PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

ROL DE LA INTERACCIÓN MITOCONDRIA-RETÍCULO SARCOPLÁSMICO Y LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LA REGULACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS RELATIVA A LA OXIDACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO HUMANO.

POR

MAURICIO CASTRO SEPULVEDA

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Médicas

Tutores

Dr. Jorge Carvajal, Departamento de Obstetricia y Ginecología

Facultad de Medicina, PUC

Dr. Hermann Zbinden Foncea, Laboratorio de Ciencias del Ejercicio

Facultad de Medicina, U. Finis Terrae

Marzo, 2021

Santiago, Chile

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecer a mis tutores Dr. Jorge Carvajal y Dr. Hermann Zbinden, por confiar en mí para llevar a cabo esta tesis doctoral. Le agradezco su apoyo y guía de estos años, y por ayudarme a crecer como científica y profesional.

Quisiera agradecer a cada uno de los miembros del laboratorio de la Universidad Finis Terrae en especial Sebastian Jannas por sus eternas conversaciones científicas y ayuda técnica. Agradecer a la Dr. Verónica Eisner y a Benjamín Cartes por su entrega de conocimientos técnicos, que sin duda, mi tesis no hubiera sido posible sin ellos. Agradecer al Dr. Jose Galgani por ser clave en mi formación científica.

También quisiera agradecer a las autoridades anteriores y actuales del doctorado, Dr. Jaime Pereira, Dra. Claudia Sáez, Dra. Andrea Leiva y Dr. Jorge Carvajal, por su apoyo en este proceso. Quisiera hacer una mención especial a la Dra. Claudia Sáez, que sin ella mi formación de doctora no hubiese estado completa.

También quisiera agradecer a mis compañeros de generación Tamara Marín, Valeria Olguín, Alejandra Hernández, Lila González, Luis Silva y Alejandra Alarcón, quienes los primeros años del doctorado hicieron más ameno los cursos y las diferentes etapas del doctorado.

Agradezco a mis amigos de la vida, Manuel Weber, Cristian Pérez, Christian Irarrazabal y Ernesto Hernandez, quienes si bien no conocen este mundo de la ciencia, estuvieron siempre ahí prestando apoyo incondicional.

Agradecer a mis padres Waleska Sepulveda y Mauricio Castro, y a mi hermano Franco Castro por su apoyo. Agradecer a mi abuela mami y a Lionel por demostrarme que con trabajo duro todo es posible. Y finalmente quiero agradecer a las personas más importantes para llevar a cabo este proyecto, que me apoyaron y empujaron a emprender

esta aventura, mi familia Pilar Irarrázabal, Javiera Castro, Agustina Castro y Leonor Castro, que si no fuera por ellas en este momento no hubiese podido llegar hasta aquí. Gracias por todo y les dedico esta tesis con todo mi amor y cariño.

Y por supuesto agradecer a las fuentes de financiamiento para realizar la tesis: a la Universidad Finis Terrae y su proyecto CAI; a la Dirección de Investigación y Doctorados de la Escuela de Medicina UC por beca de desarrollo de tesis de post-grado; a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (VRI), por la beca VRI- CPD y la beca de pasantias en el extranjero.

También agradezco a la Unidad de Microscopía Avanzada UC (UMA UC), no solo por el uso de microscopios, sino también porque siempre estuvieron dispuestos a resolver mis dudas con muy buena disposición, especialmenete a Alejandro Munizaga.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES. 11
RESUMEN. 12
1. INTRODUCCIÓN. 11
1.1. Teoría de la lipotoxicidad como causa de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético. ……..16
1.2 Medición de la oxidación de sustratos a través del cociente respiratorio en humanos. ……..17
1.3 Interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y su potencial rol en el metabolismo de sustratos. ….……..……..……18
1.4 Dinámica mitocondrial de fusión y fisión y su potencial rol en el metabolismo de sustratos. ……..19
1.5 La interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y la dinámica mitocondrial de fusión y fisión como fenómenos acoplados con un potencial rol en el metabolismo de sustratos. ……..……...22
1.6. Resumen de antecedentes. 23
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. 24
2.1. Hipótesis. 24
2.2. Objetivo general. …….....24
2.3. Objetivos específicos. 24
3. MATERIALES Y MÉTODOS. 25
3.1. Objetivo específico 1. …….....25
3.1.1. Sujetos de estudio. 25
3.1.2. Protocolo de investigación. 25
3.1.3. Medición antropométrica y análisis de sangre. 25
3.1.4. Evaluación del consumo maximo de oxigeno ($VO_{2máx}$). 25
3.1.5. Medición del cociente respiratorio en reposo. …….....26
3.1.6. Biopsia del músculo esquelético. …….....26
3.1.7. Medición del cociente respiratorio durante el ejercicio. …….....26

3.1.8. Evaluación de la interacción entre las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico por microscopía electrónica de transmisión. ……..……..…27
3.2. Objetivo específico 2. …….....27
3.2.1. Evaluación de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión. ……..27
3.2.2. Evaluación de los niveles de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión a través de western blot. …….....28
3.3. Objetivo específico 3. …….....28
3.3.1. Preparación miotubos primarios humanos. …….……...….28
3.3.2. Incubación de los miotubos con glucosa y ácido palmítico. …….…...….....29
3.3.3. Preparación de los miotubos humanos para microscopía electrónica de transmisión. ……..29
3.3.4. Preparación de los miotubos humanos para western blot. ……..…30
3.4. Análisis estadístico. …….....30
4. RESULTADOS 31
4.1. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y las características de los sujetos. ….....31
4.2. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético en reposo. ……..34
4.3.Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y el tamaño de las mitocondrias en el músculo esquelético humano en reposo. 36
4.4. Correlación entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares y la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano. …….…….…..40
4.5. Correlación entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en el músculo esquelético humano. ……..40
4.6. Evaluación de la incubación de miotubos humanos con glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en el tamaño de las mitocondrias. …..44

4.7. Evaluación de la incubación de miotubos humanos con glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en los niveles de proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión . ……45
4.8. Estudio complementario en células mononucleares humanas. …….....47
5. DISCUSIÓN. 49
6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES. 56
7. BIBLIOGRAFÍA. 60
8. ANEXOS. ……..…..66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los sujetos. …….31

Tabla 2. Correlación de Pearson entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y las características de los sujetos. ……..…32

Tabla 3. Repetibilidad de las mediciones desde las imágenes de microscopía electrónica. ……..…33

Tabla 4. Correlación de Pearson entre el promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y la razón de las proteínas de fusión/fisión en el músculo esquelético. …….……43

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Interacción entre mitocondria y retículo endo/sarco plásmico. …….…….19
Figura 2. Dinámica mitocondrial de fusión y fisión. ……..…..……..21
Figura 3. Modelo propuesto para la regulación de la oxidación de sustratos mediante la interacción entre mitocondria y retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial en hígado. …….22
Figura 4. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio con la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano en reposo. …….…….…….…….…….…….…….…….…..33
Figura 5. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. …….35
Figura 6. Medición de las diferentes poblaciones mitocondriales en el músculo esquelético humano. ……..…….37
Figura 7. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. .....…….……..……..38
Figura 8. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo durante el ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. …….....…….……..……...….39
Figura 9. Correlación entre el promedio del tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares de cada sujeto y la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano en reposo. …….....……..…….……..……..40
Figura 10. Promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión medidas a través de wester blot en el músculo esquelético humano en reposo. ……..……41
Figura 11. Correlación entre el promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en el músculo esquelético humano en reposo. …….....……...……...……42

Figura 12. Modelo propuesto para los resultados de los objetivos 1 y 2. ……...43
Figura 13. Imagen representativa de miotubos primarios al día 7 de diferenciación. …..44
Figura 14. Efectos de la exposición a glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en la densidad mitocondrial y el tamaño de las mitocondrias en células musculares humanas. ……..…….……45
Figura 15. Efectos de la exposición a glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en miotubos humanos. ……..……46
Figura 16. Interacción entre mitocondria y retículo endoplásmico en ayuno y posterior al consumo de glucosa en CMSP humanas. …….……...…..…48
Figura 17. Cambios morfológicos de las mitocondrias, después de un ayuno prolongado y posterior al consumo de glucosa en CMSP humanas. ..…… ……49

ANEXOS

Tabla 5. Correlación de Pearson entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio y las características de los sujetos. ……..……66
Tabla 6. Correlación de Pearson entre la oxidación absoluta cuerpo comppleto de ácidos grasos y las características de los sujetos. ……..…….69
Figura 18. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. …….……67
Figura 19. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. …….....…….……..…….……..…….68
Figura 20. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo en reposo y al final del ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. …..……...……70
Figura 21. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo en reposo con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. .....…….……..…….....71
Figura 22. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo al final del ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. …….…….…….72

ABREVIACIONES

ATP: Adenosín trifosfato

AcidPal: Ácido palmítico

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CoA: Coenzima A

CR: Cociente respiratorio

CV: Coeficiente de variabilidad

Drp1: Proteína 1 relacionada con la dinamina

Fis1: Proteína de fisión mitocondrial 1

Glu: Glucosa

GRP75: Proteína 75 regulada por glucosa

IC: Intervalos de confianza

IMC: Índice de masa corporal

IMF: Intermiofibrilares

IP3-R: Receptor inositol 1,4,5 - trifosfato

IRS: Receptor de insulina

LD: Gotas lipídicas

MEF: Fibroblastos embrionarios

Mfn: Mitofusina

Opa1: Proteína de atrofia óptica 1

OXPHOS: Fosforilación oxidativa

PKB: Proteína quinasa B

PKCθ: Proteína quinasa θ

RE: Retículo endoplásmico

RS: Retículo sarcoplásmico

SSM: Subsarcolemales

GLUT4: Proteína transportadora de glucosa tipo 4

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

XeB: Xestopongina

RESUMEN

La resistencia a la insulina en el músculo esquelético se reconoce como uno de los factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, el mecanismo por el cual se gatilla la resistencia a la insulina no esta claro. Una de las teorías es la lipotoxicidad, que es producto de una acumulación excesiva de especies lipídicas, siendo esta acumulación producto potencialmente de un desbalance entre la captación y la oxidación de ácidos grasos. De este modo, identificar factores moleculares que regulen la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, podría aportar información relevante en el desarrollo de métodos para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina. Estudios en animales y líneas celulares, sugieren que la interacción entre las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico (mitocondria-RS) y la respuesta dinámica de las mitocondrias (fenotipo de fusión mitocondrial [mitocondrias con mayor tamaño y mayor abundancia de las proteínas que regulan la fusión]/ fenotipo de fisión mitocondrial [mitocondrias con menor tamaño y con mayor abundancia de las proteínas que regulan la fisión]) desempeñan un papel en la regulación de la oxidación de ácidos grasos. Además, un estudio reciente en células hepáticas, sugiere que la fusión mitocondrial depende de la interacción mitocondria-RS a través de calcio, por lo tanto la interacción mitocondria-RS y la fusión mitocondrial podrían ser fenómenos acoplados y este acoplamiento jugar un rol en la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, esto no se ha evaluado en el músculo esquelético humano.

Hipótesis: Postulamos que la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético humano en reposo, se correlacionan directamente con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio.

Objetivos: Demostrar que existe una correlación directa entre la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético humano en reposo, con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio. Objetivos específicos: 1)

Evaluar si existe una correlación directa entre la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético en reposo y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio. 2) Evaluar si existe una correlación directa entre el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético en reposo y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio. 3) Medir *in vitro* el rol de la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en la respuesta dinámica de las mitocondrias frente a la exposición a ácidos grasos en células musculares humanas.

Materiales y Métodos: Para los objetivos 1 y 2, incluimos doce hombres sin enfermedades metabólicas diagnosticadas, a los cuales medimos la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos a través del cociente respiratorio (CR) cuerpo completo en reposo, posterior a 12 horas de ayuno. En estas condiciones de bajo gasto energético el músculo esquelético da cuenta de ~25% del consumo de oxígeno de todo el cuerpo. Posterior a esto, se les realizó una biopsia en el músculo vasto lateral de la pierna dominante. Inmediatamente obtenida la biopsia, los sujetos realizaron una sesión de ejercicio aeróbico (50% del consumo máximo de oxígeno, hasta gastar 600 kcal), en esta condición de alto gasto energético medimos el CR para estimar la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos durante el ejercicio (en ejercicio, a esta intensidad, el músculo esquelético da cuenta del ~80% del consumo de oxígeno de todo el cuerpo). El CR se calculó con la razón entre la producción de dióxido de carbono (VCO_2) y el consumo de oxígeno (VO_2) (VCO_2/ VO_2), siendo estos gases evaluados de manera simultánea, respiración por respiración, con un carro metabólico. El CR mientras más cercano a 0,7, mayor es la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos, y mientras más cercano a 1 es el CR, mayor es la oxidación de glucosa relativa a la oxidación de ácidos grasos. Para evaluar la interacción mitocondria-RS usamos imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las biopsias musculares. Para evaluar el fenotipo de fusión mitocondrial, usamos imágenes de microscopía electrónica de transmisión [tamaño de las mitocondrias] y western blot de las proteínas que regulan la fusión y la fisión mitocondrial. Para el objetivo 3, estudiamos el efecto de

la incubación con ácido palmítico (AcidPal; 0,6 mM) y glucosa (10 mM), en células musculares primarias (miotubos) en la dinámica mitocondrial. Analizamos el efecto de XestoponginaB, un inhibidor de la interacción mitocondria-RS, en la dinámica mitocondrial inducida por AcidPal. XestoponginaB es un inhibidor especifico de la actividad del receptor inositol 1,4,5 - trifosfato, el cual es clave en la liberación de calcio desde el RS a la mitocondria, de modo que se considera que inhibe específicamente la interacción mitocondria-RS.

Resultados: Observamos una correlación inversa entre el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo y el CR cuerpo completo en reposo, pero no con el CR durante el ejercicio. Observamos una correlación inversa entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares en el músculo esquelético humano en reposo y el CR cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio. Encontramos una correlación directa entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares con una mayor masa de la proteína Mfn 2 (proteínas que regula la fusión de las membranas externas de las mitocondrias), ajustada a la proteína Fis 1 (proteínas que regula la fisión mitocondrial) (razón Mfn 2/Fis 1). *In vitro*, los miotubos incubados con AcidPal presentan mitocondrias con mayor tamaño, en comparación a los miotubos incubados con glucosa. La co-incubación de AciPal con XeB (1 μM) anulo el efecto del AcidPal en el tamaño de las mitocondrias. Finalmente, la co-incubación de AciPal con XeB produce una menor razón de las proteínas Mfn 2/Fis 1 en comparación a la incubación con AcidPal.

Discusión y conclusión: Observamos que los sujetos con un mayor porcentaje de mitocondrias interactuando con RS y un mayor fenotipo de fusión mitocondrial en el músculo esquelético en reposo, tienen una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo, pero no durante el ejercicio. Por lo tanto, aceptamos nuestra hipótesis en reposo, pero no durante el ejercicio. Adicionalmente, la incubación con AcidPal induce un fenotipo de fusión mitocondrial *in vitro*, efecto que es inhibido al impedir la interacción mitocondria-RS. De este modo, demostramos que existe una

correlación directa entre una mayor interacción mitocondria-RS, el fenotipo de fusión mitocondrial y una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos. Demostramos además que la interacción mitocondria-RS es necesaria para la inducción del fenotipo de fusión estimulada por la incubación de AcidPal *in vitro*. Proponemos que existe un ciclo de retroalimentación positiva en que la disponibilidad de ácidos grasos induce la interacción mitocondria-RS y de esta manera el fenotipo de fusión mitocondrial, lo que es necesario para la oxidación de ácidos grasos. Serán necesarios experimentos que comprueben, en el músculo esquelético, que la interacción mitocondria-RS y el fenotipo de fusión mitocondrial son necesarios para la oxidación de ácidos grasos. Basados en nuestros resultados, sugerimos que la interacción mitocondria-RS y la fusión mitocondrial en el músculo esquelético sean considerados como potenciales blancos para la prevención y/o el tratamiento de patologías asociadas a la disminución de la oxidación de ácidos grasos, como la resistencia a insulina.

Palabras claves: cociente respiratorio, dinámica mitocondrial, oxidación de ácidos grasos, interacción mitocondria-RS/RE.

INTRODUCCIÓN

1.1. Teoría de la lipotoxicidad como causa de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético.

El músculo esquelético es un tejido metabólicamente relevante ya que representa aproximadamente el 40% de la masa corporal en sujetos delgados y es responsable de la mayor parte (aproximadamente 80%) de la captación de glucosa estimulada por insulina (1). La resistencia a la insulina en el músculo esquelético, está asociada con la obesidad y la inactividad física, y se reconoce como uno de los factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (2). Desafortunadamente, las causas que detonan la resistencia a la insulina en el músculo esquelético no están completamente claras. Una de las teorías de la resistencia a la insulina es la lipotoxicidad, que se define como la acumulación excesiva de especies lipídicas, siendo esta acumulación potencialmente producto de un desbalance entre la captación y la oxidación de ácidos grasos (3, 4). Estas especies lipídicas alteran la señal de la insulina a través de diferentes mecanismos, lo que afecta negativamente la captación de glucosa (5). Un mecanismo propuesto, es que la acumulación de diaglicerol aumenta la actividad de la proteína quinasa (PKC) θ, lo que disminuye tanto la fosforilación del receptor de insulina (IRS) IRS^{Tyr960}, como la fosforilación de la proteína quinasa B (PKB) (5). Esta desregulación en la señal de la insulina, disminuye la translocación de la proteína transportadora de glucosa tipo 4 (GLUT4), que es clave en la captación de glucosa estimulada por insulina (5).

