UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Medicina
Escuela de Química y Farmacia

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PIPERINA EN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS MUSCULOESQUELÉTICAS EN UN MODELO DE RESISTENCIA INDUCIDA POR PALMITATO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Isabel Estefanía Garay Marañao

LUGAR DE DESARROLLO
Universidad Andrés Bello

Mario Navarro
DIRECTOR

Maite Rodríguez
CODIRECTOR

Santiago, mayo 2025.

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Medicina
Escuela de Química y Farmacia

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PIPERINA EN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS MUSCULOESQUELÉTICAS, EN UN MODELO DE RESISTENCIA INDUCIDA POR PALMITATO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Isabel Estefanía Garay Marañao

COMISIÓN CORRECTORA:

Profesor(a) Corrector: Dra. Daniela Guzmán Rivera
Profesor(a) Corrector: Dra. Ileana Carrillo Werner

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

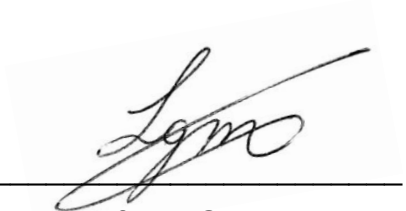
Se declara por este medio que el trabajo de titulación presentado para su defensa y evaluación es original; las fuentes, herramientas y aplicaciones utilizadas que contribuyeron a la investigación realizada están debidamente citadas en el texto y acreditadas en el apartado de las referencias, conforme con los requisitos que establece el estilo bibliográfico Vancouver y respetando los aspectos que conciernen a la propiedad intelectual.

Por lo tanto, ante cualquier falta de integridad académica encontrada y que atente contra la Ley N°17.336 de Propiedad Intelectual, se asume la responsabilidad que representa para tal efecto, dejando constancia de ello, con fecha 16 de mayo de 2025, en la ciudad de Santiago.

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

Título del trabajo "Evaluación el efecto de piperina en la captación de glucosa en células musculoesqueléticas, en un modelo de resistencia inducida por palmitato".



Isabel Estefanía Garay Marañao

DIRECTOR

Mario Navarro Márquez

Químico Farmacéutico, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Doctor en Farmacología, Universidad de Chile.

Docente Unidad de Farmacología, Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello.

COMISIÓN CORRECTORA

Daniela Guzmán Rivera

Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

Doctora en Farmacología, Universidad de Chile.

Diplomado en Educación Superior, especialista en primer año, Universidad Andrés Bello.

Diplomado en Educación en Ciencias de la Salud, Universidad Andrés Bello.

Docente Unidad de Farmacología, Escuela de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello.

Ileana Carrillo Werner

Bioanalista, Universidad Central de Venezuela.

Diplomado en Docencia para Educación Superior, UNAB.

Magister en Biomedicina Celular y Molecular, Universidad de Chile.

Doctora en Farmacología, Universidad de Chile.

Investigadora, Environ SpA.

AGRADECIMIENTOS

Durante esta etapa tan importante de mi vida, muchas personas me acompañaron y apoyaron, y a todas ellas les estaré eternamente agradecida.

En primera instancia quiero agradecerles a mis padres, por siempre impulsarme a dar lo mejor de mí, por confiar en mí en momentos donde ni yo creía que sería capaz de lograr algo y, obviamente por su amor incondicional. A mi madre, Eva Marañao, quien se ha sacrificado toda su vida para darle a sus hijos las oportunidades que ella nunca tuvo, gracias infinitas. A mi padre, Luis Garay, quien nunca permitió que me sintiera sola, asegurándose de estar siempre presente para conversar, acompañarme y brindarme sus divertidas peleas que tanto extraño. Gracias por hacerme sentir que soy lo más especial de tu vida y por haber estado siempre a mi lado.

Me gustaría agradecerles a mis amigos, que han sido fundamentales para sobrellevar este camino. Gracias Anaís, Valentina, Patricio, Vanessa, Millaray y Suyenn, por ofrecerme sus consejos, por apoyarme en los buenos y no tan buenos momentos, por compartir risas conmigo y hacer más amenos mis días de trabajo. Los adoro.

Finalmente, pero no menos importante, quiero expresar un especial reconocimiento a todas las personas del laboratorio Abate Molina y al profesor Mario Navarro, quienes siempre mostraron una disposición generosa para enseñar y ayudarme cuando lo necesité.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi padre, quien siempre se enorgulleció de la carrera que escogí.
Espero llegar a ser al menos una fracción de la profesional que siempre esperaste.
Este logro también es tuyo. Te extraño, viejo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
1. INTRODUCCIÓN 3
1.1 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) 3
1.2 Síntesis y secreción de insulina 4
1.3 Resistencia a la insulina 6
1.4 Vías de captación de glucosa 8
1.4.1 Mecanismo dependiente de insulina 9
1.4.2 Mecanismo independiente de insulina 9
1.5 Músculo esquelético 11
1.6 Resistencia insulínica inducida por palmitato 12
1.7 Piperina 14
2. HIPÓTESIS 18
3. OBJETIVOS 20
3.1 Objetivo General 20
3.2 Objetivos Específicos 20
4. METODOLOGÍA 22
4.1. Línea celular C2C12 22
4.1.1. Proliferación de línea celular C2C12 22
4.1.2. Diferenciación de células C2C12 22
4.2. Modelo de resistencia inducida por palmitato 23
4.2.1 Modelo de resistencia para ensayo *Western Blot* 23
4.2.2 Modelo de resistencia para ensayo de captación de glucosa 24

