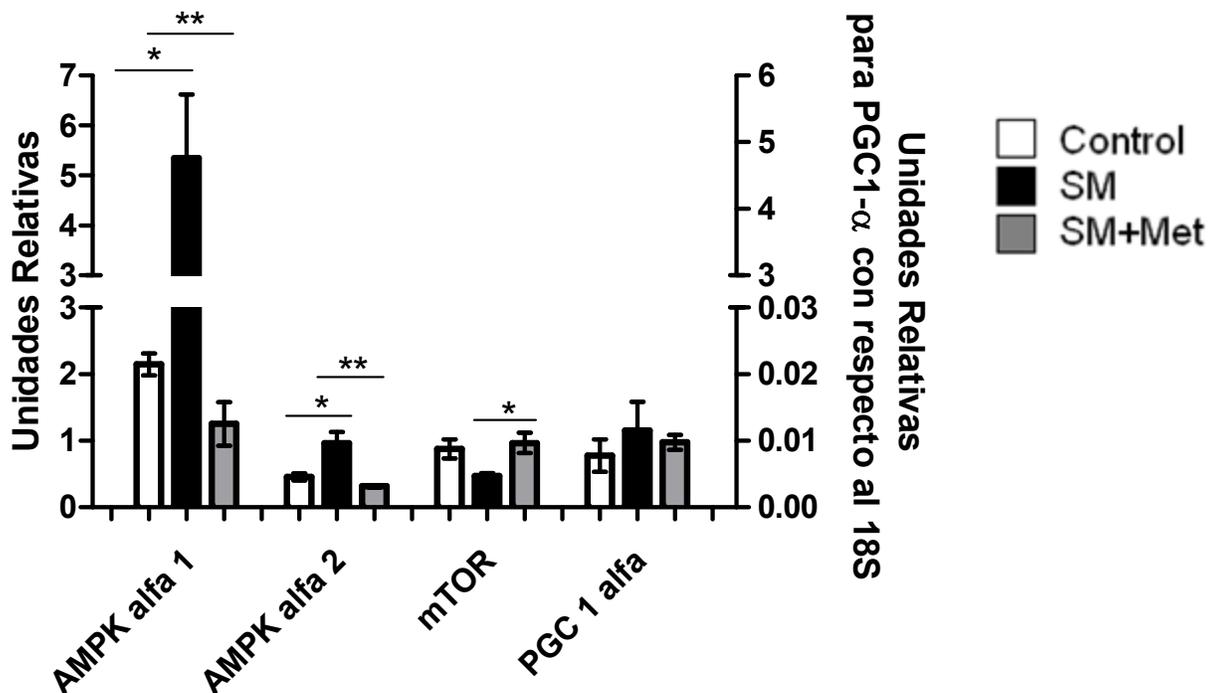
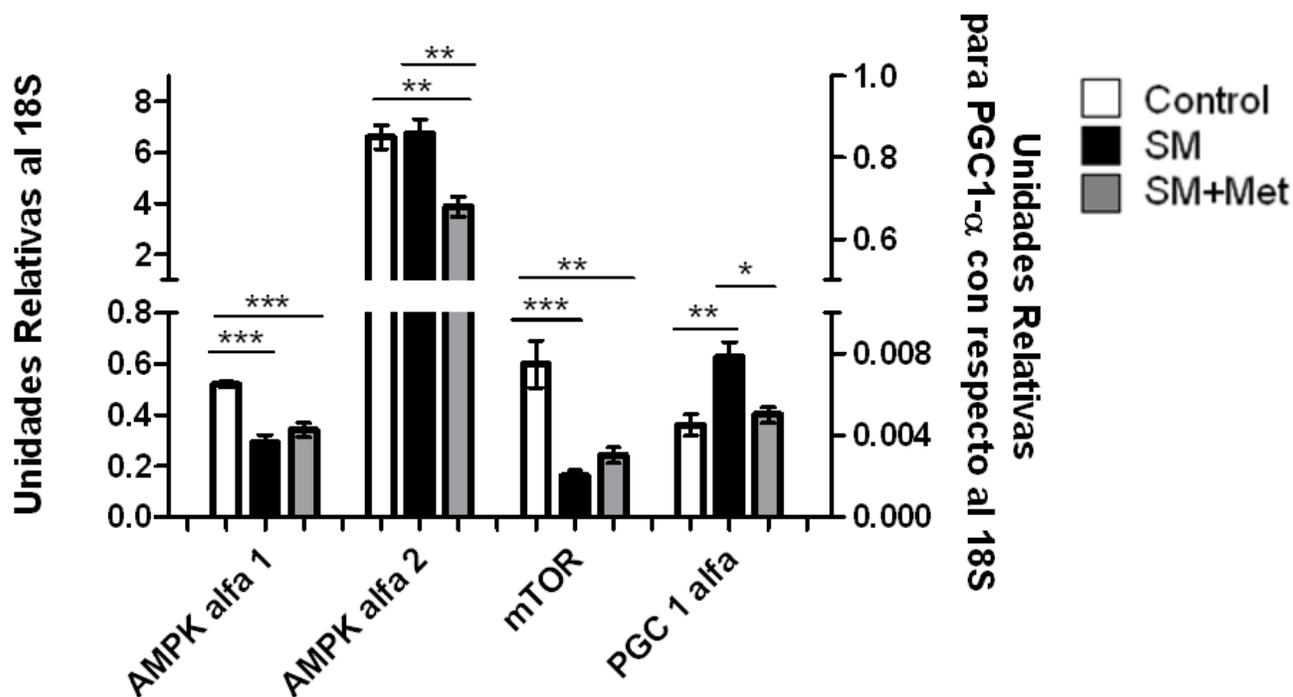