Estudios en humanos que apoyan esta hipótesis, muestran una correlación directa entre la acumulación de especies lipídicas en el músculo esquelético con una mayor resistencia a la insulina en el músculo esquelético (6, 7). Además, estudios *in vitro* han demostrado que la oxidación de ácido palmítico, un ácidos graso saturado de cadena larga, es menor en miotubos (células musculares primarias) de individuos resistentes a la insulina, que en individuos sensibles a la insulina (8, 9). Por lo tanto, aumentar la oxidación de ácidos

grasos podría potencialmente reducir la formación de especies lipídicas, lo que conduciría a una disminución en la resistencia a la insulina.

1.2. Medición de la oxidación de sustratos a través del cociente respiratorio en humanos.

El cálculo del cociente respiratorio (CR) cuerpo completo permite medir la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos; es una medición útil para estudiar los mecanismos que regulan la oxidación de ácidos grasos en humanos (9). El CR es calculado con la razón entre la producción de dióxido de carbono (VCO_2) y el consumo de oxígeno (VO_2) (VCO_2/ VO_2), siendo estos gases evaluados de manera simultánea, respiración por respiración, en un carro metabólico. En general, el CR cuerpo completo está en el rango de 0,70 (oxidación completa de ácidos grasos) a 1,0 (oxidación completa de carbohidratos) y cualquier lugar dentro de este rango indica que una mezcla de sustratos energéticos se esta oxidando simultáneamente (10). Por ejemplo, el CR cuerpo completo es cercano a 0,8 después de un ayuno nocturno (mayor oxidación relativa de ácidos grasos), y es cercano a 0,95 después de una comida (mayor oxidación relativa de carbohidratos) (11). Si bien el CR cuerpo completo es ampliamente utilizado en investigación, es una técnica que no esta libre de sesgos técnicos (12), ni metodológicos (13). Ejemplo de lo anterior, es que el CR cuerpo completo es afectado por la ingesta de nutrientes previa a la evaluación (13). Finalmente, la medición del CR cuerpo completo es la suma de todos los procesos oxidativos que ocurren en todo el cuerpo y no brinda información acerca de la oxidación de los sustratos en órganos individuales (14). Cuando el CR cuerpo completo es evaluado en reposo (condición de bajo gasto energético), el músculo esquelético da cuenta aproximadamente del 25% del consumo de oxígeno de todo el cuerpo (15) y durante el ejercicio aeróbico de mediana intensidad (condición de alto gasto energético), da cuenta de casi su totalidad (~80%) (16, 17). Por lo tanto y si bien el CR cuerpo completo no mide directamente la oxidación de sustratos en el músculo esquelético, el CR cuerpo completo nos podría entregar información del metabolismo de sustratos del músculo esquelético durante el reposo y más aún durante el ejercicio.

1.3. Interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y su rol en el metabolismo de sustratos.

Las mitocondrias del músculo esquelético interactúan física y funcionalmente con el retículo sarcoplásmico (RS) (18). Varios puentes proteicos mantienen la interacción entre las mitocondrias y el RS, siendo el principal formado por el receptor de inositol (1,4,5) - trisfosfato (IP3-R) (retículo) / la proteína regulada por glucosa 75 / canal aniónico 1 dependiente de voltaje (mitocondrias) (18; **Figura 1**). La interacción entre las mitocondrias y el RS se ha evaluado clasicamente a través de imágenes de microscopía electrónica, mediante tres parámetros (19, 20); 1) Distancia entre la mitocondria y el RS; 2) Porcentaje de la superficie mitocondrial interactuando con el RS; y 3) Porcentaje de mitocondrias interactuando con RS.

Un reciente estudio sugiere como hipótesis, que la interacción entre las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE, células no-musculares; RS, células musculares) juega un rol en el metabolismo de sustratos (21). Lo anterior se sustenta en que la transferencia de calcio desde el RE/RS a la mitocondria estimula la actividad del ciclo del ácido tricarboxílico a través de tres deshidrogenasas sensibles a calcio (piruvato deshidrogenasa fosfatasa, isocitrato deshidrogenasa y oxoglutarato deshidrogenasa) (11; **Figura 1**). Así, una mayor interacción entre mitocondria y retículo favorecería la oxidación de los sustratos (ácidos grasos y glucosa), y, por el contrario, una disminución en la interacción favorecería la producción de adenosín trifosfato (ATP) a través de la glucólisis anaerobia. Evidencia de lo anterior, fue obtenida en fibroblastos embrionarios (MEF), encontrando que una deleción del IP3-R y una disminución en la actividad de IP3-R usando xestoponginaB (XeB), reduce la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria, aumentando el lactato en el medio de cultivo y disminuyendo el consumo de oxígeno celular (22), sugiriendo una menor producción de ATP desde el metabolismo oxidativo y un aumento en la producción de ATP desde la glicólisis (22). Además, en células glioblastómicas, se demostró que la fosforilación de la proteína quinasa Akt, por insulina, inhibe IP3-R disminuyendo la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria (23).

Finalmente, en ratones, después de un ayuno nocturno, cuando predomina la oxidación sistémica de ácidos grasos, las mitocondrias del hígado, aumentan su interacción con el RE; por el contrario, después de la alimentación, cuando predomina la oxidación sistémica de carbohidratos, las mitocondrias disminuyen su interacción con el RE (24). Por lo tanto, es posible postular que una mayor interacción mitocondria-RE/RS, favorece la oxidación de ácidos grasos, y que, por el contrario, una menor interacción mitocondria-RE/RS favorece la utilización de glucosa para la producción de ATP, no solo desde la vía glicolítica, si no también desde la vía oxidativa. **Esta hipótesis no ha sido evaluada en el músculo esquelético humano.**

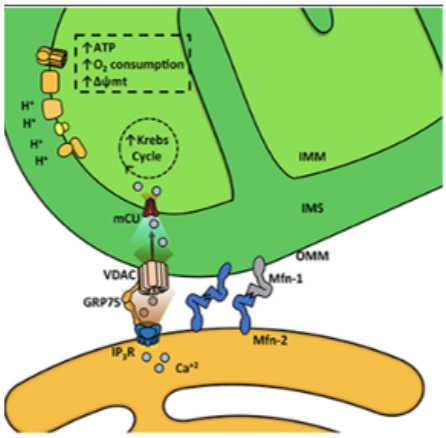


Figura 1. Interacción entre mitocondria y retículo endo/sarco plásmico. La transferencia de calcio desde el retículo a la mitocondrias ocurre a través de la interacción mitocondria-RE. El calcio se libera del retículo a la mitocondria a través del receptor inositol 1,4,5 - trifosfato (IP3-R). La proteína 75 regulada por glucosa (GRP75) es una proteína mitocondrial chaperona que media la interacción molecular entre IP3R y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que esta en la membrana externa de la mitocondria. El aumento de la concentración de calcio mitocondrial activa las deshidrogenasas mitocondriales y aumenta la fosforilación oxidativa, aumentando el consumo de oxígeno y la producción de ATP. Figura adaptada de (Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. Front Cell Dev Biol. 2014;2:72.).

1.4. Dinámica mitocondrial de fusión y fisión y su potencial rol en el metabolismo de sustratos.

Las mitocondrias son organelos dinámicos; dentro de estos fenómenos dinámicos se encuentra la fusión y fisión mitocondrial. La fusión mitocondrial esta regulada por las proteínas mitofusinas 1/2 (Mfn1 y Mfn2; ubicadas en la membrana mitocondrial externa) y la proteína de atrofia óptica 1 (Opa1; ubicada en la membrana mitocondrial interna) (25) **(Figura 2)**. La fusión mitocondrial es necesaria para el intercambio de componentes

mitocondriales, lo que apoya múltiples elementos de la biología mitocondrial, como la integridad del ADN mitocondrial, la respiración mitocondrial, el potencial de membrana mitocondrial y eventos de señalización como oscilaciones de calcio (25). Por otro lado, la fisión mitocondrial depende del reclutamiento de la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1; una GTPasa citosólica) a la membrana mitocondrial externa, donde forma un complejo con la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) una de las proteínas adaptadoras, lo que permite la fisión (25) **(Figura 2)**. La fisión mitocondrial es necesaria para la segregación de las mitocondrias dañadas y la redistribución mitocondrial durante la división celular (25). Sin embargo, la fisión mitocondrial esta también asociada con una disminución el la respiración mitocondrial, menor potencial de membrana mitocondrial y menor producción de ATP.

Para medir la fusión y fisión mitocondrial, se utilizan técnicas de microscopía con fotoconversión de proteínas mitocondriales en células vivas (26). Sin embargo, estas mediciones no son posibles de realizar en el músculo esquelético humano, ya que se necesita la transfección de plasmidios. Por lo tanto, se utiliza la morfología mitocondrial, preferentemente evaluada por microscopía electrónica, como un indicador del "fenotipo" de fusión o fisión (27), junto con la medición de proteínas que regulan la fusión y fisión mitocondrial (28, 29, 30). Estas mediciones se realizan bajo el supuesto de que dos mitocondrias fusionadas forman una mitocondria más grandes [mitocondrias con mayor tamaño indican un fenotipo de fusión], y por el contrario, mitocondrias de menor tamaño se forman a partir de la fisión de una gran mitocondria [mitocondrias con menor tamaño indican un fenotipo de fisión].

La fusión y fisión mitocondrial tambien se han asociado al metabolismo de sustratos. Por ejemplo, en ratones después de un ayuno nocturno, cuando predomina la oxidación sistémica de ácidos grasos, las mitocondrias del músculo esquelético presentan un fenotipo de fusión (es decir, mitocondrias más grandes); por el contrario, después de la alimentación, cuando predomina la utilización sistémica de glucosa, aparece un fenotipo de fisión (es decir, mitocondrias más pequeñas) (31). De manera similar, las fibras del

músculo esquelético aisladas de ratón, estimuladas con glucosa presentan un fenotipo mitocondrial fisionado (26). Además, en células MEF, la fusión mitocondrial es necesaria para la oxidación de ácidos grasos desde las gotas de lípidos en periodos de inanición como el ayuno (32), y cuando la fusión mitocondrial es inhibida, la producción de ATP pasa a ser de predominancia glicolítico (33). Todo lo anterior sugiere que la fusión mitocondrial juega un rol en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético, y que, por el contrario, la fisión mitocondrial juega un rol en la producción de ATP desde la glucosa, tanto por la vía glicolítica como oxidativa.

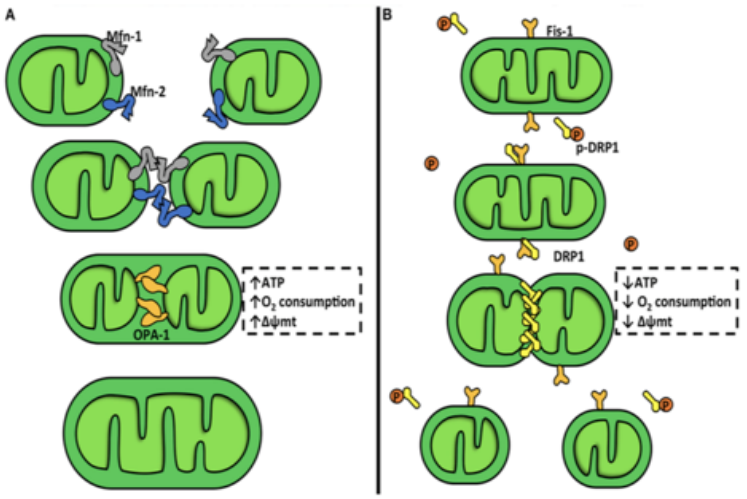


Figura 2. Dinámica mitocondrial de fusión y fisión. (A) La fusión mitocondrial esta regulada por las proteínas mitofusina 1/2 (Mfn-1 y Mfn-2) y la proteína de atrofia óptica-1 (OPA-1). Las proteínas Mfn1 y Mfn2 regulan la fusión de las membranas mitocondriales externas y OPA-1 la de las membranas internas. La fusión mitocondrial se asocia con un aumento en el potencial de membrana mitocondrial, mayor consumo de oxígeno y mayor producción de ATP. (B) La fisión mitocondrial esta regulada por la proteína 1 relacionada con la dinamina (DRP-1) y la proteína de fisión 1 (FIS-1). La fisión mitocondrial depende del reclutamiento de Drp1 desde el citosol a la membrana mitocondrial externa, don forma un complejo con Fis 1. La fisión mitocondrial se asocia con una disminución del potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxígeno y menor producción de ATP. Figura adaptada de Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. Front Cell Dev Biol. 2014;2:72.

1.5. La interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y la dinámica mitocondrial de fusión y fisión como fenómenos acoplados con un potencial rol en el metabolismo de sustratos.

Un reciente estudio en una línea celular hepática humana sugiere que los fenómenos de interacción mitocondria-RE y dinámica mitocondrial de fusión y fisión podrían estar acoplados (24). Estos investigadores observaron que la inhibición de la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria, usando XeC, disminuye la interacción entre mitocondria-RE y el fenotipo de fusión mitocondrial (24). Estos hallazgos llevaron a los autores a postular que en el hígado, la interacción mitocondria-RE puede regular la dinámica mitocondrial de fusión y fisión, y ambos fenómenos acoplados jugar un rol en el metabolismo de sustratos **(Figura 3)**. **Esta posibilidad no se ha estudiado en el músculo esquelético humano.**

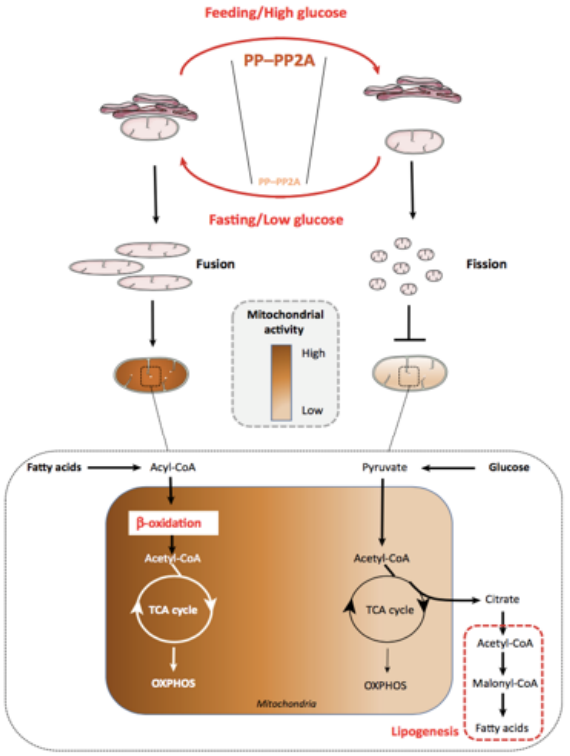


Figura 3. Modelo propuesto para la regulación de la oxidación de sustratos mediante la interacción entre mitocondria y retículo endoplásmico y la dinámica mitocondrial en hígado. La transición del ayuno al estado postprandial, así como el aumento de los niveles de glucosa, reduce las interacciones mitocondrias-ER y a su vez induce la fisión de las mitocondrias y reduce la respiración en los hepatocitos (21). CoA, coenzima A; OXPHOS, fosforilación oxidativa.

1.6. Resumen de antecedentes.

En resumen, estudios en el músculo esquelético de ratón, sugieren que la dinámica mitocondrial de fusión y fisión desempeña un papel en el metabolismo de sustratos. Además, estudios en hígado de ratón sugieren que la interacción mitocondria-RE y la dinámica mitocondrial de fusión y fisión son fenómenos acoplados, y desempeñan un papel en el metabolismo de sustratos. Sin embargo, no se han reportado estudios que evalúen el potencial rol de la interacción mitocondria-RS y la fusión mitocondrial, en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético humano. **En esta tesis proponemos estudiar la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y la dinámica mitocondrial en el metabolismo de sustratos.** Esta investigación pretende aportar en el entendimiento de los potenciales mecanismos celulares que regulan la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético humano en reposo, se correlacionan directamente con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio.

2.2.Objetivo general

Demostrar que existe una correlación directa entre la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico y el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético humano en reposo, con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio.

2.3.Objetivos específicos

1. Evaluar si existe una correlación directa entre la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético en reposo y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio.
2. Evaluar si existe una correlación directa entre el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético en reposo y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio.
3. Medir *in vitro* el rol de la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en la respuesta dinámica de las mitocondrias frente a la exposición a ácidos grasos en células musculares humanas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Objetivo específico 1*

3.1.1. Sujetos de estudio: Se incluyeron 12 hombres voluntarios, sin patologías metabólicas diagnosticadas, y con un IMC ≤ 30. Los voluntarios fueron invitados a participar y firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio. Esta investigación fue aprobada por el comité de ética científica de la Universidad Finis Terrae.

3.1.2. Protocolo de investigación: Al llegar los voluntarios al laboratorio, se les evaluó el CR cuerpo completo en ayuno y en posición de reposo, para determinar la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de glucosa cuerpo completo. Inmediatamente después de la evaluación del CR cuerpo completo, los sujetos se recostaron en una camilla y se les tomó una biopsia del músculo vasto lateral de la pierna dominante. En el músculo obtenido mediante la biopsia se evaluó la interacción entre las mitocondrias y el RS a través de imágenes obtenidas desde un microscopio electrónico de transmisión. Posterior a la biopsia, los sujetos realizaron un ejercicio aeróbico, en donde también se evaluó el CR cuerpo completo.

3.1.3. Medición antropométrica y análisis de sangre: La estatura fue medida con en estadiómetro manual y la masa corporal en una báscula eléctrica. Con estos valores se calculó el índice de masa corporal (IMC). Además, a los voluntarios incluidos en el estudio se les tomó una muestra de sangre, en la cual se les midió la concentración de insulina (quimioluminiscencia), triglicéridos, colesterol total y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (Bionet, Santiago, Chile).

3.1.4. Evaluación del consumo máximo de oxigeno ($VO_{2máx}$): El $VO_{2máx}$ se evaluó en un carro metabólico, respiración por respiración (Ergocard, Medisoft, Bélgica). El analizador de gases se calibró antes de cada medición (sensor de flujo) con una jeringa de 3 L y los sensores de gases con gases estandarizados [16% O_2 y 4% CO_2]). El $VO_{2máx}$ se determinó durante una prueba incremental en bicicleta estática. Se consideró que los

sujetos alcanzaron el $VO_{2máx}$ cuando se cumplieron dos de los siguientes criterios: (a) meseta en VO_2 a pesar de los aumentos en la carga de trabajo; (b) CR ≥ 1,10; y (c) alcanzar la frecuencia cardíaca máxima estimada (220 lpm - edad en años) (34).