4.3. Western Blot 24
4.3.1. Extracción de proteínas totales 24
4.3.2. Cuantificación de proteínas mediante método Bradford 25
4.3.3. Electroforesis 26
4.3.4 Electrotransferencia 27
4.3.5 Incubación de anticuerpos primarios y secundario 28
4.3.6 Revelado con film fotográfico 29
4.3.7 Análisis cuantitativo de bandas con ImageJ 29
4.4. Captación de glucosa con marcador 2-NBDG 29
4.4.1. Preparación de muestras con marcador 2-NBDG 30
4.4.2. Evaluación de captación de glucosa en equipo HPLC 31
4.5. Análisis estadístico 32
5. RESULTADOS 34
5.1. Efecto de piperina en la activación de AMPK en modelo de resistencia inducida por palmitato 34
5.2. Captación de glucosa con marcador 2-NBDG en modelo de resistencia inducida por palmitato 38
6. DISCUSIÓN 45
6.1. Efecto de piperina sobre la activación de AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato 46
6.2. Efecto de piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato 50
7. CONCLUSIONES 56
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58
9. ANEXOS 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones experimentales ensayo Western Blot. 23

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados. 29

Tabla 3: Condiciones cromatográficas para 2-NBDG. 32

Tabla 4: Medios utilizados en cultivo celular de células C2C12. 65

Tabla 5: Condiciones utilizadas durante el periodo del cultivo celular. 66

Tabla 6: Preparación de solución de Acrilamida/Bisacrilamida. 69

Tabla 7: Reactivos buffer lower 4X. 69

Tabla 8: Preparación de buffer lower 4X. 69

Tabla 9: Reactivos buffer upper 4X. 70

Tabla 10: Preparación de buffer upper 4X. 70

Tabla 11: Preparación de buffer de corrida 10X. 71

Tabla 12: Preparación de buffer de transferencia 10X. 71

Tabla 13: Preparación TBS 10X. 72

Tabla 14: Preparación del gel separador continuo al 12% de acrilamida. 73

Tabla 15: Preparación del gel concentrador 5%. 73

Tabla 16: Preparación de buffer de corrida 1X. 74

Tabla 17: Preparación de buffer de transferencia 1X. 76

Tabla 18: Preparación de TBS-T. 77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Viaje de la insulina en el cuerpo. 6

Figura 2: Estructura química de la piperina. 16

Figura 3: Imagen representativa del orden de muestras cargadas para electroforesis. 27

Figura 4: Efecto de piperina e insulina sobre la relación p-AMPK/AMPK en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. 35

Figura 5: Efecto de piperina e insulina sobre la fosforilación de la proteína AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato. 36

Figura 6: Efecto de piperina e insulina sobre la expresión de la proteína AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato. 37

Figura 7: Cromatograma y tiempo de retención de 2-NBDG. 38

Figura 8: Cromatograma y tiempo de retención de 2-NBDG en miotubos C2C12..... 39

Figura 9: Curva de calibración de estándar 2-NBDG. 39

Figura 10: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa (primera repetición) en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. 41

Figura 11: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa (segunda repetición) en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. 42

Figura 12: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. 43

Figura 13: Imagen representativa de geles de electroforesis utilizando peineta de 10 pocillos. 74

Figura 14: Pesos moleculares de estándar utilizado (Thermo Scientific™, #26616). ... 75

Figura 15: Ejemplo de cuantificación de bandas utilizando ImageJ. 79

ÍNDICE DE ANEXOS

9. ANEXOS 65
9.1. Anexo 1: Protocolo *Western Blot* 65
A. Cultivo celular 65
B. Extracción de proteínas totales 66
C. Cuantificación de proteínas 67
D. Método Bradford: 67
E. Preparación de muestras: 68
F. Preparación de reactivos 68
G. Electroforesis 72
H. Electrotransferencia 75
I. Incubación de anticuerpos 77
J. Revelado con films fotográficos 78
K. Análisis de resultados con ImageJ 79
9.2. Anexo 2: Abreviaturas 80

RESUMEN

La resistencia a la insulina (RI) es un trastorno clave en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, y afecta significativamente al músculo esquelético, el principal tejido responsable de la captación postprandial de glucosa. Actualmente, no existe un tratamiento farmacológico específico para revertir esta condición, por lo que se investigan nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, la piperina, un alcaloide presente en la pimienta negra, ha demostrado, en estudios previos, mejorar la captación de glucosa a través de la activación de la vía AMPK.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato en miotubos C2C12. Para ello, se desarrollaron dos aproximaciones experimentales: (1) análisis de la activación de AMPK mediante *Western Blot*, y (2) evaluación funcional de la captación de glucosa utilizando el análogo fluorescente 2-NBDG, cuantificado por HPLC-FLD.