Figura 22. Expresión de genes codificantes para AMPK alfa1, alfa2, mTOR y PGC-1alfa en tejido adiposo. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)

El tejido adiposo es el único en donde la inducción de síndrome metabólico con sacarosa, modificó la expresión de ambas isoformas de AMPK, aumentando su expresión tres y dos veces respectivamente. Por el contrario, la expresión de mTOR en tejido adiposo disminuyó casi a la mitad, aunque no significativamente y la expresión de PGC1 alfa no presentó cambio alguno.

En este tejido el tratamiento con metformina restableció todos los cambios presentes en el síndrome metabólico. Y en PGC 1 alfa no causó alteración alguna.

## 7.5 Cambios en la expresión de genes en Tejido Hepático



**Figura 20. Expresión de genes codificantes para AMPK alfa1, alfa2, mTOR y PGC-1alfa en tejido hepático. (\*p< 0.05, \*\*p< 0.05, \*\*\*p< 0.05)**

El síndrome metabólico redujo la expresión de la isoforma catalítica alfa 1 de AMPK y de mTOR, a diferencia de PGC1 alfa, que como puede observarse aumento su expresión cerca de dos veces con respecto al control. Por el contrario, la isoforma alfa 2 de la AMPK no se vio alterada. También puede observarse que con el tratamiento de metformina, la expresión de PGC1alfa se restableció a los valores de las ratas control, así como en el caso de mTOR, donde se muestra una tendencia a restablecer estas alteraciones, sin embargo, no es significativa. Sorprendentemente en el caso de la isoforma catalítica alfa 2 de la AMPK, la expresión de su gen se redujo en el grupo de SM que recibió el tratamiento de metformina, en comparación con el grupo con síndrome metabólico e incluso que el grupo control. En cambio, para la isoforma alfa 1 no produjo ningún cambio.

## 8. DISCUSIÓN

De acuerdo con la definición de SM que involucra una agrupación de anomalías tanto antropométricas como bioquímicas, parte de estos parámetros están incluidos en la Tabla 8. Características del modelo de rata con Síndrome Metabólico. Que de acuerdo a las diversas definiciones proponen un aumento en los triglicéridos, en la leptina, en una condición hiperinsulinemia y un incremento de la grasa visceral lo cual coincide con este modelo de SM.