3.1.5. Medición del cociente respiratorio en reposo: El CR cuerpo completo se evaluó con un carro metabólico (Ergocard, Medisoft, Bélgica), calibrado previo a cada evaluación (sensor de flujo) con una jeringa de 3 L y los sensores de gases con gases estandarizados [16% O_2 y 4% CO_2]). El CR se calculó como la proporción entre el VCO_2 y el VO_2 (VCO_2/VO_2)(12), mientras más cerca de 0.7 es el CR, la oxidación de ácidos grasos es relativamente mayor a la oxidación de glucosa y mientras que, más cercano a 1 es el CR, la oxidación de glucosa es relativamente mayor a la oxidación de ácidos grasos (12). Para evaluar el CR en reposo, posterior a 12 horas de ayuno, los sujetos descansaron en posición supina durante 30 minutos con la máscara del analizador de gases puesta. Se consideró el promedio de los últimos 5 minutos de medición para el análisis, es decir desde el minuto 25 al 30. Se aconsejó a los participantes a que mantuvieran su dieta habitual, sin cambiar el tamaño y tipo de alimentos, y que se abstuvieran de hacer ejercicio 48 h antes de las mediciones del CR.

3.1.6. Biopsia del músculo esquelético: Se obtuvieron biopsias del vasto lateral de la pierna dominante en el punto medio entre la espina ilíaca superior y la rótula. Para esto se utilizó la técnica de aguja Bergstrom con succión (35). Después de aplicar anestesia local (2% de lidocaína), se hizo una pequeña incisión en la piel y la fascia, y se insertó la aguja de biopsia en el músculo. Se extrajeron aproximadamente 100 mg de tejido mediante succión manual. Desde el tejido extraído se procedió a sacar el exceso de sangre, la grasa visible y el tejido conectivo. Todas las biopsias se obtuvieron en reposo entre las 8:00 a.m. y las 9:00 a.m. La mitad del tejido muscular se fijó en glutaraldehído al 2% para análisis de microscopía electrónica de transmisión; y la otra mitad se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a –80 ° C para ser usada en la técnica Western blot.

3.1.7. Medición del cociente respiratorio durante el ejercicio: Posterior a la realización de la biopsia, los participantes se ejercitaron en cicloergómetro al 50% del VO2máx hasta

alcanzar un gasto energético total de 600 kcal. Para el análisis estadístico se utilizó el promedio del CR durante el ejercicio.

3.1.8. Evaluación de la interacción entre las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico por microscopía electrónica de transmisión: El tejido obtenido de la biopsia se fijó a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2% por 48 horas, posterior a esto, se diseccionó en haces de fibras. Estos haces fueron lavados cuatro veces con un tampón de cacodilato de sodio 0,1 M y se tiñeron con tetróxido de osmio al 2% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M durante 2 h. Luego las muestras se lavaron con agua y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% durante 2 h. Las muestras teñidas se deshidrataron en una serie de diluciones de acetona y se empaparon en Epon. Por último, se cortaron secciones de 80 nm, se montaron en rejillas de microscopía electrónica y se examinaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Philips, Tecnai 12 a 80 kV) en el Centro de Microscopía de la P. Universidad Católica de Chile. Como se ha establecido, se consideró interacción entre mitocondria y RS, cuando ambos orgánulos estaban a una distancia ≤ 0,05 μm (19, 20). La distancia utilizada para el análisis estadístico fue obtenida a través del promedio de 3 lecturas de distancia entre ambos organelos, distribuidas uniformemente a lo largo de la interfaz, como se muestra en la **Figura 5 A** (19, 20). El porcentaje de la mitocondria interactuando con el RS, se evaluó como el porcentaje de la superficie de la mitocondria cubierto por el RS, siendo el 100%, el perímetro total de la mitocondria **(Figura 5 B)** (19, 20). La interacción entre mitocondria-RS fue evaluada en tres fibras musculares por sujeto utilizando el software Fiji/ImageJ (19).

3.2.*Objetivo específico 2*

Las biopsias obtenidas en el objetivo 1, fueron utilizadas para medir la morfología mitocondrial y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión a través de Westem blot.

3.2.1. Evaluación de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión: Para la densidad mitocondrial y la densidad de las gotas de lípidos, se dibujó una máscara sobre el área sarcoplásmica más grande de una sección de la fibra y sobre

cada una de las mitocondrias o gotas de lípidos (**Figura 6 A**). El porcentaje del área sarcoplasmática cubierta por mitocondrias o por las gotas de lípidos se utilizó como densidad mitocondrial o de gotas de lípidos (19). El tamaño de las mitocondrias (μm^2) se midió como el área promedio de las mitocondrias en la fibra. La población mitocondrial subsarcolemal se definió como la mitocondria localizada entre el sarcolema y la primera capa de miofibrillas (**Figura 6 B**) (19). La morfología mitocondrial fue evaluada en tres fibras musculares por sujeto utilizando el software Fiji/ImageJ (19).

3.2.2. Evaluación de los niveles de las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión a través de western blot: Las biopsias de los músculos congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 ºC se homogeneizaron usando un homogeneizador eléctrico en un tampón de lisis que contiene: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, NaF 20 mM, $Na_2P_2O_7$ 1 mM, glicerol al 10%, NaCl 150 mM, Na_3VO_4 10 mM, PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidor de proteasas (Complete TM, Roche Applied Science). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se utilizaron los siguientes anticuerpos (diluciones): Mfn 1 (1: 1000, # SC166644, Santa Cruz Biotechnology), Mfn 2 (1: 1000, # AB56889, Abcam), Opa1 (1: 1000, # BD612606, Biosciences), Drp 1 (1: 1000, # SC101270, Santa Cruz Biotechnology), Phospho-Drp1 (Ser616) (1: 1000, # 3455, Cell Signalling), Fis 1 (1: 1000, Enzo Life Sciences # ALX-210-1037) y GAPDH (1: 10000, # 2118, Cell Signalling). GAPDH se utilizó como control de carga. Las bandas de proteínas en las transferencias se visualizaron usando un kit de detección WESTAR Super-nova (Cyanagen, Bolonia, Italia) en película, escaneadas y cuantificadas por densitometría usando el software Image Lab versión 6.0 (Bio-Rad Laboratories CA, EE. UU.). El índice proteico fusión/fisión mitocondrial se calculó como el índice entre las proteínas de fusión y de fisión (ejemplo, Opa1/Fis 1) (36).

3.3. *Objetivo específico 3*.

3.3.1. Preparación de miotubos primarios humanos: Se cultivaron mioblastos en un medio de proliferación DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. Cuando las células llegaron al ~80% de confluencia, el medio

de proliferación se reemplazó por un medio de diferenciación DMEM suplementado con 1% de FBS y 1% de penicilina/estreptomicina. Desde el día 4 posterior al cambio de medio y hasta el día 10, los mioblastos se diferencian a miotubos.

3.3.2. Incubación de los miotubos con glucosa y ácido palmítico: Al día 7 de diferenciación los miotubos fueron incubados por 8 horas, bajo 3 condiciones; 1) condición glucosa; medio DMEM, sin piruvato y sin glutamato, suplementado con 1% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina y glucosa a 10 mM (MeGlu; concentración equivalente a 180 mg/dL), concentración y tiempo previamente utilizadas en fibras aisladas de ratón para inducir fisión mitocondrial (26); 2) condición ácido graso; medio DMEM sin glucosa, sin piruvato y sin glutamato, suplementado con 1% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina y ácido palmítico a 0.6 mM (AcidPal), concentración utilizada en miotubos humanos para inducir oxidación de AcidPald (8); y 3) condición ácido graso+XeB, medio DMEM sin glucosa, sin piruvato y sin glutamato, suplementado con 1% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina y AcidPal 0.6 mM + xestoponginaB 1 µM (AcidPal+XeB), concentración de XeB previamente utilizadas en hepatocitos para disminuir la interacción por calcio entre el retículo y la mitocondria (22). En los miotubos incubados bajo estas 3 condiciones, se analizó la morfología mitocondrial y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión, utilizando las estrategias experimentales previamente detalladas en el objetivo 1.

3.3.3. Preparación de los miotubos humanos para microscopía electrónica de transmisión: Los miotubos primarios al día 7 de diferenciación y posterior a las 8 horas con los diferentes medios (Glu, AcidPal o AcidPal+XeB) se despegaron de la placa con tripsina, se agregaron a un tubo falcon y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos. Posterior a esto, el pellet se lavó 3 veces con PBS y se fijó a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2% por 48 horas. Posterior a esto, el pellet se diseccionó en haces de fibras, estos haces fueron lavados cuatro veces con un tampón de cacodilato de sodio 0,1 M y se tiñeron con tetróxido de osmio al 2% en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M

durante 2 h. Luego las muestras se lavaron con agua y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% durante 2 h. Las muestras teñidas se deshidrataron en una serie de diluciones de acetona y se embebieron en Epon. Por último, se cortaron secciones de 80 nm, se montaron en rejillas de microscopía electrónica y se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido CrossBeam en modo de uso de "Scaninng Transmission Electron Micrsocopy" (AURIGA Zeiss, STEM 20 kV) en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad Austral de Chile. Los análisis morfométricos de las mitocondrias en los miotubos se realizaron en secciones longitudinales utilizando el software Fiji/ImageJ (19). Para la densidad mitocondrial, se dibujó una máscara sobre el área sarcoplásmica más grande de una sección de la célula y sobre cada una de las mitocondrias (**Figura 6**). El porcentaje del área sarcoplasmática cubierta por mitocondrias se utilizó como el equivalente 2D de la densidad mitocondrial (19). El tamaño de las mitocondrias (μm^2) se midió como el área promedio de las mitocondrias en la célula. La morfología mitocondrial fue evaluada en tres células por sujeto (19).

3.3.4. Preparación de los miotubos humanos para western blot: Los miotubos primarios al día 7 de diferenciación y posterior a las 8 horas con los diferentes estímulos (Glu, AcidPal o AcidPal+XeB) se despegaron de la placa con tripsina, se agregaron a un tubo falcon y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos. Posterior a esto, las células se homogeneizaron en tampón de lisis (descrito en el objetivo 2), se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se utilizaron los siguientes anticuerpos (diluciones): Mfn 2 (1: 1000, # AB56889, Abcam), Opa1 (1: 1000, # BD612606, Biosciences), Fis 1 (1: 1000, Enzo Life Sciences # ALX-210-1037) y GAPDH (1: 10000, # 2118, Cell Signalling). GAPDH se utilizó como control de carga. Las bandas de proteínas se visualizaron como se describió en el objetivo 2.

3.4. Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio [desviación estándar] y en el estudio *in vitro* como mediana [rango intercuartil]. Las correlaciones entre las variables de estudio (objetivo 1 y

2) se evaluaron con la prueba de Pearson. Las diferencias entre las condiciones en el objetivo 3 (estudio *in vitro*) fueron testeadas con el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis para medidas repetidas, y en el caso que el valor *P* fuera < 0,05 las comparaciones múltiples se testearon con el test estadístico de Dunn´s *post hoc*. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Para los análisis se utilizó el Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

4. RESULTADOS

4.1. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y las características de los sujetos.

En la **Tabla 1** se encuentra la edad de los participantes, sus características antropométricas y musculares medidas desde las imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

Tabla 1. Características de los sujetos.

	Promedio [DS] (n=12)
Edad (años)	24,7 [1,5]
Índice de masa corporal	24,4 [2,6]
Glucosa (mg/dL)	86,9 [6,8]
Insulina (µUI/mL)	8,9 [7,6]
HOMA-IR	2,0 [2,0]
Triglicéridos (mg/dL)	102 [53]
Colesterol total (mg/dL)	185 [38]
LDL-C (mg/dL)	114 [35]
HDL-C (mg/dL)	51 [14]
VLDL (mg/dL)	21 [11]
CR reposo	0,85 [0,06]
CR ejercicio	0,88 [0,05]
Ambas poblaciones mitocondriales	
Tamaño de las mitocondrias (μm^2)	0,13 [0,04]
Densidad mitocondrial (%)	6,4 [2,4]
Mitocondrias intermiofibrilares	

Tamaño de las mitocondrias (µm^2)	0,11 [0,04]
Densidad mitocondrial (%)	5,0 [1,7]
Mitocondrias Subsarcolemales	
Tamaño de las mitocondrias (µm^2)	0,16 [0,05]
Densidad mitocondrial (%)	1,4 [0,9]
Mitocondrias interactuando con RS (%)	74 [16]
Distancia entre la mitocondria y el RS (µm)	0,018 [0,006]
% de la mitocondria interactuando con el RS	17,3 [1,9]

DS, Desviación Estándar; RS, Retículo sarcoplásmico; CR, cociente respiratorio.

No encontramos correlación entre la edad de los participantes, sus características antropométricas, ni de salud metabólica sistémica con el el CR cuerpo completo en reposo (**Tabla 2**). Sin embargo, el IMC (r=0,58, *P*=0,04, **Tabla 2**) y el HOMA-IR (r=0,57, *P*=0,05, **Tabla 2**) se correlacionaron directamente con el CR cuerpo completo evaluado durante el ejercicio. El CR cuerpo completo en reposo se correlacionó directamente con el CR cuerpo completo durante el ejercicio (r=0,68, *P*=0,02). Además, el CR en reposo y el CR durante el ejercicio, se correlacionan directamente con la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético (**Figura 4 A-C**).

Tabla 2. Correlación de Pearson entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y las características de los sujetos.

	CR reposo	CR durante el ejercicio
Edad (años)	-0,05	0,20
Peso (kg)	0,28	0,57[A]
Índice de masa corporal	0,23	0,58*
Glucosa (mg/dL)	0,16	0,44
Insulina (µUI/mL)	0,28	0,54[A]
HOMA-IR	0,30	0,57[A]
Triglicéridos (mg/dL)	0,04	0,31
Colesterol total (mg/dL)	-0,16	0,04

LDL-C (mg/dL)	-0,06	0,03
HDL-C (mg/dL)	-0,33	-0,19
VLDL (mg/dL)	0,04	0,31
Los valores representan el valor r. $^{A}P<0,09$, $*P<0,05$. CR, cociente respiratorio.		

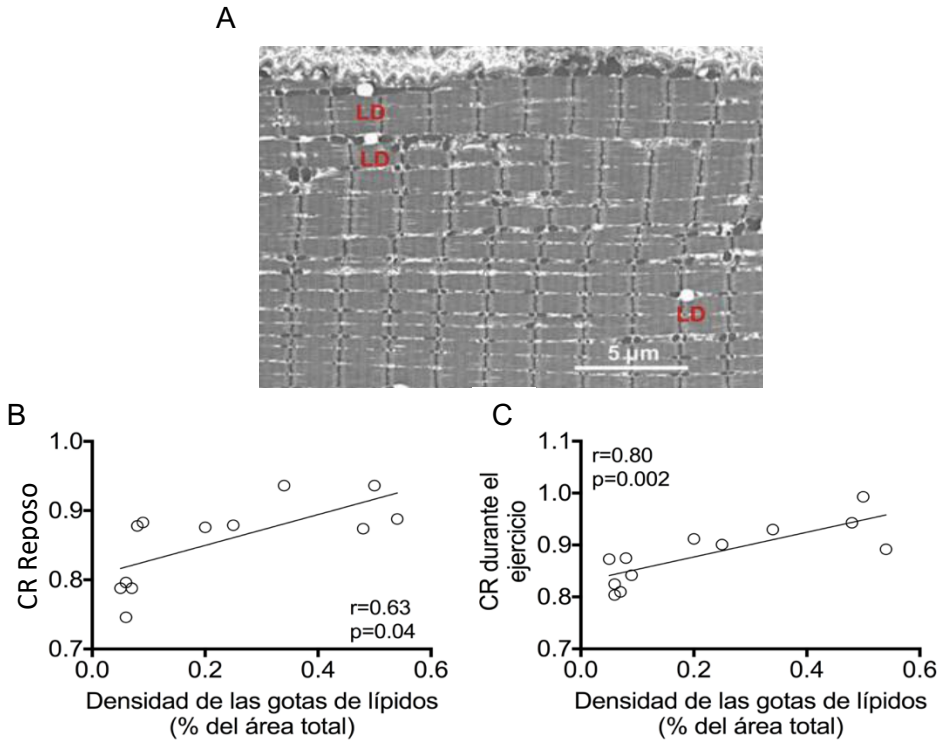


Figura 4. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio con la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano en reposo. Imágen representativas de las gotas de lípidos en el músculo esquelético (A). Correlación entre el CR en reposo con la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético (B). Correlación entre el CR durante el ejercicio con la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético en reposo (C). n=12 sujetos, 3 fibras por sujeto. CR, cociente respiratorio; LD (*Lipid Droplets*), gotas de lípidos.

4.2. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo.

Para evaluar la interacción mitocondria-RS en el músculo esquelético en reposo utilizamos los tres parámetros clásicos de interacción mitocondria-RS (19, 20); 1) La distancia entre la mitocondria y el RS; para la estadística se utilizó el promedio de la distancia entre los organelos. Para esto fueron evaluadas todas las mitocondrias, en las cuales el RS estuviera a una distancia ≤ 0,05 μm (**Figura 5 A).** 2) El porcentaje de la superficie mitocondrial interactuando con el RS; para la estadística se utilizó el promedio de interacción de todas mitocondrias, en las cuales el RS estuviera a una distancia ≤ 0,05 μm (**Figura 5 B**); y 3) El porcentaje de mitocondrias interactuando con RS; se consideró interacción cuando ambos organelos estaban a una distancia ≤ 0,05 μm. La repetibilidad de las mediciones se encuentran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Repetibilidad de las mediciones realizadas en las imágenes de microscopía electrónica.