En el análisis de fosforilación de AMPK no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales. Esto podría atribuirse a la baja concentración de piperina utilizada, al corto tiempo de exposición o a la limitada sensibilidad de la técnica. Por otro lado, el ensayo de captación de glucosa mostró una tendencia a la recuperación funcional en células resistentes tratadas con piperina e insulina, lo que sugiere un posible efecto coadyuvante. Sin embargo, estos resultados fueron preliminares (n=2) y sin validación estadística, debido a la falta de estandarización completa del método.

En conclusión, si bien los datos no permiten establecer afirmaciones definitivas, el estudio sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a confirmar el potencial efecto de la piperina en la mejora de la captación de glucosa en condiciones de resistencia insulínica.

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) is a central disorder in the development of type 2 diabetes mellitus, significantly impairing skeletal muscle, the leading site for postprandial glucose uptake. Currently, no pharmacological treatment specifically reverses IR, highlighting the need for new therapeutic strategies. Piperine, an alkaloid found in black pepper, has shown potential to enhance glucose uptake via AMPK activation in previous studies.

This study aimed to evaluate the effect of piperine on glucose uptake in an in vitro model of palmitate-induced insulin resistance using differentiated C2C12 myotubes. Two experimental approaches were performed: (1) Western blot analysis to assess AMPK activation, and (2) glucose uptake evaluation using the fluorescent analog 2-NBDG, quantified by HPLC-FLD.

Western blot analysis did not reveal statistically significant changes in AMPK phosphorylation, potentially due to the low piperine concentration, limited exposure time or the technique's sensitivity threshold. However, the glucose uptake assay demonstrated a trend toward functional recovery in insulin-resistant cells treated with both piperine and insulin, suggesting a possible synergistic effect. These results, although promising, were obtained from representative experiments (n=2) and lacked statistical validation due to the incomplete standardization of the method.

In conclusion, while definitive statements cannot be made based on these preliminary findings, the study provides a conceptual framework for further investigations aimed at validating the potential role of piperine in enhancing glucose uptake under insulin-resistant conditions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La diabetes mellitus (DM) es una de las principales epidemias del siglo XXI **(1)**. La prevalencia de esta enfermedad crónica no transmisible ha aumentado significativamente en las últimas cuatro décadas a nivel mundial **(2)**. En el año 2000, se estimaba que 151 millones de personas padecían diabetes, cifra que aumentó a 463 millones en 2019 y, en los dos años siguientes, ascendió a 537 millones **(1,2)**. Las proyecciones indican que, para el año 2045, el número de personas con diabetes a nivel mundial alcanzará los 783 millones **(1)**.

En Chile, la tendencia sigue un patrón similar al observado a nivel mundial. Según las tres últimas Encuestas Nacionales de Salud (ENS), la prevalencia de diabetes ha aumentado progresivamente, pasando del 4,2% en la ENS 2003 al 9,0% en la ENS 2009-2010, y alcanzando el 12,3% en la ENS 2016-2017 **(1)**. Por tanto, la DM es considerada una enfermedad de primera importancia a nivel de salud pública en todo el mundo, no solo por su alta frecuencia, sino que también por la carga de morbilidad y mortalidad que conlleva **(3,4)**.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la DM corresponde a una enfermedad crónica y metabólica caracterizada por niveles elevados de glicemia **(5)**. Entre los casos diagnosticados, el 90-95% de estos corresponden a diabetes mellitus tipo 2, una patología en la que los tejidos periféricos desarrollan resistencia a la insulina, lo que impide una regulación eficiente de la glucosa **(6,7)**. En las etapas iniciales, las células β pancreáticas continúan produciendo insulina; sin embargo, la hiperglucemia crónica genera una demanda constante de esta hormona, lo que con el tiempo lleva al deterioro de la función de las células β y a una secreción insuficiente de insulina **(5,7)**. Como consecuencia, se establece un desequilibrio metabólico que agrava la resistencia a la insulina y dificulta el control de los niveles de glucosa en sangre **(7)**.

Existen diversos factores asociados con el desarrollo de DM2, de los cuales algunos son no modificables (como la edad, etnia, genética y sexo) y otros modificables, como el estilo de vida, el peso corporal, el consumo de alcohol, el tabaquismo y la inactividad física **(2,8)**.