En nuestro modelo también encontramos ciertas diferencias respecto a parámetros comúnmente asociados a síndrome metabólico, como en el peso total del animal y los valores de glucosa sanguínea, los cuales no presentaron cambios. De manera importante, la adiponectina la cual es una hormona que se sabe que se encuentra disminuida en esta condición, en nuestro modelo se encontró aumentada, lo cual podría indicar una respuesta temprana del organismo para contrarrestar los cambios metabólicos que se están llevando a cabo, o bien el inicio de un desarrollo de resistencia a la respuesta de esta hormona, lo cual se ha también encontrado en pacientes con algunas características de síndrome metabólico pero que se consideran “saludables” por no cursar todavía con los criterios estándares.<sup>(49)</sup>

El tratamiento con metformina en general mostró una tendencia a revertir las alteraciones ocasionadas en el SM, logrando como en el caso de la insulina llevarla hasta los niveles del grupo control y aunque los demás parámetros no se revertieron por completo la tendencia es a revertir estas alteraciones.

Esto correlaciona con la expresión de los genes medidos, la tendencia a revertir las alteraciones a nivel de expresión se presentan también en el grupo tratado con metformina.

## 8.1 Cambios en la expresión de genes en Tejido Muscular Cardíaco

En cuanto al metabolismo de la glucosa, AMPK ocasiona un aumento en la captación de ésta, lo cual al encontrar una disminución en la expresión de la isoforma alfa 2 que es la más abundante en corazón, pudiera sugerir una disminución en el metabolismo de tipo glucolítico, aunado a esta alteración en el metabolismo del tipo glucolítico, se ha propuesto por Zarrinpashneh et al,<sup>(50)</sup> que alfa dos es requerido para una respuesta metabólica del corazón en una condición de isquemia, lo que sugiere un papel cardioprotector de esta isoforma lo que aconteció en los resultados fue una disminución en la expresión de la isoforma alfa 2 de la AMPK, lo que sugiere que este efecto cardioprotector se está siendo mitigado por el SM y con el tratamiento con metformina hay una tendencia a revertir esta alteración.

Por lo que respecta PGC1 alfa, se ha demostrado que estimula la expresión de genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos en células cardiacas y su inducción está asociada con un incremento en la oxidación de ácidos grasos en corazón según Pere Puigserver y Bruce M. Spiegelman.<sup>(43)</sup> En nuestros resultados es apreciable un aumento en la expresión de PGC1alfa lo que correlaciona con el aumento en la expresión catalítica de AMPK alfa 1, que estaría indicando un aumento en el metabolismo oxidativo en función de la oxidación de ácidos grasos, lo cual es congruente con la preferencia del corazón con este tipo de sustratos. Además, se ha encontrado un aumento en la actividad de esta cinasa en corazones con hipertrofia cardiaca, donde se supone que esta activación es una respuesta compensatoria al restablecimiento del balance energético.

## 8.2 Cambios en la expresión de genes en Tejido Muscular Esquelético

En ME la actividad aumentada de la isoforma alfa 1 de la AMPK está relacionada con una disminución en la captación de ácidos grasos así como de su oxidación, según Lindsey D. Bogachus et al,<sup>(23)</sup> donde atribuyen una disminución en la captación de palmitato y en su oxidación a consecuencia de activar preferentemente a la isoforma alfa 1 de AMPK. Al comparar estos resultados con el modelo de SM que usamos se observa un aumento en la expresión de la isoforma alfa 1 de AMPK y una disminución de la expresión de PGC-1 alfa, lo cual está relacionado con la biogénesis mitocondrial y por consiguiente con un metabolismo más oxidativo. En relación al metabolismo oxidativo de los ácidos grasos, es probable que exista una disminución en el SM y que la metformina a pesar de que activa a AMPK, en ME no ocasionó cambio alguno en la expresión de estos genes. Al parecer esta condición se mantiene a pesar de una supuesta activación de AMPK alfa 1 por el tratamiento con metformina.

La activación de AMPK en ME resulta en un mayor incremento en la captación de glucosa y este efecto se pierde en ausencia de la isoforma catalítica alfa 2 según (Barnes BR y col.). Al comparar nuestros resultados, nosotros encontramos que la isoforma catalítica alfa 2 no presenta cambios evidentes con el SM, sin embargo, con el tratamiento con metformina hay un aumento en la expresión de la isoforma alfa 2, lo cual sugiere un aumento en la captación de glucosa por este tejido. Esto aunado a la disminución del metabolismo oxidativo, estaría indicando una preferencia hacia un metabolismo del tipo glucolítico. El aumento en el metabolismo glucolítico del ME inducido por el tratamiento con metformina podría estar contribuyendo a mejorar el manejo de glucosa en el animal completo, y así contribuir a la mejora en la respuesta a insulina observada en nuestros animales, como una disminución del índice HOMA y restablecimiento de los niveles de insulina en sangre.