Variables	Coeficiente de correlación intraclase		CV (%)	
	Coeficiente	95% IC	Promedio	DE
Tamaño de las mitocondrias (μm^2)	0,994	0,986 to 0,997	1,2	1,2
Distancia entre la mitocondria y el RS (μm)	0,862	0,721 to 0,931	13,8	9,4
% de la mitocondria interactuando con el RS	0,943	0,860 to 0,974	4,5	4,5

IC: intervalos de confianza; CV, coeficiente de variabilidad; DE: desviación estándar.

Evidenciamos una correlación inversa, entre el CR cuerpo completo en reposo y el porcentaje de las mitocondrias interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo (r=-0.60, *P*=0.03; **Figura 5 C**). No encontramos correlación entre el CR en reposo cuerpo completo y la distancia promedio entre la mitocondria y el RS (**Figura 5 D**), ni el porcentaje de la superficie mitocondrial interactuando con el RS (**Figura 5 E**). No observamos correlación entre el CR cuerpo completo durante el ejercicio, con ninguno de los parámetros de la interacción mitocondria-RS evaluados en el músculo esquelético en reposo (*P*>0.05; **Figura 5 F-H**).

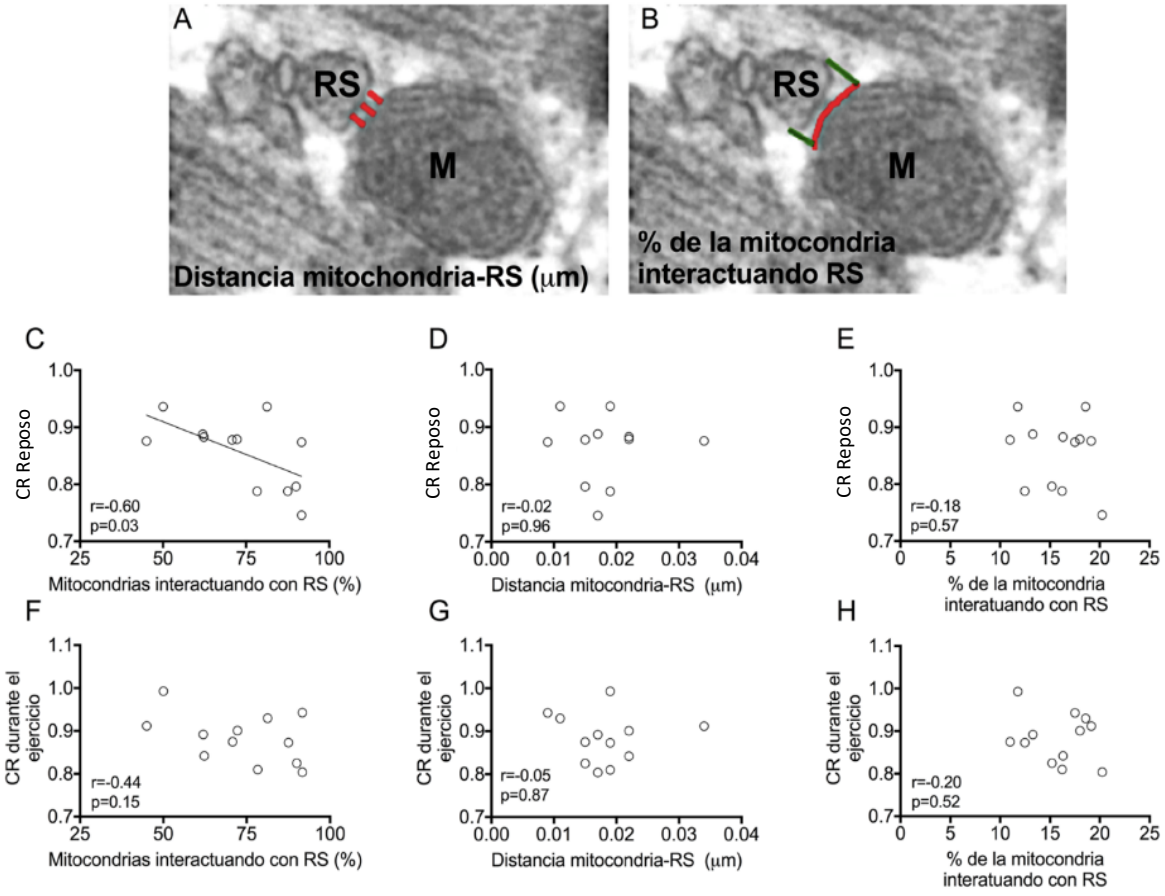


Figura 5. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. Imágenes representativas de la medición de la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS (A, B).

correlación entre el CR cuerpo completo en reposo con el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS, la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo (C-E). correlación entre el CR cuerpo completo durante el ejercicio con el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS, la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo (F-H). Las líneas rojas en A, son indicativas de la distancia entre las mitocondrias y el RS. Las líneas rojas en B, son indicativas del % de la mitocondria interactuando con RS. n=12 sujetos, 3 fibras por sujeto. CR, cociente respiratorio; M, mitocondrias; RS, retículo sarcoplásmico.

4.3. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo y durante el ejercicio y el tamaño de las mitocondrias en el músculo esquelético en reposo.

Encontramos una correlación inversa, entre el CR cuerpo completo en reposo y el tamaño, pero no la densidad, de las mitocondrias intermiofibrilares (IMF, **Figura 6**) en el músculo esquelético en reposo (r=-0.69, *P*=0.01; **Figura 7 E, F**). No encontramos correlación entre el CR cuerpo completo en reposo con la densidad, ni el tamaño de las mitocondrias subsarcolemales (SSM, **Figura 6**), ni la suma de ambas poblaciones mitocondriales en el músculo esquelético en reposo (*P*>0.05; **Figura 7 A-D**). Encontramos resultados similares durante el ejercicio, es decir, solo observamos una correlación inversa, entre el CR cuerpo completo durante el ejercicio y el tamaño de las mitocondrias IMF del músculo esquelético en reposo (r=-0.59, *P*=0.04; **Figura 8**).

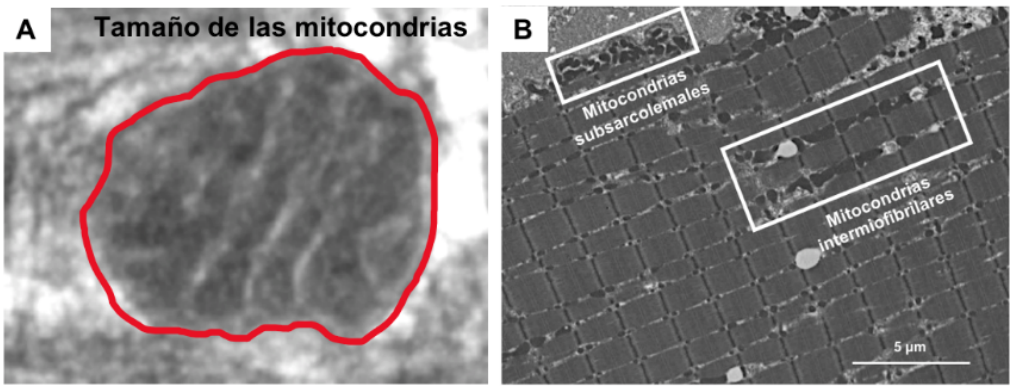


Figura 6. Medición de las diferentes poblaciones mitocondriales en el músculo esquelético humano. Imágenes representativas de la medición del tamaño de las mitocondrias por microscopía electrónica de transmisión en el músculo esquelético humano (A). Imágenes representativas de la población de mitocondrias subsarcolemales y mitocondrias intermiofibrilares en el músculo esquelético humano (B).

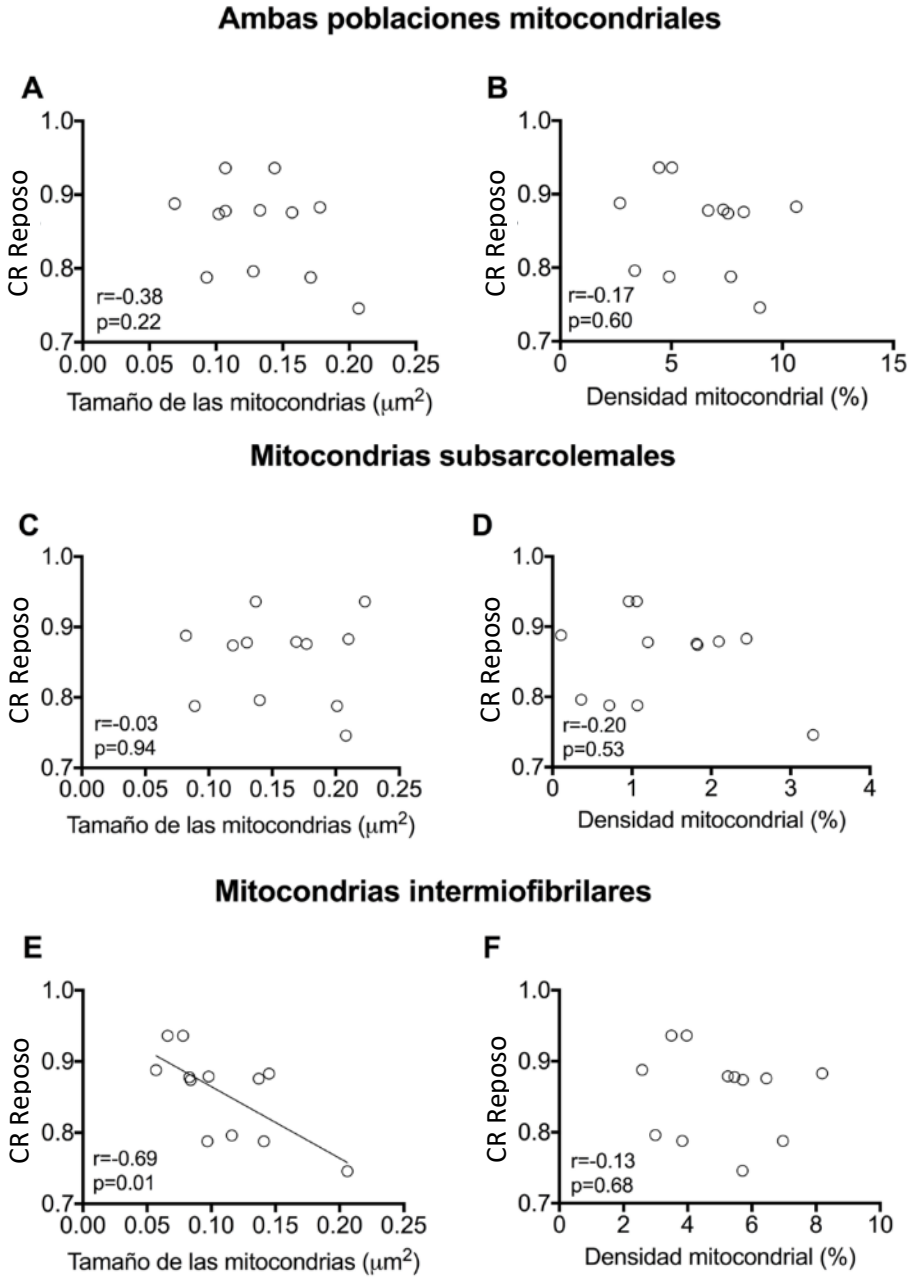


Figura 7. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo en reposo con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. correlación entre el CR cuerpo completo en reposo y el tamaño y densidad mitocondrial en ambas poblaciones mitocondriales (A, B), en la población de mitocondrias subsarcolemales (C, D) y en la población de mitocondrias intermiofibrilares (E, F) en el músculo esquelético en reposo. n=12 sujetos, analizando 3 fibras por sujeto.

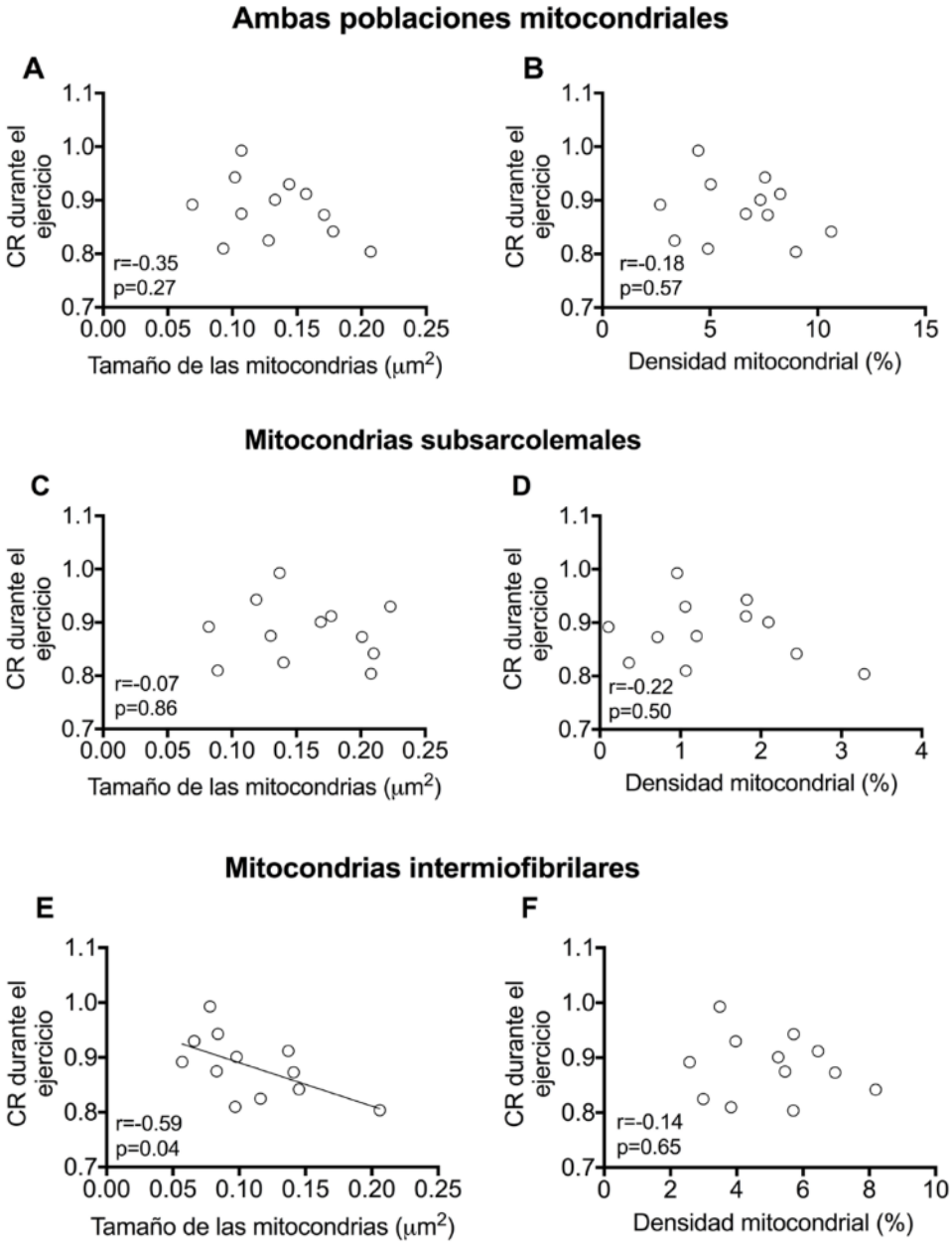


Figura 8. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo durante el ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre el CR cuerpo completo durante el ejercicio con el tamaño y densidad mitocondrial en ambas poblaciones mitocondriales (A, B), en la población de mitocondrias subsarcolemales (C, D) y en la población de mitocondrias intermiofifrilares (E, F) en el músculo esquelético en reposo. n=12 sujetos, analizando 3 fibras por sujeto.

4.4. Correlación entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares y la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano.

La mayor densidad de las gotas lipídicas (LD, *Lipid Droplets*) en el músculo esquelético parece ser un marcador celular de la incapacidad de oxidar ácidos grasos, ya que la mayor densidad está asociada con una baja oxidación relativa sistémica de ácidos grasos en ayuno y durante el ejercicio, sugiriendo una disminución de la capacidad de oxidar ácidos grasos intracelulares. Evaluamos si la densidad de los LD se correlaciona al tamaño de las IMF. Nuestros resultados muestran que la densidad de los LD está correlacionada inversamente con el tamaño de las mitocondrias IMF (r=-0.66, *P*=0.01; **Figura 9**).

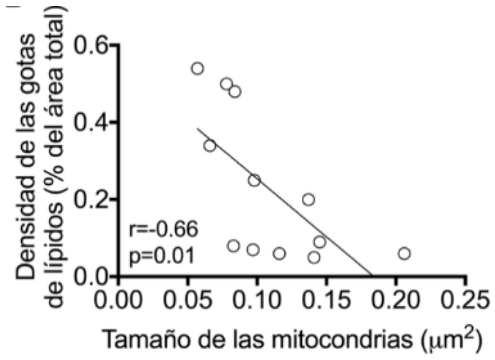


Figura 9. Correlación entre el promedio del tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares de cada sujeto y la densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético humano en reposo. n=12 sujetos, 3 fibras por sujeto.

4.5. Correlación entre el tamaño de las mitocondrias intermiofibrilares y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en el músculo esquelético humano.

El tamaño promedio de las mitocondrias de cada sujeto, no se correlacionó con los niveles de las proteínas que regulan la fusión mitocondrial (Mfn1, Mfn 2, Opa1; imágenes de los Western blot, **Figura 10**), ni con los niveles de las proteínas que regulan la fisión mitocondrial (p-DRP1^{Ser616} y Fis 1; imágenes de los Western blot, **Figura 10**) (P>0.05; **Figura 11 A-E**). La razón de las proteínas Mfn 2/ Fis 1 (fusión/fisión), presenta

correlación directa con el tamaño de las mitocondrias (fenotipo de fusionado) (r=0.61, *P*=0.03; **Figura 11 F**). Esta Correlación no fue detectable al medir la relación entre otras proteínas de fusión/fisión (**Tabla 4**). Con los resultados obtenidos en el objetivo 1 y 2 proponemos el modelo que se encuentra en la **Figura 12**.