La progresión de esta enfermedad lleva a que la insuficiente secreción de insulina no sea capaz de mantener una correcta homeostasis de la glucosa, provocando así un estado de hiperglicemia sostenida **(5)**. El mal control glicémico, se asocia con daño progresivo en varios órganos y sistemas, especialmente el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios **(5,9)**. Esta patología, en Chile, es la causa principal de insuficiencia renal, ceguera y amputaciones de extremidades inferiores **(4)**.

1.2 Síntesis y secreción de insulina

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos, conformada por dos cadenas polipeptídicas, A y B, de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, unidas mediante dos puentes disulfuro **(10,11)**. Cumple un rol esencial en el metabolismo de los carbohidratos y la regulación de la glicemia **(12)**. Desempeña un papel clave en la homeostasis energética al influir en el metabolismo de diversos tejidos, particularmente el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo **(10)**. Su función principal es facilitar la captación, el uso y el almacenamiento de nutrientes, promoviendo la absorción de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, donde se convierte en glucógeno y triglicéridos, respectivamente **(10,13)**. Además, inhibe procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis en el hígado, y estimula la síntesis proteica muscular **(10)**.

La glucosa es el monosacárido más abundante en la sangre y la principal fuente de energía metabólica **(11,14)**. Debido a su naturaleza hidrofílica y su tamaño molecular, no puede atravesar libremente la membrana celular, por lo que requiere transportadores

específicos **(11)**. Su ingreso a las células ocurre mediante cotransportadores activos dependientes de sodio o transportadores facilitados de la familia GLUT, que permiten su paso sin gasto energético **(11)**. Entre las 14 isoformas de GLUT identificadas en mamíferos, GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 y GLUT-4 desempeñan un papel clave en la regulación de la glucosa **(11)**. GLUT-4 es el único transportador regulado por la insulina y se encuentra principalmente en células musculoesqueléticas, cardiomiocitos y en el tejido adiposo **(7,11)**. En respuesta a la insulina, se transloca desde vesículas intracelulares, donde permanece inactivo, hasta la membrana plasmática, facilitando la captación de glucosa **(7,11)**.

La insulina se sintetiza y libera en las células β de los islotes pancreáticos en respuesta al aumento de los niveles de glucosa y aminoácidos en sangre. El proceso comienza cuando la glucosa entra a la célula β a través del transportador GLUT-2, el cual tiene baja afinidad por la glucosa, permitiendo que solo se active ante concentraciones elevadas, como las que se producen después de la ingesta de alimentos **(14)**. Luego es fosforilada por la enzima glucoquinasa, considerada el principal sensor de glucosa en estas células **(11,14)**. Posteriormente, la glucosa es metabolizada por la vía glucolítica hasta piruvato, el cual ingresa a la mitocondria para su conversión en acetil-CoA y posterior procesamiento en el ciclo de Krebs, generando ATP **(14)**.

El aumento en la proporción ATP/ADP cierra los canales de potasio sensibles a ATP (K^+ATP), lo que genera la despolarización de la membrana plasmática y abre los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} al citoplasma **(11,14)**. Cuando la concentración de calcio intracelular alcanza un umbral crítico, se desencadena la exocitosis de los gránulos secretores que contienen insulina **(11,14)**.

En cuanto a su síntesis, la insulina se produce inicialmente como preproinsulina **(11)**. Esta molécula es procesada en el retículo endoplasmático mediante la eliminación de su péptido señal, dando origen a la proinsulina **(11)**. Luego, en el aparato de Golgi, la proinsulina es empaquetada en gránulos secretores, donde se convierte en insulina

madura por acción de proteasas específicas **(11)**. La insulina se almacena en estos gránulos en forma de cristales unidos a zinc, listos para su liberación **(11)**.