Por otro lado, se ha visto que la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa se reduce cualitativamente en músculo esquelético proveniente de pacientes con diabetes tipo 2 e individuos pre-diabéticos insulino

resistentes según Mootha et al,<sup>(51)</sup>. Además hay una disminución significativa en los niveles de mRNA de PGC-1 alfa, PGC-1 beta. Esto es debido a que PGC1 alfa está involucrado en el aumento de la biogénesis mitocondrial y la función mitocondrial por ende favorece la conversión de fibras musculares a unas más oxidativas. En nuestro modelo ocurre algo semejante, ya que encontramos una reducción de PGC1 alfa y un incremento de AMPK alfa 1, lo que favorece un metabolismo de tipo glucolítico y disminuye el de tipo oxidativo en ME.

### **8.3 Cambios en la expresión de genes en Tejido Adiposo**

AMPK está relacionada con una disminución en la captación de la glucosa como lo han demostrado Gaidhu et al.,<sup>(52)</sup> descubrieron que en cultivos primarios de adipocitos de rata, la captación de glucosa se encontraba disminuida a consecuencia de la activación de AMPK por AICAR, un activador de AMPK, lo que se aprecia en los resultados obtenidos es que ambas isoformas catalíticas están aumentadas, lo que plantea la posibilidad de que en TA ésta captación de glucosa está siendo mitigada por AMPK en el SM y con el tratamiento con metformina se restableció esta condición.

El efecto de AMPK en el metabolismo de lípidos en TA es la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y por consiguiente de la lipólisis como lo han demostrado Garton y Yeaman (53) Incluso en un modelo donde se inhibe la expresión de las isoforma alfa 1 que es la más abundante en el tejido adiposo y que es tratado con un activador de AMPK no se presenta su efecto antilipolítico; según nuestros resultados es probable que el incremento de ambas isoformas de AMPK sea una respuesta a la cantidad de lípidos contenido en los adipocitos y su intento de frenar este proceso metabólico es un aumento de la expresión de estas subunidades. En un modelo de ratones con resistencia a la insulina y diabetes tipo II, el contenido mitocondrial en el tejido adiposo se encuentra disminuido.

La sobreexpresión de PGC1 alfa en tejido adiposo blanco desencadena un aumento en la biogénesis mitocondrial según Jiandie Lin et al <sup>(34)</sup> En los resultados obtenidos aunque no hay un cambio estadísticamente significativo en la expresión

de PGC1 alfa, sí es apreciable un ligero aumento en la expresión de este gen lo que resultaría en un una biogénesis mitocondrial aumentada y por consiguiente una mayor capacidad oxidativa.

El complejo mTORC1 tiene una función en la síntesis de proteínas y de manera muy importante en la resistencia a la insulina donde se relaciona con un aumento de su actividad en este trastorno. La disminución de este gen estaría indicando por un lado la disminución de un metabolismo anabólico donde, se disminuya la síntesis de proteínas, y por otro lado un intento de aumentar la sensibilidad a la insulina, lo cual concuerda con la aumentada expresión de las isoformas de AMPK con la finalidad de captar más glucosa.

#### **8.4 Cambios en la expresión de genes en Tejido Hepático**

Foretz M et al<sup>(54)</sup> reportan que la sobreexpresión de AMPK activada constitutivamente provoca es una disminución tanto en los niveles de glucosa como en la expresión de genes gluconeogénicos y lipogénicos reduciendo de esta manera los lípidos circulantes.