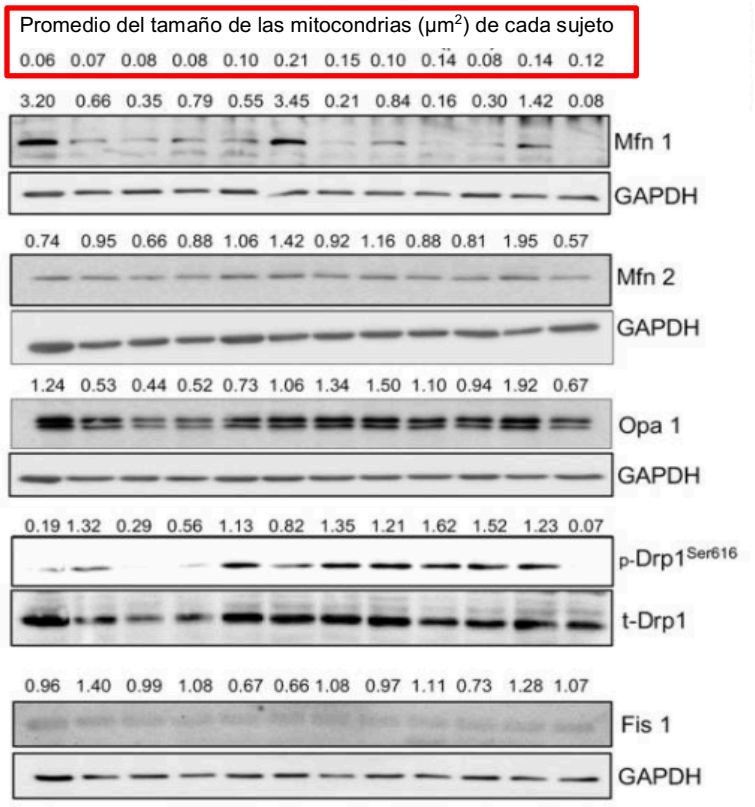


Figura 10. Promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión medidas a través de wester blot en el músculo esquelético humano en reposo. Promedio del tamaño de las mitocondrias por sujeto y Western blot para las proteínas mitofusina 1/2 (Mfn 1 y Mfn 2), proteína de atrofia óptica 1 (Opa1), proteína relacionada a dinámina fosforilada 1 (Ser616; p-Drp1Ser616), Drp1 total (t-Drp1), proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) y GAPDH, correspondiente a cada sujeto. Sobre la marca del Western blot de cada sujeto, se encuentra la cuantificación de la proteína, ajustada a la proteína GAPDH, usada como control de carga. n=12 sujetos.

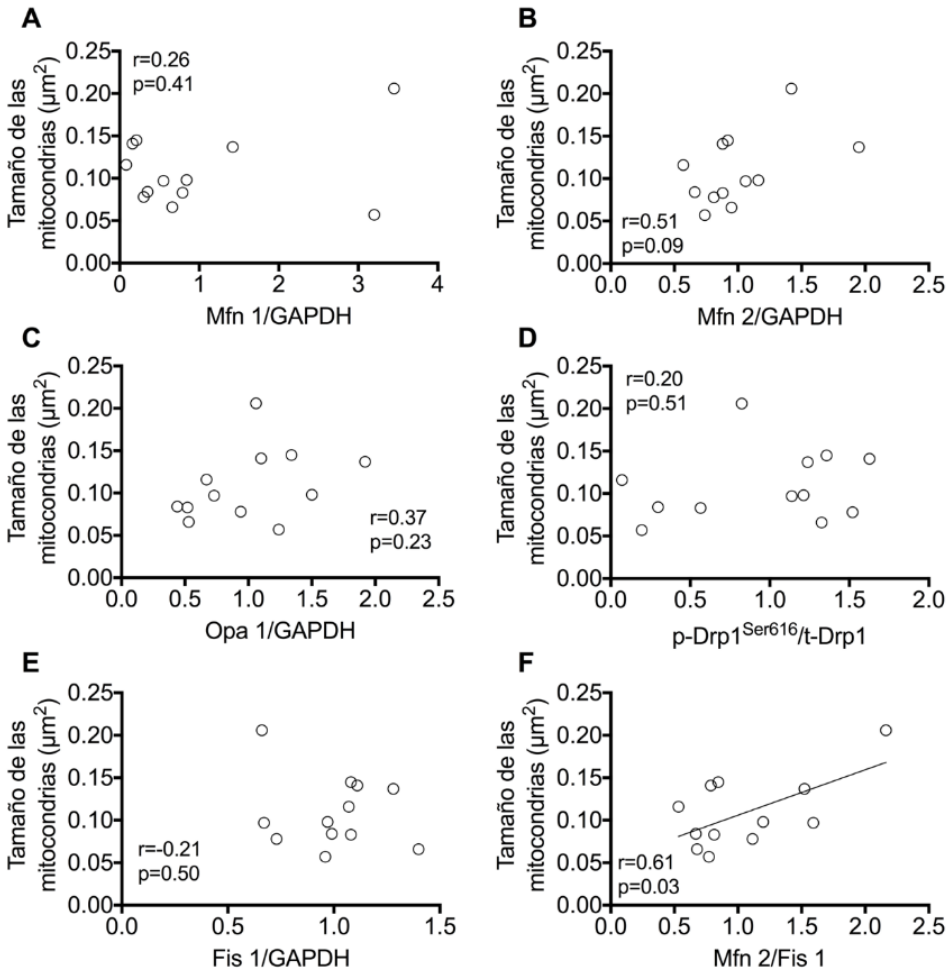


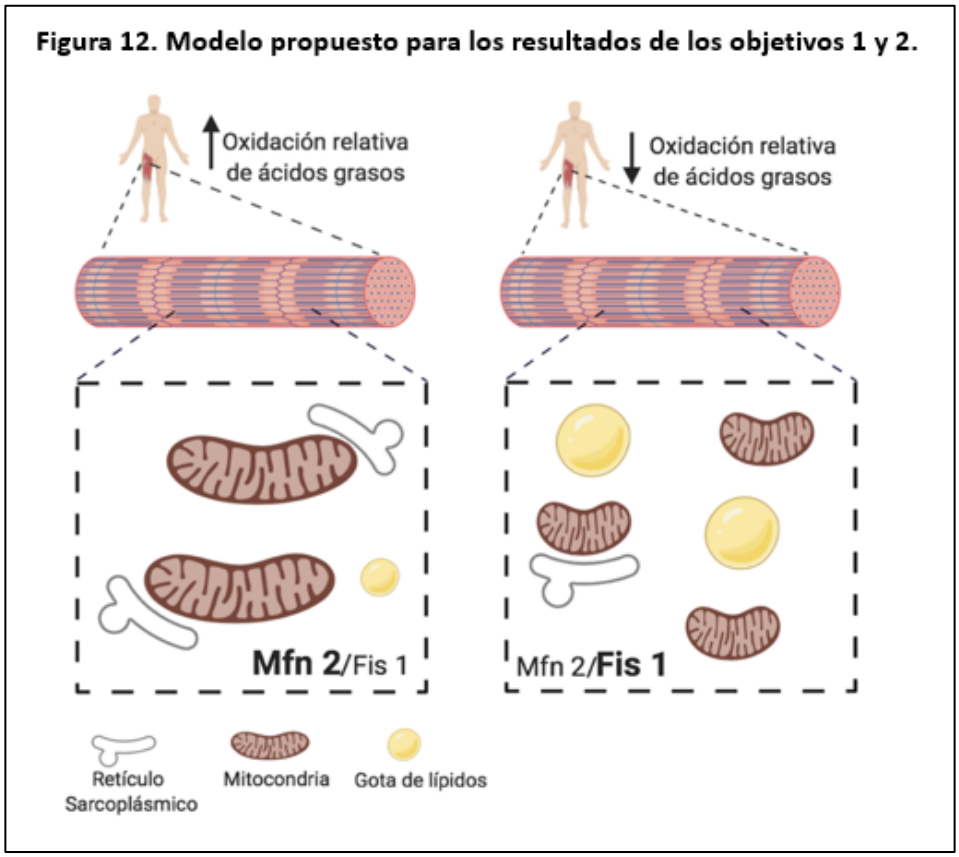
Figura 11. Correlación entre el promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en el músculo esquelético humano en reposo. Fusión (mitofusinas 1/2 [A, Mfn 1 y B, Mfn 2], proteína de atrofia óptica 1 [C, Opa 1]) y fisión (D, proteína relacionada a dinámina fosforilada 1 [Ser616; p-Drp1Ser616], Drp1 total [E, t-Drp1], proteína de fisión mitocondrial 1 [Fis 1]), ajustada a GAPDH. Correlación entre el tamaño de las mitocondrias y proporción Mfn 2/Fis 1 (F). n=12 sujetos.

Tabla 4. Correlación de Pearson entre el promedio del tamaño de las mitocondrias de cada sujeto y la razón de las proteínas de fusión/fisión en el músculo esquelético humano.

Razón proteínas fusión/fisión	Tamaño de las mitocondrias (μm^2)
Mfn 2/p-Drp1^{Ser616}	-0,05
Mfn 2/Fis 1	0,61*
Mfn 1/p-Drp1^{Ser616}	-0,20
Mfn 1/Fis 1	0,41
Opa 1/p-Drp1^{Ser616}	-0.12
Opa 1/Fis 1	0.48

Los valores representan el valor r. *P<0.05.

Figura 12. Modelo propuesto para los resultados de los objetivos 1 y 2.



4.6. Evaluación de la incubación de miotubos humanos con glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en el tamaño de las mitocondrias.

Para analizar el rol de la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en la respuesta dinámica de las mitocondrias frente a la exposición a ácidos grasos, comparamos, a través de microcopia electrónica de transmisión y Western blot, si las células musculares primarias terminalmente diferenciadas (**Figura 13**) de 3 voluntarios hombres sanos, presentan diferencias en la interacción mitocondria-RS y diferente tamaño de las mitocondrias cuando son incubadas con glucosa, AcidPal (ácido graso saturado de cadena larga) y AcidPal+XeB. Nuestros resultados muestran que la densidad mitocondrial no es diferente luego del estímulo con AcidPal o Glucosa (**Figura 14 A, B**). La estimulación con AcidPal produce mitocondrias con mayor tamaño (fenotipo fusionado), en comparación con las mitocondrias de los miotubos estimulados con glucosa ($P<0.05$; **Figura 14 A, C**). El efecto del AcidPal (mayor tamaño de las mitocondria, en comparación a la glucosa) fue inhibido en presencia de XeB, ya que el tamaño de las mitocondrial de los miotubos estimulados con AcidPal+XeB no fueron diferentes a los estimulados con glucosa ($P>0.05$; **Figura 14 A, C**).

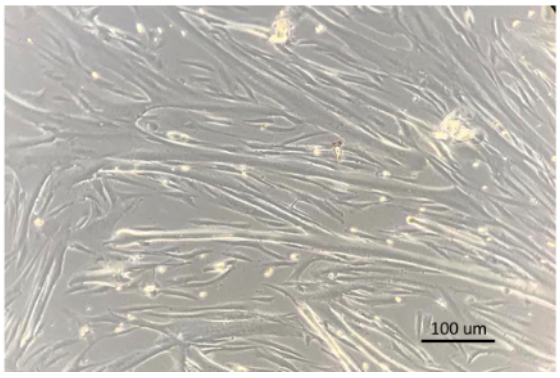


Figura 13. Imagen representativa de miotubos primarios al día 7 de diferenciación.

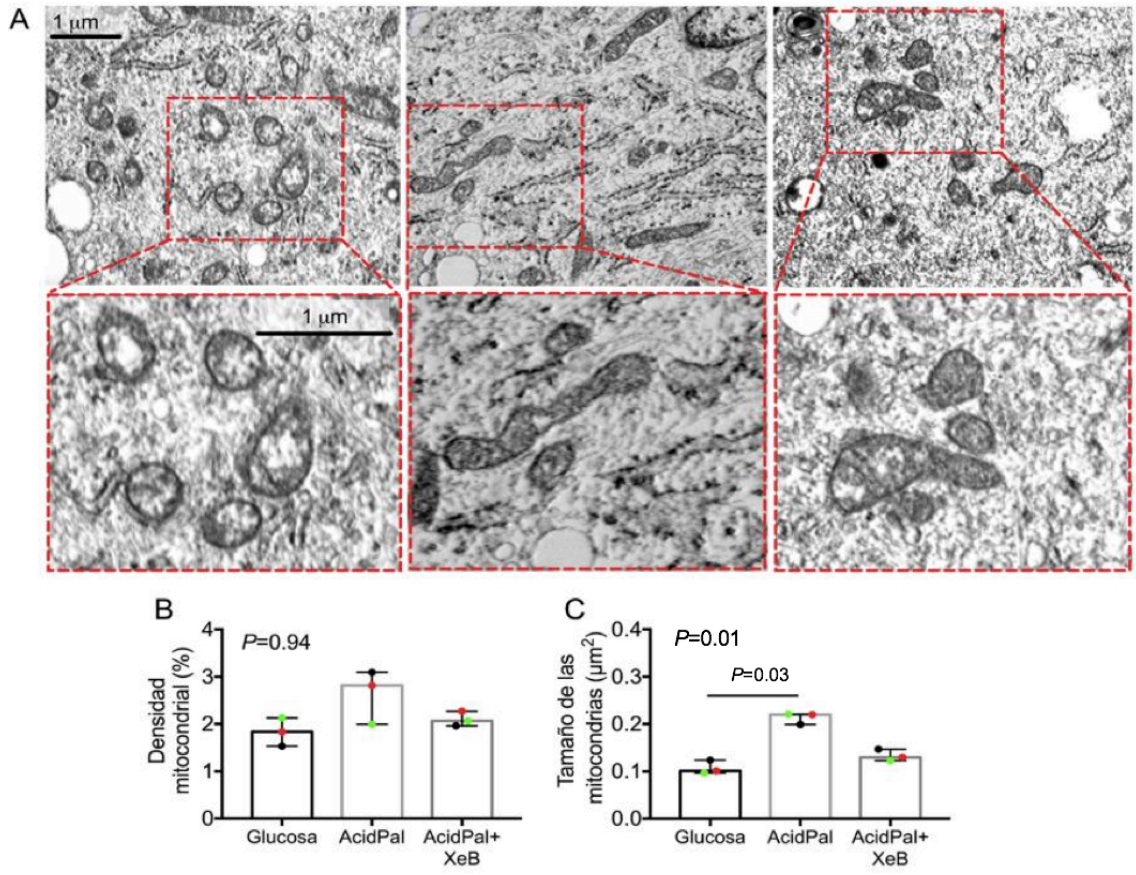


Figura 14. Efectos de la exposición a glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en la densidad mitocondrial y el tamaño de las mitocondrias en células musculares humanas. Imagen representativa de los miotubos cultivados 8 horas con glucosa (10 mM), AcidPal (0,6 mM) y AcidPal +XeB (AcidPal 0.6 mM + xestoponginaB 1 µM) (A). Comparación de la densidad mitocondrial (B) y el tamaño de las mitocondrias (C), de los miotubos de los tres voluntarios, estimulados con glucosa, AcidPal y AcidPal +XeB. AcidPal, ácido palmítico.

4.7. Evaluación de la incubación de miotubos humanos con glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en los niveles de proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión.

No encontramos diferencias entre las tres condiciones en las proteínas de fusión Opa 1 ni Mfn 2, tampoco en la proteína de fisión Fis 1 (P>0.05; **Figura 15 A-D**). Observamos que los miotubos estimulados con AcidPal, presentan una mayor razón de las proteínas Mfn

2/ Fis 1 que los estimulados con AcidPal+XeB (P<0.05; **Figura 15 E**). No encontramos diferencias en la razón Mfn 2/ Fis 1, entre los miotubos estimulados con glucosa, versus los miotubos estimulados con AcidPal, ni con AcidPal+XeB (**Figura 15 E**).

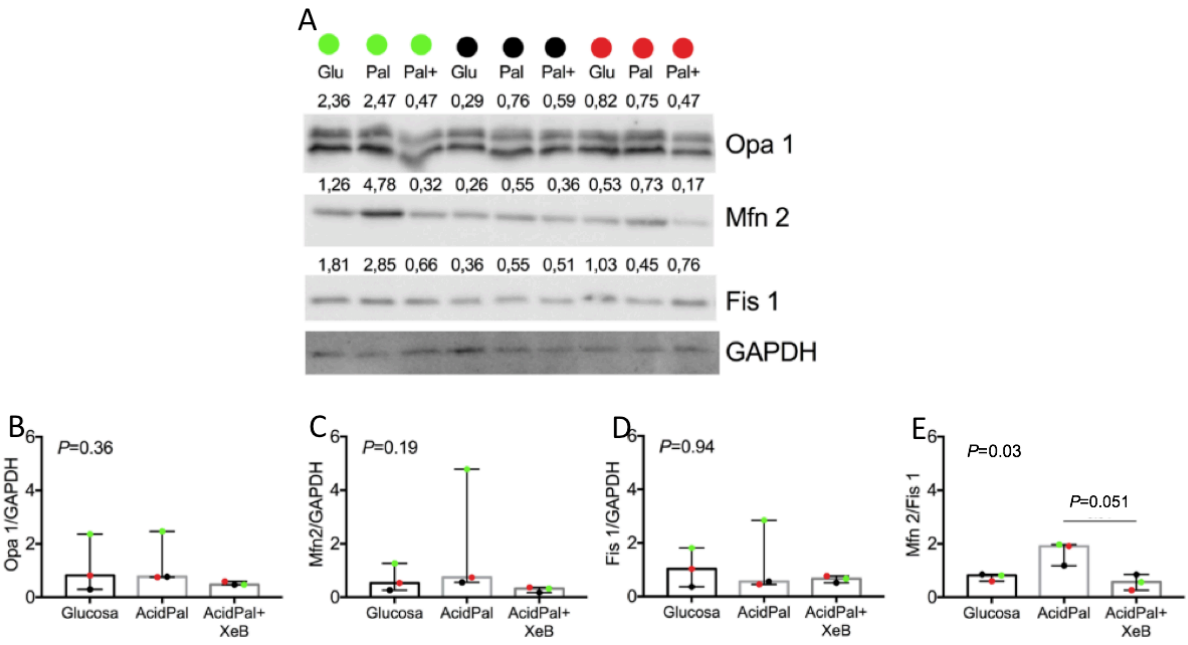


Figura 15. Efectos de la exposición a glucosa, ácido palmítico y ácido palmítico co-incubado con xestoponginaB en las proteínas que regulan la dinámica mitocondrial de fusión y fisión en miotubos humanos. Western blot para las proteínas; atrofia óptica 1 (Opa1), mitofusina 2 (Mfn 2), proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1) y GAPDH, correspondiente a los miotubos de los voluntarios, 1 (verde), 2 (negro) y 3 (rojo), cultivados 8 horas con glucosa (10 mM), AcidPal (0,6 mM) y AcidPal +XeB (AcidPal 0,6 mM + xestoponginaB 1 µM) (A). Sobre la marca del Western blot de cada sujeto, se encuentra la cuantificación de la proteína ajustada a la proteína GAPDH, usada como control de carga (A). Comparación en la expresión de las proteínas Opa1 (B), Mfn 2 (C) y Fis1 (D), ajustadas a GAPDH y la proporción Mfn 2/Fis 1 (E), entre los miotubos de tres voluntarios, estimulados con glucosa, ácido palmítico y AcidPal +XeB. AcidPal, ácido palmítico.