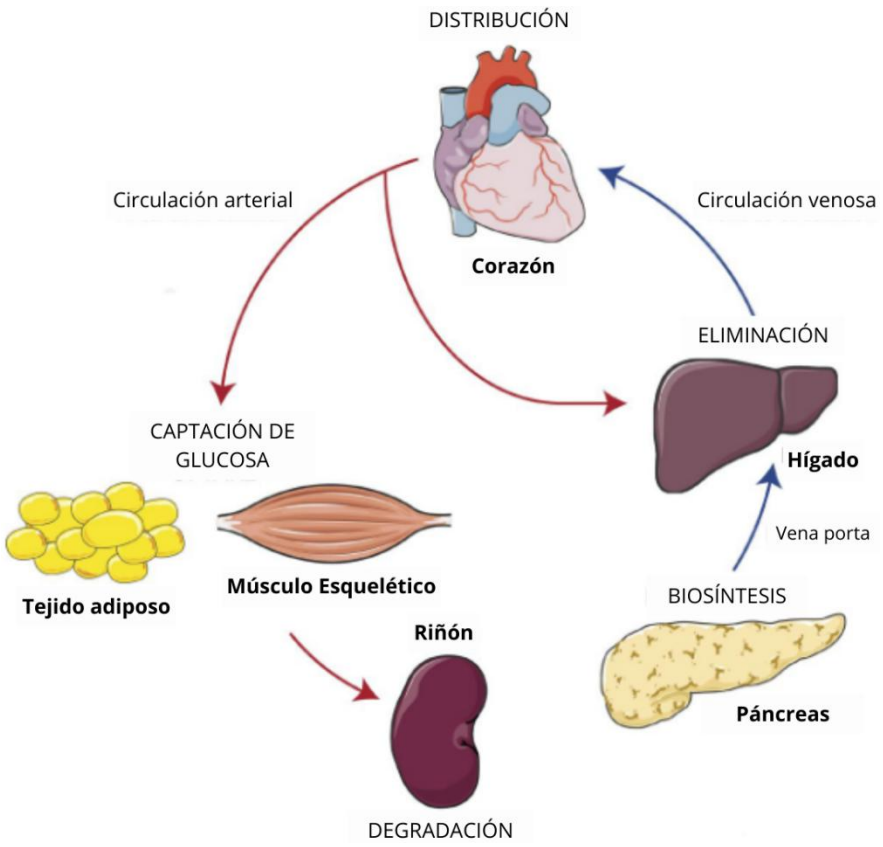


Figura 1: Circulación de la insulina en el organismo. La insulina es producida por las células β del páncreas y liberada a la circulación portal, que la transporta al hígado. En este primer paso, más del 50 % es eliminada por los hepatocitos. La insulina restante pasa al corazón a través de la vena hepática y se distribuye al resto del cuerpo por la circulación arterial. Allí, ejerce sus efectos metabólicos, como la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo mediante la translocación de GLUT4. Finalmente, la insulina que permanece en circulación es degradada por el riñón. (Adaptado de Tokarz, *et al*., 2018) **(15)**.

1.3 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) es una alteración en la acción de esta hormona en los tejidos diana, como el músculo esquelético, los adipocitos y el hígado **(13,16)**. Se define

como una disminución en la sensibilidad y respuesta a la captación de glucosa mediada por insulina y a la inhibición de la producción hepática de glucosa **(17)**. A pesar de que los niveles en circulación son elevados, la respuesta tisular resulta ineficaz, alterando el metabolismo de la glucosa **(13)**.

En la fase prediabética, el organismo compensa esta resistencia aumentando la secreción de insulina, lo que genera un estado de hiperinsulinemia crónica **(13)**. Este mecanismo fisiológico busca contrarrestar la disminución en la eficacia de la insulina, pero con el tiempo conduce al agotamiento de las células beta pancreáticas, favoreciendo la hiperglucemia persistente y, eventualmente, el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 **(13)**.

La RI puede originarse por múltiples mecanismos, como la disminución de la secreción de insulina, acción de hormonas contrarreguladoras o compuestos que afectan su señalización, así como una respuesta alterada de los tejidos diana **(5)**. La transducción de la señal de insulina es un proceso complejo que involucra múltiples proteínas y enzimas moduladoras, por lo que cualquier alteración en estos mecanismos puede afectar la señalización normal y generar resistencia a la insulina en los tejidos periféricos **(11)**. Aunque la fisiopatología de esta condición no se ha dilucidado completamente, se ha propuesto que el estrés oxidativo, la inflamación, el estrés en el retículo endoplásmico y la disfunción mitocondrial desempeñan un papel crucial en su desarrollo **(10,11)**.

A nivel tisular, esta condición afecta principalmente el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado **(5)**. En el músculo esquelético, la captación de glucosa inducida por insulina se ve comprometida debido a una alteración en su señalización, acompañada de múltiples disfunciones intracelulares posteriores a la activación del receptor **(16)**. Entre estos defectos se incluyen un transporte ineficaz de glucosa, una reducción en su fosforilación, así como una disminución en su oxidación y en la síntesis de glucógeno **(16)**. En el hígado, la resistencia a la insulina se traduce en una menor síntesis de glucógeno y un aumento en la producción endógena de glucosa, exacerbando la hiperglucemia **(5,11)**. A nivel del tejido adiposo, la alteración en la señalización de la

insulina impide la adecuada captación y almacenamiento de triglicéridos, promoviendo un aumento en la liberación de ácidos grasos libres, lo que puede agravar aún más la resistencia a la insulina al interferir con su señalización en otros órganos **(10,18)**. La disfunción en estos tejidos precede frecuentemente al desarrollo de resistencia sistémica a la insulina, un estado que incrementa la predisposición a enfermedades metabólicas **(5)**.

La resistencia a la insulina desempeña un papel central en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2, ya que se asocia con diversas alteraciones metabólicas, como la obesidad, la intolerancia a la glucosa, la dislipidemia, la hipertensión y la disfunción endotelial, además, contribuye de manera significativa al desarrollo del síndrome metabólico, la aterosclerosis y la esteatosis hepática no alcohólica **(11,13,17)**. Su presencia en un individuo puede ser un marcador temprano de riesgo para enfermedades cardiovasculares y metabólicas, lo que resalta la importancia de su detección y manejo oportuno.