Interesantemente, en este modelo de SM la expresión de la isoforma alfa 2 no se ve alterada lo que sugiere que no hay cambios en el metabolismo de lípidos ni de glucosa que dependan de AMPK alfa 2. Sin embargo, la isoforma catalítica alfa 1 se encuentra disminuida lo que plantea la posibilidad de un efecto contrario al observado por Foretz M et al,<sup>(54)</sup> aumentando los lípidos circulantes, esto es congruente con los parámetros bioquímicos obtenidos, sin embargo con el tratamiento con metformina no se restablecieron los niveles de los genes codificantes para las isoformas catalíticas de AMPK sino que disminuyó la expresión de la isoforma alfa 2 de AMPK aún sin haber sido alterada en el SM

A diferencia de las isoformas catalíticas de AMPK, la expresión de PGC-1 alfa se encuentra aumentada en el SM lo que probablemente signifique, por un lado un posible aumento en el metabolismo oxidativo de ácidos grasos aunado a una reducción en el anabolismo de los carbohidratos vía inhibición de la gluconeogénesis.

Niveles altos de mRNA de PGC-1 alfa han sido encontrados en hígados de ratones de modelos de diabetes tipo I y II, así como los obtenidos en este modelo de SM lo cual evidencia las similitudes entre estas patologías.<sup>(55)</sup>

La disminución de mTOR podría indicar una activación de la vía de la insulina que aunque no es necesaria para la captación de glucosa en este tejido, sí puede promover la síntesis de glucógeno.

## 9. CONCLUSIONES

El síndrome metabólico presenta alteraciones en la expresión de genes que pertenecen a la vía de señalización de la AMPK e incluso las isoformas catalíticas de AMPK se ven afectadas y de manera muy importante, estas alteraciones se presentan de manera tejido específica.

Estas alteraciones a nivel de expresión de genes correlacionan con las alteraciones de los parámetros bioquímicos cuantificados característicos en el SM.

Las alteraciones presentes en el SM a nivel de expresión, están respondiendo a una modificación en el entorno metabólico y pudieran estar intentando solventar este desbalance, sin embargo esta condición al ser prolongada pudiera llevar a complicaciones más severas como lo pudieran ser DM tipo II y enfermedades cardiovasculares.

El tratamiento con metformina ocasiona un reajuste metabólico donde, bajo el supuesto de una activación de la AMPK y mediante sus efectos inmediatos y a largo plazo, logra revertir la condición del SM. Y al ser medidos genes responsables de este acontecimiento ya no se encuentran alterados en su mayoría, lo que correlaciona con la tendencia a revertir los parámetros bioquímicos cuantificados.

## 10. REFERENCIAS

- 1) Barquera C. S., Campos N I, (2009), Dislipidemias, epidemiología, evaluación adherencia y tratamiento. Primera edición, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 19-32.
- 2) Damianil D., et al, (2011), Síndrome metabólica em crianças e adolescentes: dúvidas na terminologia, mas não nos riscos cardiometabólicos, Arq Bras Endocrinol Metab; 55/8.
- 3) B. Singh , S. Arora, B. Goswami, V. Mallika, (2009), Metabolic syndrome: A review of emerging markers and management, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 3. 240–254.
- 4) Aguilar S. C. A., et al. (2004) High Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico, Archives of Medical Research 35. 76-81.
- 5) Aguilar S. C. A., et al, (2005) The Metabolic Syndrome: A Concept Hard to Define, Archives of Medical Research 36. 223–231.
- 6) Garber J. A., The metabolic syndrome, Med Clin N Am 88. 2004; 837–846.
- 7) Rakesh M. Parikh, Viswanathan Mohan, (2012) Changing definitions of metabolic syndrome, Indian J Endocrinol Metab . Indian J Endocrinol Metab. Jan-Feb; 16(1): 7–12.
- 8) Carvajal K, Hernández E. Ma. L., Moreno S. (2007) PPAR's, síndrome metabólico, y enfermedad cardiaca. Archivos de Cardiología de México S4, 66-76
- 9) Carvajal K. y Carrillo S., (2009) Señales moleculares que modulan el metabolismo energético: Implicaciones en el desarrollo de obesidad, diabetes y cardiopatías. En: Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, editores. Mensaje Bioquímico; México DF: UNAM; 71-81.
- 10) Benoit Violet, Marc Foretz, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Renaud Dentin, Luc Bertrand, Louis Hue and Fabrizio Andreelli. (2006) Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. J Physiol 574.1 pp 41–53
- 11) Jun L, Sharon E. Benashski, Venugopal Venna, and Louise D. McCullough. (2010) Effects of Metformin in Experimental Stroke. Stroke. 41(11): 2645–2652.
- 12) Ken Inoki, Joungmok Kim, and Kun-Liang Guan. AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2012.52:381-400.
- 13) Maria M. Mihaylova and Reuben J. Shaw. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. Nat Cell Biol, 2; 13(9): 1016–1023.
- 14) D. Grahame Hardie, Simon A. Hawley and John W. Scott, (2006), AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept, J Physiol. 574.1: 7–15
- 15) Yuji Matsuzawa, Tohru Funahashi and Tadashi Nakamura. (2011), The Concept of Metabolic Syndrome: Contribution of Visceral Fat Accumulation and Its Molecular Mechanism. Journal of Atherosclerosis and Thromb, 18:629-639.
- 16) A. C. Santomauro Júnior, M. Remião Ugolini, A. T. Santomauro, R. Peres Do Souto. (2008), Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab; 52/1.
- 17) Gaochao Zhou, Robert Myers, Ying Li, Yuli Chen, Xiaolan Shen, Judy Fenyk-Melody, et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest. 108:1167-1174.
- 18) Ortega-Cuellar D., (2011) La deficiencia de biotina produce efectos similares en marcadores del estado energético celular y sobre los transcriptomas del metabolismo del