4.8. Estudio complementario en células mononucleares humanas.

De manera de complementar los resultados obtenidos en el músculo esquelético de humanos y células primarias proveniente de humanos, hemos querido estudiar otras células (células mononucleares de sangre periférica [CMSP]) que son por su naturaleza un buen marcado sistémico de la respuesta celular a la exposición a diferentes sustratos energéticos. Para ello, 6 sujetos sanos, se sometieron a un ayuno prolongado (16 horas; mayor oxidación de ácidos grasos) y posterior a ello, consumieron una carga oral de 75 g de glucosa (mayor oxidación de glucosa). Se extrajo sangre, para obtener CMSP, y fue evaluado el CR, para medir la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos, después del ayuno y 45 minutos posterior a la carga de glucosa. Como era esperable, el CR fue mayor posterior a la carga de glucosa en comparación al CR en ayuno (P=0.01; **Figura 16 A**). Posterior a la carga de glucosa, las mitocondrias de las CMSP aumentan su distancia (P=0.003; **Figura 16 B, C**) y disminuyen su interacción con el RE (P=0.007; **Figura 16 B, D**), en comparación a las CMSP extraídas después de un ayuno prolongado. Además, las mitocondrias de las CMSP extraídas posterior a una carga de glucosa, presentan un fenotipo fisionado (P=0.009; **Figura 17 A, D**), en comparación a las CMSP extraídas en ayuno prolongado, sin modificaciones en la densidad mitocondrial (P=0.33; **Figura 17 A, B**).

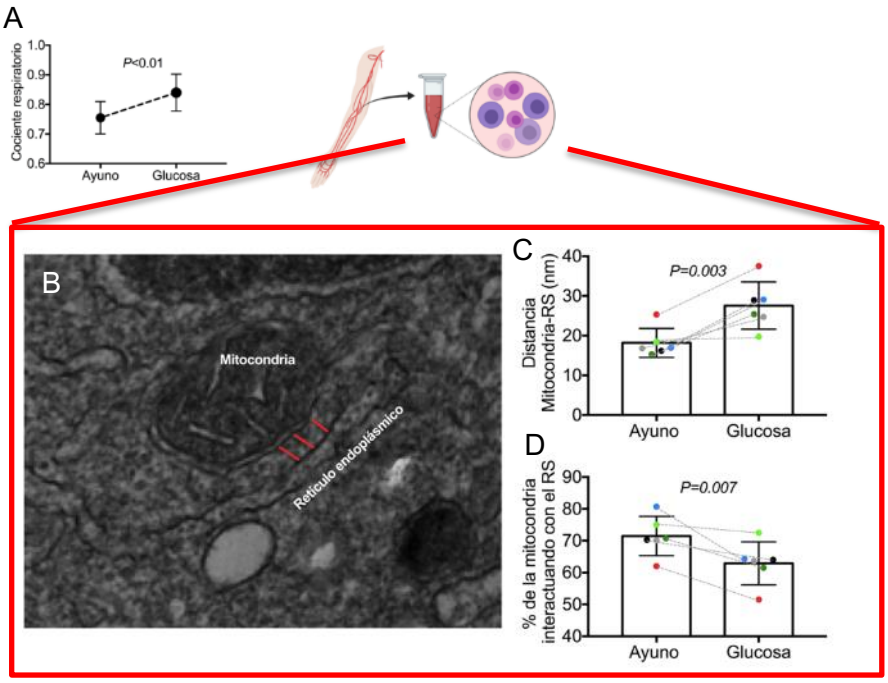


Figura 16. Interacción entre mitocondria y retículo endoplásmico en ayuno y posterior al consumo de glucosa en CMSP humanas. Cociente respiratorio después de un ayuno de 16 horas y 45 minutos posterior a una carga de glucosa (A). Imagen representativa de la interacción mitocondria-RE en CMSP humanas en microscopía electrónica de transmisión (B). Cuantificación de la distancia entre las mitocondrias y el RE (C) y porcentaje de las mitocondrias interactuando con el RE (D). n = 6 hombres sanos, 4-6 células por sujeto, > 5 mitocondrias por célula. Las líneas rojas son indicativas de la distancia entre las mitocondrias y el ER. ER, retículo endoplásmico; CMSP, células mononucleares de sangre periférica. Las comparaciones se realizaron con la prueba t de Stundent pareado.

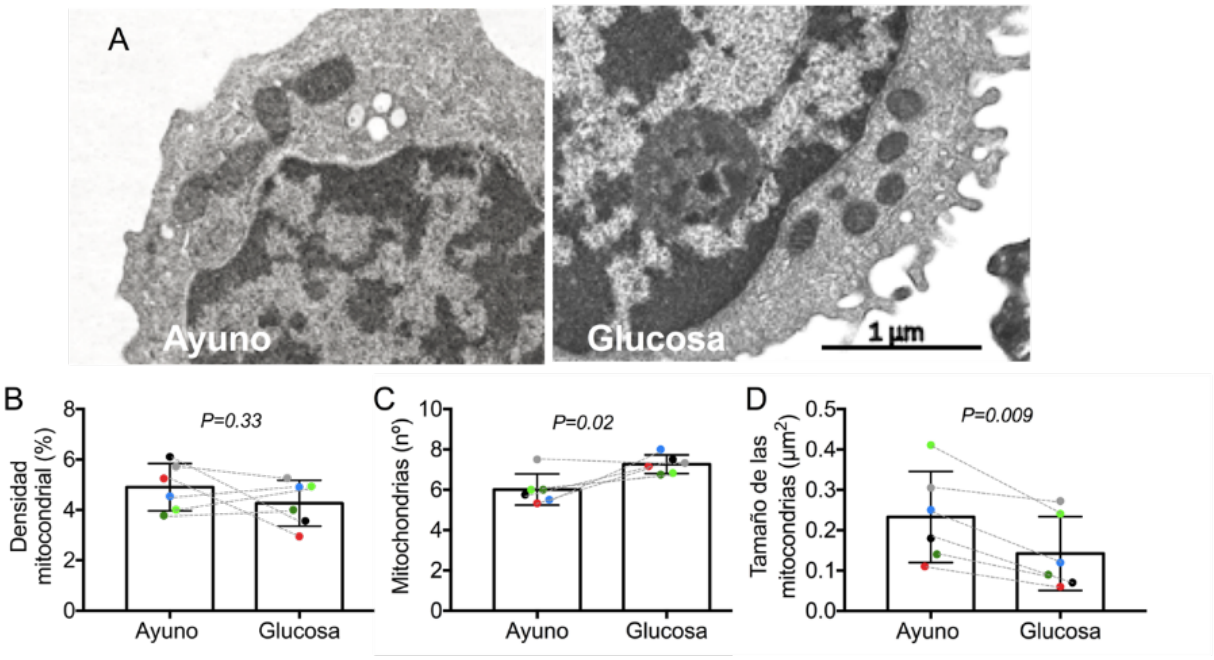


Figura 17. Cambios morfológicos de las mitocondrias, después de un ayuno prolongado y posterior al consumo de glucosa en CMSP humanas. Imagen representativa de CMSP humanas en microscopía electrónica de transmisión, después de un ayuno de 16 horas y 45 minutos posterior a una carga de glucosa (A). Efectos del ayuno y el consumo de glucosa sobre la densidad de las mitocondrias (B), número de mitocondrias (C) y el tamaño de las mitocondrias (D) de CMSP humanas. n=6 hombres sanos, 4-6 células por sujeto, > 5 mitocondrias por célula. CMSP, células mononucleares de sangre periférica. Las comparaciones se realizaron con la prueba t de Stundent pareado.

5. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran una correlación directa entre la interacción mitocondria-RS y el fenotipo de fusión mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo. Observamos una correlación directa entre el fenotipo de fusión mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo durante el ejercicio. Además, demostramos

que la exposición a AcidPal induce un fenotipo de fusión mitocondrial *in vitro*, y que la inhibición de la interacción mitocondria-RS, inhibe el fenotipo de fusión mitocondrial inducido por la exposición a AcidPal. Por lo tanto, proponemos que existe un ciclo de retroalimentación positiva en que la disponibilidad de ácidos grasos induce la interacción mitocondria-RS y de esta manera el fenotipo de fusión mitocondrial, lo que es necesario para la oxidación de ácidos grasos.

Observamos que el CR cuerpo completo en reposo se correlaciona directamente con el CR cuerpo completo durante el ejercicio. Esto concuerda con observaciones previas que muestran que la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo se correlaciona directamente con la oxidación máxima de ácidos grasos durante el ejercicio (37) y que la oxidación de ácidos grasos medida durante 24 horas se correlaciona directamente con la oxidación máxima de ácidos grasos durante el ejercicio (38). En conjunto, estos resultados sugieren que los sujetos con una menor oxidación relativa de ácidos grasos en reposo también tienen una oxidación de ácidos grasos reducida durante el ejercicio, lo cual puede predisponer a la acumulación de especies lipídicas y lipotoxicidad en el músculo esquelético. Confirmando lo anterior, nuestros resultados también muestran que una reducida capacidad de oxidar ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo y durante el ejercicio, se correlaciona con una mayor densidad de las gotas de lípidos en el músculo esquelético.

Nuestros resultados muestran que los sujetos con un mayor porcentaje de mitocondrias interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo, tienen una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo, pero no durante el ejercicio. De este modo demostramos que existe una correlación directa entre ambos fenómenos, aunque solo fue posible demostrar esto en condiciones de reposo. Estos resultados sugieren en conjunto, que la interacción mitocondria-RS en el músculo esquelético podría jugar un rol en la oxidación de ácidos grasos en reposo. Existen varias opciones para explicar por qué no pudimos demostrar una correlación entre la oxidación relativa de ácidos grasos durante el ejercicio y la interacción mitocondria-

RS. La primera explicación se relaciona con el modelo experimental, en que la biopsia fue obtenida en sujetos en reposo y luego se efectuó el ejercicio; es posible que biopsias musculares obtenidas después del ejercicio, exhiban un grado de interacción mitocondria-RS diferente. Para poder responder esta interrogante, se deben hacer estudios en los cuales se evalúe la interacción mitocondria-RS al final del ejercicio. En segundo lugar, la capacidad de oxidar ácidos grasos durante el ejercicio podría ser independiente de la interacción cercana entre las mitocondrias y el RS para la transferencia de calcio, ya que la contracción del músculo esquelético estimula salidas de calcio de mayor amplitud desde el RS para sustentar la contracción muscular (39), lo cual podría facilitar el ingreso de calcio a las mitocondrias. Otros mecanismos como la disposición de sustratos energéticos extracelulares (40) o intracelulares (41), podrían ser factores más relevantes en la oxidación de ácidos grasos durante el ejercicio. Finalmente, no existen estudios que indaguen el mecanismo por el cual una mayor interacción entre mitochodria-RS favorecería la oxidación de ácidos grasos, por sobre la oxidación de glucosa. Sin embargo, es importante señalar que desde el RS no solo se transfiere calcio a la mitocondria, sino que también, fosfolípidos y otros metabolitos (25) que podrían jugar un rol en la preferencia de la oxidación de sustratos.

Nuestros resultados muestran que los sujetos con un mayor fenotipo de fusión mitocondrial en las mitocondrias IMF, pero no SSM en el músculo esquelético en reposo, tienen una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo y durante el ejercicio. Resultados de otras investigaciones apoyan estos hallazgos, pues se ha demostrado que una mayor densidad de las mitocondrias IMF, pero no la de las SSM en el músculo esquelético se asocian a una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo y a una mayor sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético (42). Además, en comparación con las mitocondrias SSM, las IMF expresan un mayor nivel de proteínas asociadas con la fosforilación oxidativa y una mayor actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones (43). Nuestro estudio es el primero

en evaluar el rol del fenotipo de fusión mitocondrial en el músculo esquelético en reposo y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos durante el ejercicio en humanos. Previos estudios en otros modelos de investigación apoyan nuestros resultados, por ejemplo, fue demostrado en el músculo esquelético de ratón, que el fenotipo de fusión mitocondrial es inducido en ayuno, cuando la disponibilidad y la oxidación de ácidos grasos es mayor (31). Además, en células MEF, cuando se inhibe la fusión mitocondrial (silenciando Mfn 1 y Opa 1), disminuye la oxidación de ácidos grasos en periodos de inanición como el ayuno (32). Estos resultados sugieren que la disposición y la oxidación de ácidos grasos se correlaciona causalmente con el fenotipo de fusión mitocondrial en el músculo esquelético.

Otro de nuestros resultados que apoya el rol de la fusión mitocondrial en la oxidación de ácidos grasos, es la correlación inversa encontrada entre la densidad de los LD y el fenotipo de fusión mitocondrial en las mitocondrias IMF en el músculo esquelético. Este resultado sugiere que un disminuido fenotipo de fusión mitocondrial podría explicar la incapacidad de oxidar ácidos grasos desde los LD en reposo y durante el ejercicio. Resultados similares se encontraron en un estudio *in vitro* que demostró en células MEF que durante la inanición, se requiere de la fusión mitocondrial para la oxidación de ácidos grasos desde los LD, dado que la fusión mitocondrial facilita el tráfico y la oxidación de ácidos grasos (32). Estos resultados en conjunto, sugieren que la fusión mitocondrial es necesaria para la oxidación de ácidos desde los LD.

Para entender el mecanismo que regula un mayor fenotipo de fusión en las mitocondrias IMF, en los sujetos con una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos en reposo y durante el ejercicio, medimos los niveles de las proteínas que regulan la fusión y la fisión mitocondrial. Encontramos una correlación directa entre la razón de las proteínas Mfn 2/ Fis 1 con el tamaño de las mitocondrias IMF en el músculo esquelético. Una limitación de nuestro estudio, fue que la medición de las proteínas de dinámica mitocondrial de fusión y fisión se realizaron en el músculo completo, por lo tanto en ambas poblaciones mitocondriales. Sin embargo, las IMF son cercanas al 80 %

del total de las mitocondrias en el músculo esquelético. La mayor importancia de Mfn 2, por sobre Mfn1 y Opa 1 (relación Mfn 2/Fis 1) en el fenotipo de fusión mitocondrial podría explicarse por una mayor abundancia de Mfn 2 en el músculo esquelético por sobre Mfn 1 (ambas proteínas regulan la fusión de las membranas externas de las mitocondrias) (44). Con respecto a Opa 1, la dinámica de la fusión mitocondrial depende de dos fases; 1) fusión de las membranas externas (Mfn 2 y Mfn 1) y 2) posterior fusión de las membranas internas (Opa 1). Una desregulación en la primera fase (disminución Mfn 2) es suficiente para disminuir la fusión mitocondrial (26). Un estudio previo reportó que una intervención de ejercicio disminuye las proteínas de fisión en el músculo esquelético, aumentando el fenotipo de fusión mitocondrial, lo cual fue asociado a un aumento en la oxidación de ácidos grasos sistémico en reposo y al aumento en la sensibilidad a la insulina (45). Por lo tanto, la regulación de las proteínas que regulan el fenotipo de fusión y fisión mitocondrial en el músculo esquelético humano, podrían ser claves en la oxidación de ácidos grasos. Otra limitación en la comprensión del mecanismo del fenotipo de fusión mitocondrial fue no evaluar la regulación post-traduccional de las proteínas que regulan la fusión mitocondrial, como por ejemplo la desacetilación de Mfn 1 (a la fecha no hay anticuerpo comercial), que previamente se demostró juega un rol, en la regulación de la fusión mitocondrial en el músculo esquelético de ratón durante el ayuno (31).

Los resultados del objetivo 1 y 2 son presentados en el modelo que proponemos en la **Figura 12** y sugieren que los sujetos con una mayor interacción mitocondria-RS y un mayor fenotipo mitocondrial fusionado en las mitocondrias IMF presentan una mayor oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo; Con respecto al mecanismo, el fenotipo mitocondrial fusionado se correlaciona con un aumento de la razón Mfn 2/ Fis 1. En resumen, nuestro resultados confirman la hipótesis sobre la correlación entre la interacción mitocondria-RS, fenotipo mitocondrial fusionado y la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo. Fuimos capaces de esta demostración en relación con el reposo, pero no durante el ejercicio. Sin embargo, nuestros datos no demuestran la causalidad de estas correlaciones.