El manejo de la resistencia a la insulina se basa principalmente en cambios en el estilo de vida, como la adopción de una alimentación saludable y la práctica regular de ejercicio **(7)**. Adicionalmente, pueden emplearse fármacos antihiperglicemiantes, como la metformina, que mejora la sensibilidad a la insulina **(7)**. No obstante, la FDA no ha aprobado el uso de metformina para tratar la prediabetes, y su efectividad en la prevención de la diabetes tipo 2 es inferior a la de las intervenciones basadas en la dieta y la actividad física **(7)**.

1.4 Vías de captación de glucosa

Las vías de captación de glucosa corresponden a los mecanismos celulares que permiten el ingreso de este monosacárido desde el torrente sanguíneo hacia el interior de las células, donde puede ser utilizado como fuente inmediata de energía o almacenarla para su uso posterior **(19,20)**. Este mecanismo es clave para mantener el equilibrio de los

niveles de glucosa en el organismo y asegurar el suministro energético a los distintos tejidos **(19–21)**. Una vez dentro de la célula, la glucosa puede ser transformada en ATP a través de rutas metabólicas como la glucólisis y la respiración celular, o bien almacenarse en forma de glucógeno **(16,19,20)**.

1.4.1 Mecanismo dependiente de insulina

Tras la ingesta de alimentos, el aumento de los niveles de glucosa en sangre estimula la secreción de insulina por parte del páncreas **(22)**. Una vez liberada, esta hormona se une a su receptor (IR) en aquellos tejidos metabólicamente activos, como el músculo esquelético y el tejido adiposo **(23)**. La unión de la insulina a la subunidad α extracelular del IR provoca una activación de la actividad tirosina quinasa del receptor, lo que da inicio a una cascada de señalización intracelular **(23)**.

El receptor fosforila proteínas llamadas IRS (sustratos del receptor de insulina), que activan a la enzima PI3K **(23)**. Esta, a su vez, genera un segundo mensajero lipídico (PIP_3) que recluta y activa quinasas como PDK1 y AKT **(23,24)**. La activación de AKT es un paso clave, ya que esta quinasa fosforila a la proteína AS160, que normalmente (en estado no fosforilado) inhibe el movimiento de vesículas que contienen los transportadores de glucosa GLUT-4 **(16,23)**.

La fosforilación de AS160 permite que estas vesículas se desplacen y se fusionen con la membrana celular, insertando los transportadores GLUT-4 en la superficie de la célula **(22,24)**. Esto incrementa la captación de glucosa desde el torrente sanguíneo hacia el interior celular, especialmente a través del sarcolema en el músculo esquelético, favoreciendo su uso o almacenamiento y contribuyendo así a la disminución de la glucemia **(16,25)**.

1.4.2 Mecanismo independiente de insulina

La vía de captación de glucosa independiente de la insulina es un conjunto de mecanismos celulares que permiten a las células, especialmente del músculo esquelético, tomar glucosa del torrente sanguíneo sin necesidad de la señalización mediada por esta hormona **(22,26)**.

En este proceso participa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual es una serina/treonina quinasa que actúa como un sensor de la energía celular, regulando el equilibrio energético de la célula **(27,28)**. AMPK es una proteína heterotrimérica compuesta por tres subunidades: α, β y γ **(27,28)**. La subunidad α contiene el dominio quinasa responsable de la actividad catalítica, y la fosforilación de treonina 172 (Thr172) en dicha subunidad sirve como un evento activador primario de AMPK **(27,28)**.

Una función fundamental de AMPK en la captación de glucosa es inducir la translocación del transportador GLUT-4 hacia la membrana plasmática de las células musculares y adiposas **(22,25,28)**. Este proceso es independiente de la insulina y puede ser inducido en respuesta a varios estímulos que indican un déficit energético celular **(25,28)**. Estos incluyen la disminución de los niveles de ATP y el aumento de AMP y ADP, típicos en condiciones de alta demanda energética **(27)**. Estímulos como el ejercicio (contracción muscular), que genera un alto consumo de ATP en el músculo esquelético, la hipoxia y la isquemia, que afectan la eficiencia energética celular, y el estrés osmótico, también activan AMPK **(21,27,28)**.

La activación de AMPK involucra la fosforilación de la subunidad α en el sitio Thr172 por quinasas ascendentes (AMPKKs), y la modificación alostérica mediada por AMP **(27)**. Esta modificación aumenta la actividad de la quinasa, permitiendo que AMPK fosforile varias proteínas sustrato dentro de la célula, regulando múltiples vías metabólicas y celulares **(27)**. Específicamente, AMPK activa rutas generadoras de ATP, mientras inhibe aquellas que consumen ATP, contribuyendo así a restablecer el equilibrio energético celular **(27)**.