- carbono en tres eucariontes diferentes, tesis de doctorado en ciencias. México DF, UNAM.
- 19) Gregory R. Steinberg and Bruce E. Kemp, (2009) AMPK in Health and Disease, *Physiol Rev.* 89; 1025–1078.
  - 20) Benoit Viollet, Bruno Guigas, Nieves Sanz Garcia, Jocelyne Leclerc, Marc Foretz, and Fabrizio Andreelli, (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview, *Clin Sci* 122(6): 253–270.
  - 21) Clifford J. Bailey, Caroline Day, (1989), Diabetes Traditional Plant Medicines as Treatments for, *Diabetes Care*, 12(8):553-564.
  - 22) Thomas Pulinilkunnil, Jeevan Nagendran, and Jason R. B. Dyck, , (2012), *Translational Cardiology*, Human Press
  - 23) Lindsey D. Bogachus and Lorraine P. Turcotte, (2010), Genetic downregulation of AMPK\_ isoforms uncovers the mechanism by which metformin decreases FA uptake and oxidation in skeletal muscle cells, *Am J Physiol Cell Physiol*, 299: C1549–C1561.
  - 24) Maengjo Kim, Rong Tian, (2011) Targeting AMPK for cardiac protection: Opportunities and challenges, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51; 548–553
  - 25) Carles Canto, Johan Auwerx, (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways, *Cell. Mol. Life Sci.* 67:3407–3423
  - 26) Dominique Langin, (2006), Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic síndrome, *Pharmacological Research*, Volume 53, Issue 6: 482–491
  - 27) Ken Inoki, Joungmok Kim, and Kun-Liang Guan, AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2012. 52:381–400.
  - 28) Jiandie Lin, Christoph Handschin, and Bruce M. Spiegelman, (2005) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways, *CELL METABOLISM*: (1) 361.368.
  - 29) Carles Canto, Johan Auwerx, (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways, Carles Canto, Johan Auwerx, *Cell. Mol. Life Sci.* 67:3407–3423.
  - 30) Barbara B. Kahn, Thierry Alquier, David Carling and D. Grahame Hardie, (2005), AMP-activated protein kinase: Ancient energy Review gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *CELL METABOLISM*, (1), 15- 25.
  - 31) David Carling, (2004), The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control, *Biochemical Sciences*; 29(1)
  - 32) Lu Xu, et al, (2012), Change of Body Composition and Adipokines and Their Relationship with Insulin Resistance across Pubertal Development in Obese and Nonobese Chinese Children: The BCAMS Study, *International Journal of Endocrinology*
  - 33) Gilberto Paz-Filho, Claudio Mastronardi, Carina Bertoldi Franco, Kevin Boyang Wang<sup>3</sup>, Ma-Li Wong, Julio Licinio, (2012), Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications, *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56/9, 597-607.
  - 34) Jiandie Lin, Christoph Handschin, and Bruce M. Spiegelman, (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators, *CELL METABOLISM*; (1), 361- 370.
  - 35) Benoit Viollet, Marc Foretz<sup>1</sup>, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Renaud Dentin, Luc Bertrand, Louis Hue and Fabrizio Andreelli, (2006) Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders, *J Physiol* 574.1 pp 41–53.
  - 36) Roberto Zoncu<sup>§</sup>, Alejo Efeyan<sup>§</sup> and David M. Sabatini, (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Molecular cell Biology*, 12, 21-35.
  - 37) Stephan Wullschleger, Robbie Loewith and Michael N. Hall, (2006), TOR Signaling in Growth and Metabolism, *Cell* 124, 471-484.