Con el objetivo de acercarnos a demostrar que la interacción mitocondria-RS favorece la fusión mitocondrial en el músculo esquelético humano, en el contexto del metabolismo de sustratos, incubamos células primarias musculares provenientes de humanos sanos con AcidPal, glucosa y AcidPal+XeB. La XeB es un clásico inhibidor de la actividad del IP3-R, el cual es clave en la liberación de calcio desde el RS a la mitocondria, por lo tanto su interacción (22). Nuestros resultados muestran que la disponibilidad de AcidPal induce un fenotipo de fusión mitocondrial en comparación a la disponibilidad de glucosa, y que la disminución de la transferencia de calcio desde el RS a la mitocondria por XeB inhibe el fenotipo de fusión mitocondrial inducido por la disponibilidad de AcidPal. Estos resultados sugieren que la actividad de IP3-R en el retículo es clave para inducir el fenotipo de fusión mitocondrial ante la presencia de ácidos grasos y potencialmente para su oxidación. Previamente no se había testeado el rol de la interacción mitocondria-RS en la inducción de un fenotipo mitocondrial fusionado en células musculares. Sin embargo, en una línea de células hepáticas humanas se observó que la inhibición de la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria, usando XeC, disminuye tanto la interacción entre mitocondria-RE, como el fenotipo de fusión mitocondrial (24). En nuestro estudio, por la limitación técnica de hacer microscopía electrónica en células en cultivo, no pudimos evaluar la interacción mitocondria-RS, ya que, al despegar las células con tripsina, se pierde la estructura de las células. Por otro lado la glucosa parece inducir un fenotipo de fisión mitocondrial lo que está en concordancia con estudios previos, que muestran que las fibras aisladas de ratón presentan un fenotipo mitocondrial fisionado cuando son tratadas con glucosa, en comparación al tratamiento con cuerpos cetónicos (26). Además, en una línea de células hepáticas humanas, la disponibilidad, de manera dosis dependiente de glucosa, induce un fenotipo mitocondrial de fisión (24).

Para testear si el mecanismo celular que regula el fenotipo mitocondrial fusionado con la disposición de ácidos grasos en miotubos humanos, es similar al encontrado en el músculo esquelético humano maduro, evaluamos los niveles de las proteínas que regulan la fusión y la fisión mitocondrial y la razón Mfn 2/ Fis 1. Observamos que los miotubos incubados con AcidPal, presentan una mayor razón Mfn 2/ Fis 1, que los estimulados con

AcidPal+XeB. Por lo tanto, la transferencia de calcio desde el RS a la mitocondria parece ser clave para la regulación de la razón Mfn 2/ Fis 1 en el contexto de la disposición y oxidación de ácidos grasos. Interesantemente, un estudio en ratones que apoya nuestros resultados, mostró que un ayuno de 48 horas (mayor disponibilidad y oxidación de ácidos grasos) condujo a un aumento de la expresión de Mfn 2 en el corazón, en comparación a la alimentación (mayor disponibilidad y oxidación de glucosa) (46). Finalmente, en cardiomiocitos la incubación con elevadas concentración de glucosa (40 mM; 48 horas) disminuye la proteína Mfn 2 (~60%), aumenta la proteína Fis 1 (35%), induciendo un fenotipo de fisión mitocondrial (47). Por lo tanto, los diferentes sustratos energéticos (ácidos grasos/glucosa), pueden regular las proteínas que regulan el fenotipo de fusión (Mfn 2/ Fis 1) en el músculo esquelético humano, y potencialmente esta regulación es necesaria para la oxidación de los diferentes sustratos.

Nuestros resultados en CMSP humanas son concordantes y refuerzan nuestros resultados encontrados *in vitro*, en lo que respecta a que una mayor disponibilidad y oxidación de ácidos grasos es acompañada de un aumento en la interacción mitocondria-RE y la inducción de un fenotipo de fusión mitocondrial. Las CMSP han recibido recientemente un mayor interés con fines de diagnóstico, ya que pueden aislarse desde la sangre con relativa facilidad y de manera poco invasiva, y muestran patrones mitocondriales característicos de ciertas enfermedades, como por ejemplo una reducción de la densidad mitocondrial en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (48). Además, previamente se demostró que las CMSP de ratones y de minipig se adaptan de forma aguda a la transición nutricional como el ayuno y la alimentación (49, 50). En humanos, el ayuno induce un aumento en la expresión génica de proteínas relacionadas con la ß-oxidación de ácidos grasos en CMSP (51), como se observa clásicamente en los tejidos periféricos. Además, los mecanismos de regulación en CMSP parecen similares a los de los tejidos, ya que el receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas (PPARα) participa en el aumento de la regulación génica inducida por el ayuno en CMSP (51), de manera similar a la que se conoce en el hígado y en el músculo esquelético. En conjunto, estos resultados sugieren que las interacciones mitocondria-RE y el fenotipo de fusión mitocondrial pueden

analizarse en CMSP humanas en el contexto del estudio de la regulación de la oxidación de los ácidos grasos y glucosa.

6. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

En conclusión, nuestros resultados demuestran la veracidad de nuestra hipótesis, demostrando que existe una correlación directa entre la interacción mitocondria-RS y el fenotipo mitocondrial fusionado en el músculo esquelético humano en reposo con la oxidación de ácidos grasos relativa a la oxidación de carbohidratos cuerpo completo en reposo. Sin embargo, nuestra hipótesis es rechazada durante el ejercicio. Proponemos que existe un ciclo de retroalimentación positiva en que la disponibilidad de ácidos grasos induce la interacción mitocondria-RS y de esta manera el fenotipo de fusión mitocondrial, lo que es necesario para la oxidación de ácidos grasos. Serán necesarios experimentos que comprueben, en el músculo esquelético, que la interacción mitocondria-RS y el fenotipo de fusión mitocondrial son fenómenos asociados causalmente, y a su vez necesarios para la oxidación de ácidos grasos. Proponemos que la interacción mitocondria-RS y la fusión mitocondrial en el músculo esquelético pueden ser potenciales blancos para la prevención y/o el tratamiento de patologías que involucren una disminución en la capacidad de oxidar ácidos grasos como la resistencia a insulina.

Propuesta a futuro

Nuestra principal propuesta de trabajo es medir la oxidación *ex vivo* de AcidPal, en miotubos humanos o en músculo esquelético de ratón silenciando las proteínas de fusión mitocondrial (por ejemplo, Mfn 2) y/o disminuyendo la interacción entre mitocondria-RS (XeB). Además, evaluar en miotubos primarios de pacientes obesos y/o diabéticos si el aumento del fenotipo de fusión mitocondrial, aumentando la proteína Mfn 2 o disminuyendo la proteína Fis 1, restaura la oxidación de ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina.

Otros logros durante el doctorado

Congresos

1. XXX Congreso anual de la sociedad chilena de biología celular (2016). Castro M., Vial J., Rebolledo D., Brandan E. y Eisner E. "Inhibition of CTGF/CCN2 rescue mitochondrial fusion in Duchene Dystrophy aduls skeletal muscle" (póster).
2. XXXI Congreso anual de la sociedad chilena de biología celular (2017). Castro M., Rebolledo D., Brandan E. y Eisner E. "Recovery mitochondrial fusion recues skeletal muscle function in Duchene Dystrophy" (póster).
3. Advances in metabolic communication. Castro M, Jannas S, Tuñon M, Zbinden H. "Differences between fasting and gluocose load in mitochondrial morphology an mitochondria-RE distance in human peripheral blood mononuclear cells" (póster).

Pasantía

Estadía corta (2 meses) en el laboratorio del Dr Benjamin Prosser en el Laboratorio de Fisiología Muscular en la Universidad de Pensilvania. Beca de estadía de investigación en el extranjero para estudiantes de Doctorado de la Vicerrectoría de investigación (VRI-PUC).

Artículos

Tributan directamente a la tesis:

1. Castro-Sepulveda M, Jannas-Vela S, Fernández-Verdejo R, Ávalos-Allele D, Tapia G, Villagrán C, Quezada N, Zbinden-Foncea H. Relative lipid oxidation associates directly with mitochondrial fusion phenotype and mitochondria-sarcoplasmic reticulum interactions in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2020;318(6):E848-E855.
2. Castro-Sepulveda M, Fernández-Verdejo R, Tuñón-Suárez M, Morales-Zúñiga J, Tronocoso M, Jannas-Vela S, Zbinden-Foncea H. Low abundance of Mfn2 protein correlates with reduced mitochondria-SR juxtaposition and mitochondrial cristae density in human skeletal muscle: Examining organelle measurements from TEM images. *Manuscrito aceptado en Faseb j.*

3. Castro-Sepulveda M, Jannas-Vela S, Tuñon M, Díaz-Castro F, Morio B, Rieusset J, Zbinden-Foncea H. Mitochondrial dynamics responses into peripheral blood mononuclear cells as markers of metabolic flexibility in humans. *Manuscrito en revisión.*

Artículos en los tópicos de oxidación de metabolismo energéticos y dinámica mitocondrial:

4. Banerjee S, Ghoshal S, Stevens JR, McCommis KS, Gao S, Castro-Sepulveda M, Mizgier ML, Girardet C, Kumar KG, Galgani JE, Niehoff ML, Farr SA, Zhang J, Butler AA. Hepatocyte expression of the micropeptide adropin regulates the liver fasting response and is enhanced by caloric restriction. J Biol Chem. 2020;295(40):13753-13768.
5. Echeverria F, Jimenez Patino PA, Castro-Sepulveda M, Bustamante A, Garcia Concha PA, Poblete-Aro C, Valenzuela R, Garcia-Diaz DF. Microencapsulated pomegranate peel extract induces mitochondrial complex IV activity and prevents mitochondrial cristae alteration in brown adipose tissue in mice fed on a high-fat diet. Br J Nutr. 2020 Dec 1:1-12. Epub ahead of print.
6. Fernández-Verdejo R, Castro-Sepulveda M, Gutiérrez-Pino J, Malo-Vintimilla L, López-Fuenzalida A, Olmos P, Santos JL, Galgani JE. Direct Relationship Between Metabolic Flexibility Measured During Glucose Clamp and Prolonged Fast in Men. Obesity (Silver Spring). 2020;28(6):1110-1116.
7. Monsalves-Alvarez M, Morales PE, Castro-Sepulveda M, Sepulveda C, Rodriguez JM, Chiong M, Eisner V, Lavandero S, Troncoso R. β-Hydroxybutyrate Increases Exercise Capacity Associated with Changes in Mitochondrial Function in Skeletal Muscle. Nutrients. 2020;12(7):1930.
8. Del Campo A, Contreras-Hernández I, Castro-Sepúlveda M, Campos CA, Figueroa R, Tevy MF, Eisner V, Casas M, Jaimovich E. Muscle function decline

and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice. Aging (Albany NY). 2018;10(1):34-55.

9. Galgani J, Castro-Sepulveda M, Pérez-Luco C, Fernández-Verdejo R. Validity of predictive equations for resting metabolic rate in healthy humans. Clin Sci (Lond). 2018;132(16):1741-1751.
10. Galgani JE, Castro-Sepulveda MA. Influence of a Gas Exchange Correction Procedure on Resting Metabolic Rate and Respiratory Quotient in Humans. Obesity (Silver Spring). 2017;25(11):1941-1947.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. Diabetes. 1981;30:1000-1007.
2. Saltiel AR. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. J Clin Invest. 2000;106:163-4.
3. Kelley DE, Goodpaster BH. Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. Diabetes Care. 2001;24:933-41.
4. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. Diabetes. 2000;49:677–683.
5. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. Diabetes. 2006;55 Suppl 2(Suppl 2):S9-S15.
6. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. Diabetes. 1997;46:983-8.
7. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study. Diabetologia. 1999;42:113-6.
8. Gaster M, Rustan AC, Aas V, Beck-Nielsen H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. Diabetes. 2004;53:542-8.
9. Ukropcova B, McNeil M, Sereda O, de Jonge L, Xie H, Bray GA, Smith SR. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. J Clin Invest. 2005;115:1934-41.

10. Lam YY, Ravussin E. Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. Eur J Clin Nutr. 2017;71:318-322.
11. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295:E1009-17.
12. Galgani JE, Castro-Sepulveda MA. Influence of a Gas Exchange Correction Procedure on Resting Metabolic Rate and Respiratory Quotient in Humans. Obesity (Silver Spring). 2017;25:1941-1947.
13. Schutz Y. The adjustment of energy expenditure and oxidation to energy intake: the role of carbohydrate and fat balance. Int J Obes Relat Metab Disord. 1993;17 Suppl 3:S23-7.
14. Jéquier E, Acheson K, Schutz Y. Assessment of energy expenditure and fuel utilization in man. Annu Rev Nutr. 1987;7:187-208.
15. Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. J Clin Invest. 1990;86:1423-7.
16. Poole DC, Gaesser GA, Hogan MC, Knight DR, Wagner PD. Pulmonary and leg VO2 during submaximal exercise: implications for muscular efficiency. J Appl Physiol (1985). 1992;72:805-10.
17. Goedecke JH, St Clair Gibson A, Grobler L, Collins M, Noakes TD, Lambert EV. Determinants of the variability in respiratory exchange ratio at rest and during exercise in trained athletes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000;279:E1325-E1334.
18. Eisner V, Csordás G, Hajnóczky G. Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle-pivotal roles in Ca^{2+} and reactive oxygen species signaling. J Cell Sci.2013;126:2965-78.
19. Del Campo A, Contreras-Hernández I, Castro-Sepúlveda M, Campos CA, Figueroa R, Tevy MF, Eisner V, Casas M, Jaimovich E. Muscle function decline and mitochondria changes in middle age precede sarcopenia in mice. Aging (Albany NY). 2018;10:34-55.

20. Chen Y, Csordás G, Jowdy C, Schneider TG, Csordás N, Wang W, Liu Y, Kohlhaas M, Meiser M, Bergem S, Nerbonne JM, Dorn GW 2nd, Maack C. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca (2+) crosstalk. Circ Res. 2012;111:863-75.
21. Theurey P, Rieusset J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. Trends Endocrinol Metab. 2017;28:32-45.
22. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung KH, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR, Foskett JK. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca2+ transfer to mitochondria. Cell. 2010;142:270–283.
23. Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, Kotelevets L, Chastre E, Khan F, Landegren U, Söderberg O, Bootman MD, Roderick HL. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca2+ release and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:2427–2432.
24. Theurey P, Tubbs E, Vial G, Jacquemetton J, Bendridi N, Chauvin MA, Alam MR, Le Romancer M, Vidal H, Rieusset J. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. J Mol Cell Biol. 2016;8:129-43.
25. Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. Nat Cell Biol. 2018;20:755-765.
26. Mishra P, Varuzhanyan G, Pham AH, Chan DC. Mitochondrial Dynamics is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. Cell Metab. 2015;22:1033-44.
27. Huertas JR, Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Nordsborg NB, Martín-Albo J, Rueda-Robles A, Casuso RA. Human muscular mitochondrial fusion in athletes during exercise. FASEB J. 2019;33:12087-12098.

28. Arribat Y, Broskey NT, Greggio C, Boutant M, Conde Alonso S, Kulkarni SS, Lagarrigue S, Carnero EA, Besson C, Cantó C, Amati F. Distinct patterns of skeletal muscle mitochondria fusion, fission and mitophagy upon duration of exercise training. Acta Physiol (Oxf). 2019;225:e13179.
29. Huertas JR, Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Nordsborg NB, Martín-Albo J, Rueda-Robles A, Casuso RA. Human muscular mitochondrial fusion in athletes during exercise. FASEB J. 2019;33:12087-12098.
30. Axelrod CL, Fealy CE, Mulya A, Kirwan JP. Exercise training remodels human skeletal muscle mitochondrial fission and fusion machinery towards a pro-elongation phenotype. Acta Physiol (Oxf). 2019;225:e13216.
31. Lee JY, Kapur M, Li M, Choi MC, Choi S, Kim HJ, Kim I, Lee E, Taylor JP, Yao TP. MFN1 deacetylation activates adaptive mitochondrial fusion and protects metabolically challenged mitochondria. J Cell Sci. 2014;127:4954-63.
32. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. Dev Cell. 2015;32:678-92.
33. Patten DA, McGuirk S, Anilkumar U, Antoun G, Gandhi K, Parmar G, Iqbal MA, Wong J, Richardson RB, St-Pierre J, Slack RS, Harper ME. Altered mitochondrial fusion drives defensive glutathione synthesis in cells able to switch to glycolytic ATP production. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2020;1868:118854.
34. Castro-Sepulveda M, Cancino J, Fernández-Verdejo R, Pérez-Luco C, Jannas-Vela S, Ramirez-Campillo R, Del Coso J, Zbinden-Foncea H. Basal Serum Cortisol and Testosterone/Cortisol Ratio Are Related to Rate of Na+ Lost During Exercise in Elite Soccer Players. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2019;658-663.
35. Valladares-Ide D, Peñailillo L, Collao N, Marambio H, Deldicque L, Zbinden-Foncea H. Activation of protein synthesis, regeneration, and MAPK signaling pathways following repeated bouts of eccentric cycling. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;317:E1131-E1139.

36. Picca A, Calvani R, Lorenzi M, Menghi A, Galli M, Vitiello R, Randisi F, Bernabei R, Landi F, Marzetti E. Mitochondrial dynamics signaling is shifted toward fusion in muscles of very old hip-fractured patients: Results from the Sarcopenia in HIp FracTure (SHIFT) exploratory study. Exp Gerontol. 2017;96:63-67.
37. Rosenkilde M, Nordby P, Nielsen LB, Stallknecht BM, Helge JW. Fat oxidation at rest predicts peak fat oxidation during exercise and metabolic phenotype in overweight men. Int J Obes (Lond). 2010 May;34(5):871-7.
38. Robinson SL, Hattersley J, Frost GS, Chambers ES, Wallis GA. Maximal fat oxidation during exercise is positively associated with 24-hour fat oxidation and insulin sensitivity in young, healthy men. J Appl Physiol (1985). 2015 Jun 1;118(11):1415-22.
39. Casas M, Altamirano F, Jaimovich E. Measurement of calcium release due to inositol trisphosphate receptors in skeletal muscle. Methods Mol Biol. 2012;798:383-93.
40. Fernández-Verdejo R, Bajpeyi S, Ravussin E, Galgani JE. Metabolic flexibility to lipid availability during exercise is enhanced in individuals with high insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;315:E715-E722.
41. Galgani JE, Johannsen NM, Bajpeyi S, et al. Role of skeletal muscle mitochondrial density on exercise-stimulated lipid oxidation. Obesity (Silver Spring). 2012;20:1387-1393.
42. Chomentowski P, Coen PM, Radiková Z, Goodpaster BH, Toledo FG. Skeletal muscle mitochondria in insulin resistance: differences in intermyofibrillar versus subsarcolemmal subpopulations and relationship to metabolic flexibility. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Feb;96(2):494-503.
43. Ferreira R, Vitorino R, Alves RM, Appell HJ, Powers SK, Duarte JA, Amado F. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. Proteomics. 2010;10(17):3142-54.

44. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. J Cell Sci. 2003;116(Pt 13):2763-74.
45. Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985). 2014;117:239-45.
46. Li Y, Yin R, Liu J, Wang P, Wu S, Luo J, Zhelyabovska O, Yang Q. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulates mitofusin 2 expression in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2009;46:876-82.
47. Wang Y, Gao P, Wei C, Li H, Zhang L, Zhao Y, Wu B, Tian Y, Zhang W, Wu L, Wang R, Xu C. Calcium sensing receptor protects high glucose-induced energy metabolism disorder via blocking gp78-ubiquitin proteasome pathway. Cell Death Dis. 2017;8:e2799.
48. Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, Hagen TM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ, Kluge MA, Weihrauch D, Gutterman DD, Vita JA. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. Transl Res. 2010;156:15-25.
49. Zeng Y, David J, Rémond D, Dardevet D, Savary-Auzeloux I, Polakof S. Peripheral Blood Mononuclear Cell Metabolism Acutely Adapted to Postprandial Transition and Mainly Reflected Metabolic Adipose Tissue Adaptations to a High-Fat Diet in Minipigs. Nutrients. 2018;10:1816.
50. Cortez E, Neves FA, Bernardo AF, Stumbo AC, Carvalho L, Garcia-Souza E, Sichieri R, Moura AS. Lymphocytes mitochondrial physiology as biomarker of energy metabolism during fasted and fed conditions. ScientificWorldJournal. 2012;2012:629326.
51. Bouwens M, Afman LA, Müller M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. Am J Clin Nutr. 2007;86:1515-23.

8. ANEXOS

Tabla 5. Correlación de Pearson entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio y las características de los sujetos.

	CR final del ejercicico
Edad (años)	0,24
Peso (kg)	0,53[A]
Índice de masa corporal	0,46
Glucosa (mg/dL)	0,25
Insulina (μUI/mL)	0,40
HOMA-IR	0,40
Triglicéridos (mg/dL)	0,46
Colesterol total (mg/dL)	-0,09
LDL-C (mg/dL)	-0,18
HDL-C (mg/dL)	-0,17
VLDL (mg/dL)	0,46

Los valores representan el valor r. [A]$P<0,09$. CR, cociente respiratorio.

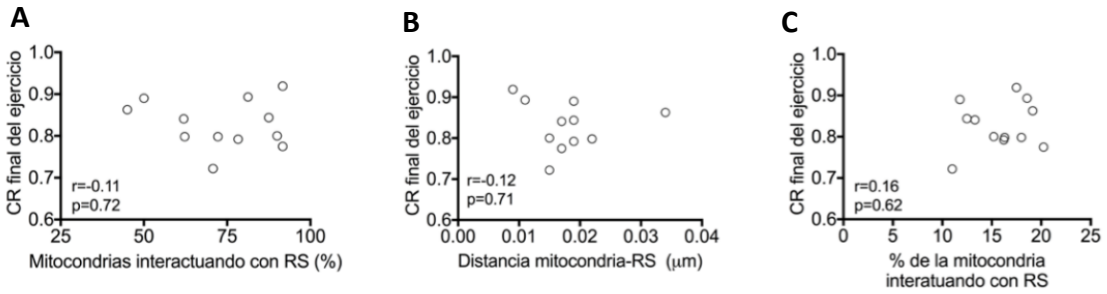


Figura 18. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre el CR cuerpo completo al final del ejercicio con el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS, la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS (A-C) en el músculo esquelético humano en reposo. n=12 sujetos, 3 fibras por sujeto. CR, cociente respiratorio; M, mitocondrias; RS, retículo sarcoplásmico.

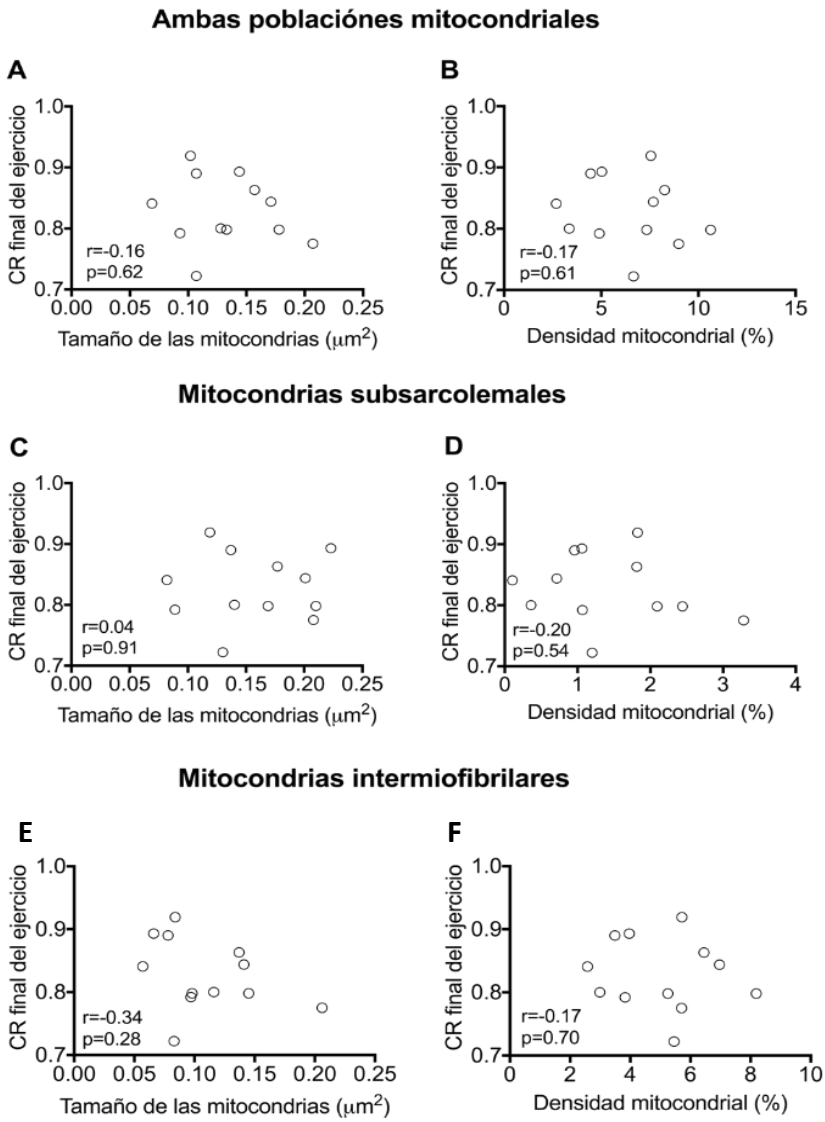


Figura 19. Correlación entre el cociente respiratorio cuerpo completo al final del ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre el CR cuerpo completo al final del ejercicio con el tamaño y densidad mitocondrial en ambas poblaciones mitocondriales (A, B), en la población de mitocondrias subsarcolemales (C, D) y en la población de mitocondrias intermiofifrilares en el músculo esquelético en reposo (E, F). n=12 sujetos, analizando 3 fibras por sujeto. CR, cociente respiratorio.

Tabla 6. Correlación de Pearson entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo y las características de los sujetos.

	Oxidación de ácidos grasos en reposo (mg/kg/min)	Oxidación de ácidos grasos al final ejercicio (mg/kg/min)
Edad (años)	0,02	-0,31
Peso (kg)	-0,21	-0,36
Índice de masa corporal	-0,27	-0,25
Glucosa (mg/dL)	-0,28	-0,11
Insulina (μUI/mL)	-0,49[A]	-0,13
HOMA-IR	-0,50[A]	-0,15
Triglicéridos (mg/dL)	-0,33	-0,20
Colesterol total (mg/dL)	-0,32	0,13
LDL-C (mg/dL)	-0,39	0,10
HDL-C (mg/dL)	-0,40	0,24
VLDL (mg/dL)	0,32	-0,20

Los valores representan el valor r. [A]$P<0,09$.

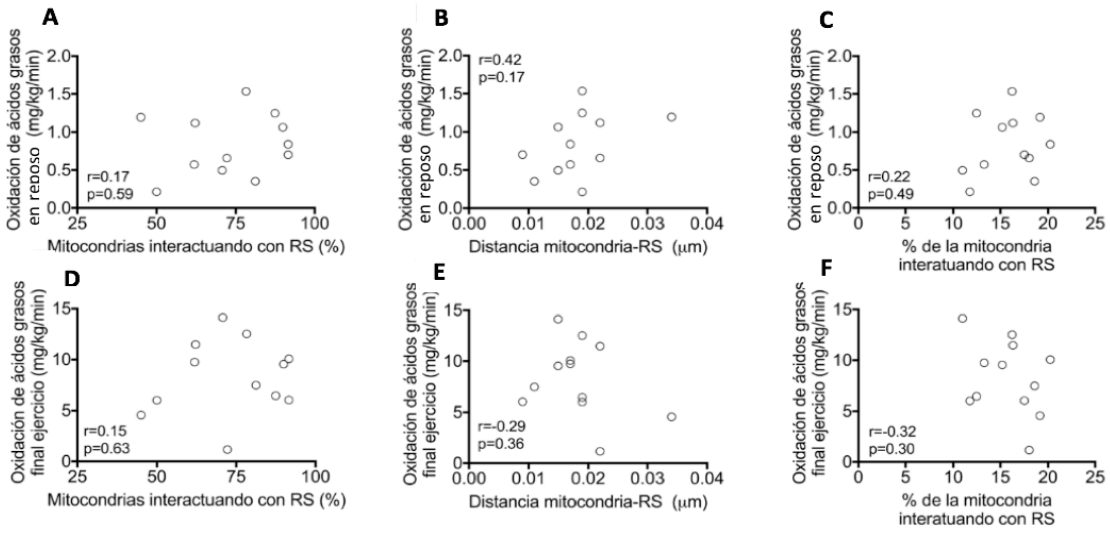


Figura 20. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo en reposo y al final del ejercicio con la interacción mitocondria-retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos en reposo con el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS, la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo (A-C). Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos al final del ejercicio con el porcentaje de mitocondrias interactuando con RS, la distancia entre mitocondria-RS y el % de la mitocondria interactuando con RS en el músculo esquelético en reposo (D-E). n=12 sujetos, 3 fibras por sujeto. CR, cociente respiratorio; M, mitocondrias; RS, retículo sarcoplásmico.

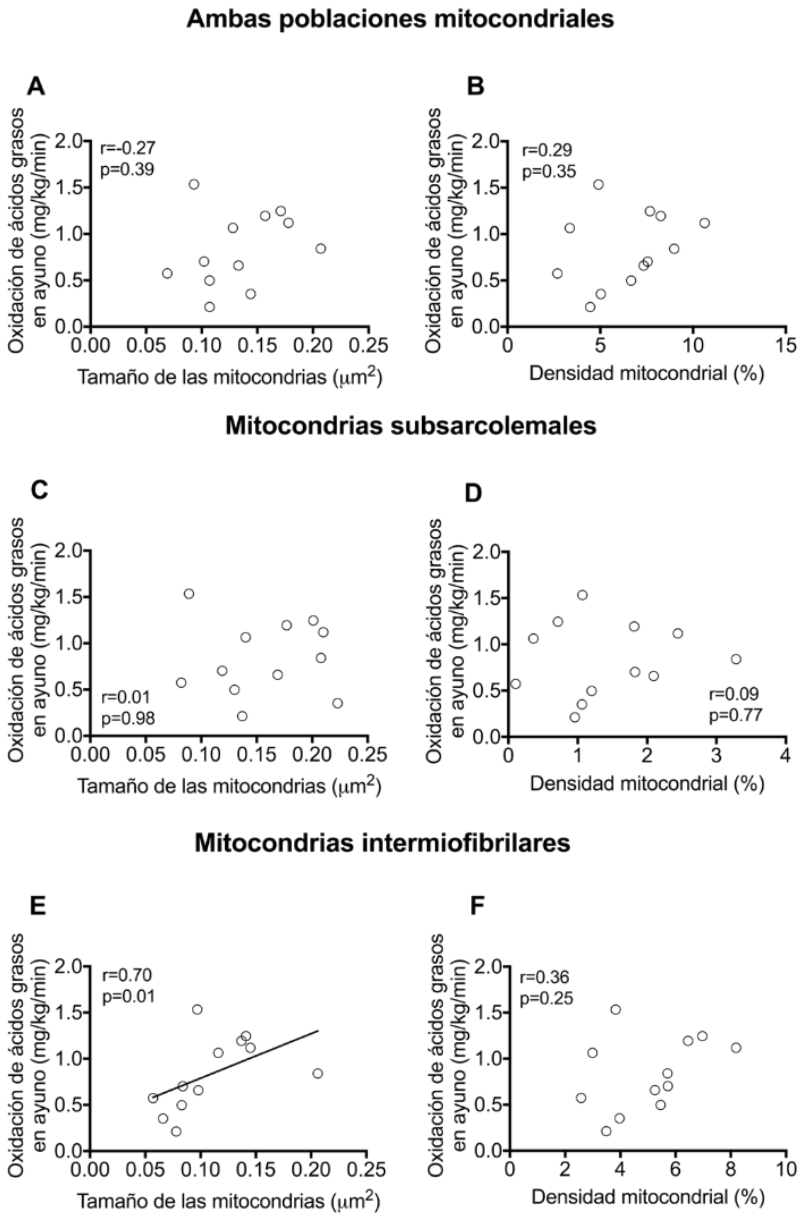


Figura 21. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo en reposo con el tamaño y la densidad mitocondrial, en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre el CR en ayuno y el tamaño y densidad mitocondrial en ambas poblaciones mitocondriales (A, B), en la población de mitocondrias subsarcolemales (C, D) y en la población de mitocondrias intermiofibrilares (E, F). n=12 ujetos, analizando 3 fibras por sujeto.

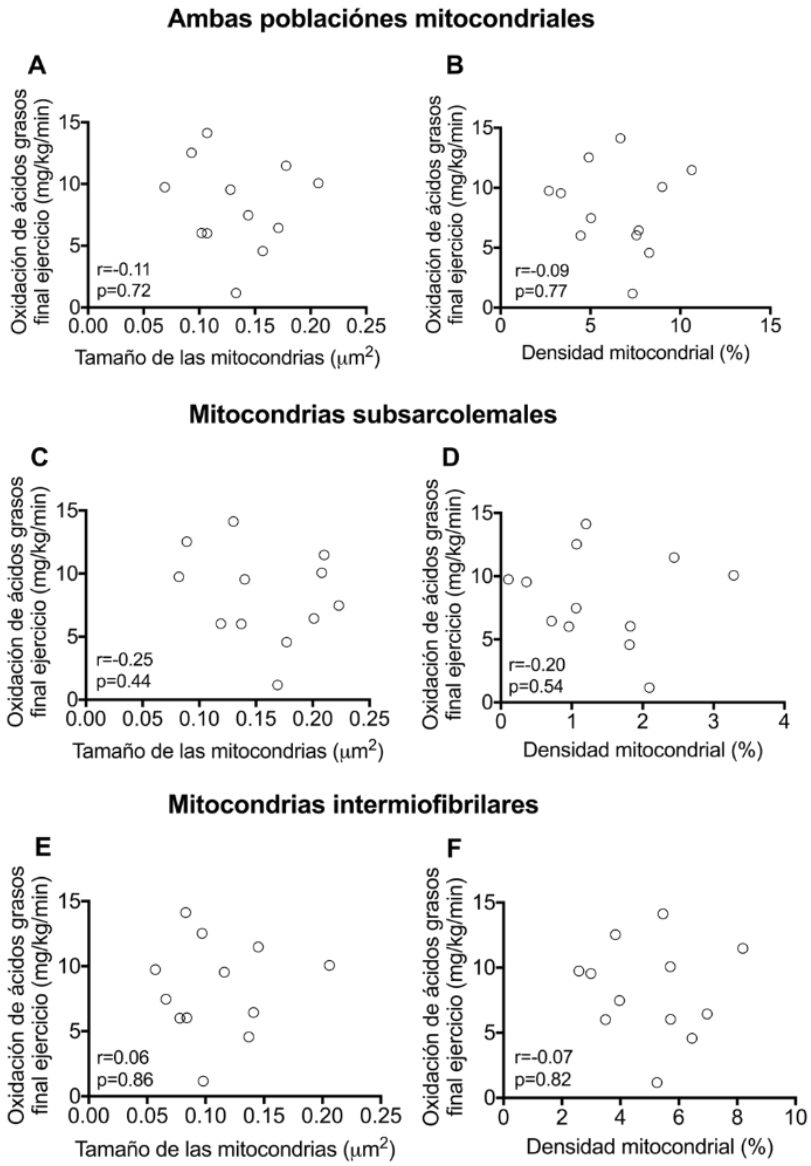


Figura 22. Correlación entre la oxidación absoluta de ácidos grasos cuerpo completo al final del ejercicio con el tamaño y la densidad mitocondrial en el músculo esquelético humano en reposo. Correlación entre el CR al final del ejercicio y el tamaño y densidad mitocondrial en ambas poblaciones mitocondriales (A, B), en la población de mitocondrias subsarcolemales (C, D) y en la población de mitocondrias intermiofibrilares (E, F). n=12 sujetos, analizando 3 fibras por sujeto.