1.5 Músculo esquelético

Dentro de los órganos que se encuentran involucrados en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 podemos encontrar el páncreas (específicamente las células alfa y beta), el hígado, los riñones, el cerebro, el intestino delgado, el tejido adiposo y el músculo esquelético **(5)**. Este último constituye el sistema de órganos más extenso del cuerpo, representando cerca del 40% del peso corporal en un hombre joven **(7)**. Su función es esencial en el movimiento, el mantenimiento de la postura, la regulación de la temperatura, el metabolismo y la homeostasis de la glucosa **(7)**. Está formado por tejido muscular estriado, el cual se une a los huesos a través de tendones y es controlado de manera voluntaria por el sistema nervioso somático **(7)**.

El músculo esquelético es considerado el principal regulador de la homeostasis de la glucosa, lo cual logra mediante mecanismos tanto dependientes como independientes de la insulina **(7,22)**. Este tejido capta aproximadamente el 80% de la glucosa proveniente de la ingesta de alimentos a través de la vía dependiente de insulina, por lo que se considera el principal sitio de eliminación de la glucosa en el organismo **(7,16,22)**.

En la misma línea, la evidencia indica que el ejercicio, al aumentar el flujo sanguíneo, incrementa la captación de glucosa en el músculo **(5)**. De igual forma, la actividad física tiene beneficios en cuanto al incremento de sensibilidad de la insulina, lo cual se debe a que la contracción muscular promueve la translocación de transportador GLUT-4 a la membrana del músculo esquelético, como se mencionó anteriormente en el mecanismo independiente de insulina **(2,22)**. El músculo al responder al transporte de glucosa mediado por ejercicio, se convierte en uno de los pilares más importantes para la regulación de glucosa en pacientes con DM2 o RI **(22)**.

Debido a que el músculo esquelético es el principal sitio de eliminación y homeostasis de glucosa, también es el mayor responsable de la resistencia a la insulina, por lo que cualquier interferencia en su captación puede inducir esta condición a nivel sistémico **(7,22)**. Esta disminución en la entrada de glucosa puede estar asociada, por ejemplo, a

un metabolismo anormal de los carbohidratos, diabetes mellitus tipo 2 y al desarrollo de dislipidemia aterogénica **(22)**. En este contexto, el músculo esquelético puede experimentar adaptaciones o desadaptaciones ante un exceso crónico de nutrientes, lo que se traduce en modificaciones en la estructura y función vascular, incluyendo disfunción endotelial y acumulación de proteínas de la matriz **(22)**. Estas alteraciones, junto con cambios en la señalización de la insulina, reconfiguran su perfil metabólico y contribuyen a una reducción en la captación de glucosa **(22)**.

1.6 Resistencia insulínica inducida por palmitato

Diversas investigaciones han demostrado de forma consistente que el aumento de los ácidos grasos libres (AGL o FFA) en el plasma está asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina, tanto en personas con diabetes como en individuos sin esta condición **(29)**. Entre estos, el palmitato, ácido graso saturado de cadena larga, ha sido ampliamente utilizado como agente inductor de RI en modelos celulares **(30)**.

Una vez dentro de la célula, el palmitato es transformado a palmitoil-CoA por la enzima acil-CoA sintasa. Este metabolito actúa como precursor para la síntesis de ceramidas **(30)**. Estas ceramidas, junto con otros metabolitos derivados del palmitato, como el diacilglicerol (DAG), interfieren con la señalización de la insulina **(30)**. El DAG, producto de la acumulación de ácidos grasos saturados, activa las quinasas C (PKC), que a su vez activan el factor de transcripción NF-κB **(31)**. Este último regula a la baja la expresión de GLUT-4 y el receptor de insulina (IR), reduciendo su función en la captación de glucosa **(31)**. Así, la activación de NF-κB por DAG contribuye a la resistencia a la insulina al afectar la señalización de la insulina y la captación de glucosa en el músculo esquelético **(31)**. Por otro lado, las ceramidas inhiben la fosforilación y activación de la proteína quinasa B (PKB/Akt), lo que también afecta negativamente la señalización de la insulina **(31)**.

Además, el palmitato induce la inflamación en el músculo esquelético al aumentar la secreción de la citocina proinflamatoria interleucina 6 (IL-6), la cual se ha relacionado estrechamente con la resistencia a la insulina y la DM2 **(30)**.

La activación de la vía PKC/NF-κB mediada por el palmitato incrementa la expresión de IL-6, lo que contribuye a la reducción de la captación de glucosa en el músculo esquelético **(30)**. En miotubos C2C12, se observó que la incubación con palmitato aumentó tanto los niveles de ARN mensajero (ARNm) como la secreción de IL-6, demostrando que las propias células musculares esqueléticas en cultivo producen y liberan esta citocina en respuesta al tratamiento con palmitato **(30)**. Estudios *in vitro* realizados en diversas líneas celulares musculoesquelética, incluyendo C2C12 y L6, han demostrado que la acumulación de palmitato promueve el desarrollo de resistencia a la insulina, inflamación y disfunción mitocondrial **(32)**.