- 38) Benoit Viollet<sup>1</sup>, Bruno Guigas, Jocelyne Leclerc, Sophie Hébrard, Louise Lantier, Rémi Mounier<sup>1</sup>, Fabrizio Andreelli and Marc Foretz, (2009), AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives, *Acta Physiol (Oxf)*; 196(1): 81–98.
- 39) Chiranjib Chakraborty, Sanjiban S. Roy<sup>2</sup>, Minna J. Hsu<sup>3</sup>, Govindasamy Agoramoorthy<sup>4</sup>, Landscape (2011), Mapping of Functional Proteins in Insulin Signal Transduction and Insulin Resistance: A NetworkBased Protein-Protein Interaction Analysis, *PLoS ONE*, January, (6): 1-7.
- 40) Jeffrey E. Pessin and Alan R. Saltiel, (2000), Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance, *J Clin Invest.* 15; 106(2): 165–169.
- 41) Shaobin WANG, Ping SONG, and Ming-Hui ZOU, (2012), AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases, *Clin Sci (Lond)*, 122(12): 555–573.
- 42) R.B. Ceddia , (2013) The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism, *Molecular and Cellular Endocrinology*, Febrero; 2(366), pp 194–203.
- 43) Pere Puigserver and Bruce M. Spiegelman, (2003) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-(gamma) Coactivator 1{alpha} (PGC-1{alpha}): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator, *Endocr. Rev.* 24: 78-90.
- 44) Sakamoto K, Holman GD, (2008), Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Jul; 295(1):E29-37.
- 45) Erik A. Richter<sup>1</sup> and Neil B. Ruderman, (2009), AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease, *Biochem J.*, 1; 418(2): 261–275.
- 46) Young H. Choi, Sang G. Kim, Myung G. Lee, (2006) Dose-Independent Pharmacokinetics of Metformin in Rats: Hepatic and Gastrointestinal First-Pass Effects, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, November, 11 (95): 2543- 2552.
- 47) Claudia Menzaghi, Vincenzo Trischitta, and Alessandro Doria, (2007), Genetic Influences of Adiponectin on Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Cardiovascular Disease, *DIABETES*, 56, 1198-1209.
- 48) Ian P. Salt, John M. C. Connell, and Gwyn W. Gould, (2000), 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside (AICAR) Inhibits Insulin-Stimulated Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes, *DIABETES*, 49.
- 49) Ayo P. Doumatey, (2012), Paradoxical Hyperadiponectinemia is Associated With the Metabolically Healthy Obese (MHO) Phenotype in African, Americans, *J Endocrinol Metab.*, 1; 2(2): 51–65.
- 50) Zarrinpashneh et al, (2006), Role of the  $\alpha$ 2-isoform of AMP-activated protein kinase in the metabolic response of the heart to no-flow ischemia, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H2875–H2883.
- 51) Mootha, V.K. et al, (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267– 273.
- 52) Gaidhu, M.P.,et al, (2006). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- beta-D ribofuranoside-induced AMP-activated protein kinase phosphorylation inhibits basal and insulin-

- stimulated glucose uptake, lipid synthesis, and fatty acid oxidation in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 25956–25964.
- 53) Garton, A.J., Yeaman, S.J., (1990), Identification and role of the basal phosphorylation site on hormone-sensitive lipase. *Eur. J. Biochem.* 191, 245–250.
- 54) Foretz M, y col. (2005) Short-Term Overexpression of a Constitutively Active Form of AMP-Activated Protein Kinase in the Liver Leads to Mild Hypoglycemia and Fatty Liver, *DIABETES*, VOL. 54, MAY 2005, 1331: 1339
- 55) Herzig, S. et al. (2001). CREB regulates hepatic Bougluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179–183.