Curiosamente, algunos estudios han documentado que los acil-CoA de cadena larga (LCFA-CoAs) pueden actuar como activadores directos de AMPK, lo que resulta en un efecto beneficioso en el metabolismo de lípidos y la resistencia a la insulina **(27,33)**. El palmitato, se convierte en palmitoil-CoA (un LCFA-CoA) dentro de la célula, lo que sugiere que este último podría activar AMPK **(30,33)**. Sin embargo, a pesar de esta posible activación de AMPK, el palmitato induce resistencia a la insulina a través de metabolitos como el DAG y las ceramidas, los cuales activan vías inflamatorias y alteran la señalización de la insulina, afectando indirectamente la función de AMPK **(30,31)**.

Este panorama de alteraciones metabólicas y señalización deficiente asociada con la resistencia a la insulina inducida por lípidos subraya la necesidad urgente de investigar nuevos enfoques terapéuticos que puedan modular eficazmente estos mecanismos patológicos.

1.7 Piperina

Los productos naturales han sido ampliamente estudiados debido a su potencial en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades humanas **(34)**. Desde la antigüedad, múltiples especies derivadas de plantas medicinales han sido empleadas en la medicina tradicional gracias a su contenido de compuestos bioactivos, los cuales ofrecen diversos beneficios para la salud **(34)**.

Entre estas especies, la pimienta es una de las especias más utilizadas a nivel mundial, no solo como condimento culinario, sino también por sus aplicaciones en la medicina, la perfumería, la conservación de alimentos y como agente de biocontrol **(34,35)**. Dentro de sus componentes activos, la piperina (**figura 2**), el principal alcaloide presente en la pimienta negra (*Piper nigrum* L.), es responsable de su característico sabor picante y ha sido objeto de múltiples investigaciones por sus propiedades farmacológicas y biológicas, incluyendo efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores, antioxidantes y anticancerígenos, entre otros **(34–37)**.

En estudios realizados en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD), la administración de piperina logró revertir los niveles elevados de insulina y glucosa en plasma, así como la acumulación de lípidos hepáticos **(35)**. Estos resultados se explican por el hecho de que la piperina actúa como antagonista del receptor X hepático α (LXRα), el cual promueve la formación de lípidos, y, paralelamente, provoca la reversión de la señalización de adiponectina-AMPK, el cual es un sistema que tiene un papel importante en la mediación de la lipogénesis, la oxidación de ácidos grasos (beta-oxidación) y la señalización de insulina en el hígado. Por tanto, al restaurar esta vía y antagonizar LXRα, la piperina contribuye a disminuir la producción de lípidos, aumentar la quema de grasas y mejorar la forma en que el hígado responde a la insulina **(35)**. Adicionalmente, se reportó una disminución en las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol total, LDL-colesterol y VLDL en ratones tratados con este alcaloide **(34)**.

En el contexto del metabolismo de la glucosa, diversos estudios han evidenciado que la piperina ejerce efectos beneficiosos en la captación de glucosa mediante la regulación de la vía AMPK **(34,38)**. En modelos celulares, se observó que la piperina estimula la expresión de GLUT-4 al inducir la activación de AMPKα2 en mioblastos C2C12, lo que se traduce en un incremento en la captación de glucosa en las células tratadas **(38)**.

Se ha observado que piperina aumenta los niveles de AMP, mientras disminuye los de ADP y ATP (posiblemente a través del consumo de ATP y la reducción de la respiración mitocondrial), resultando así en un aumento marcado de la relación intracelular AMP:ATP, lo cual es un indicador clave de un estado de baja energía, activando así la fosforilación de Thr172 en la subunidad α de AMPK **(38)**. Además, el tratamiento con piperina incrementó los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en mioblastos C2C12 (los cuales son considerados reguladores potenciales de la glucosa, señalización celular, adiposidad y peso corporal) y, esto, en conjunto al aumento de la relación AMP:ATP, promueve la expresión de AMPK **(38)**. Estos hallazgos sugieren que la piperina actúa como un modulador metabólico que estimula la activación de AMPK, favoreciendo así la captación de glucosa y potencialmente beneficiando el control metabólico en condiciones de disfunción energética **(34,38)**.

A pesar de los avances en la comprensión de los efectos de la piperina sobre la activación de AMPK y la captación de glucosa, aún persisten vacíos en el conocimiento respecto a su impacto en modelos de resistencia a la insulina inducida por palmitato. Este estudio tiene como objetivo abordar dicha brecha, evaluando el potencial de la piperina como modulador de la señalización de AMPK y su efecto sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia inducida por palmitato en miotubos C2C12.

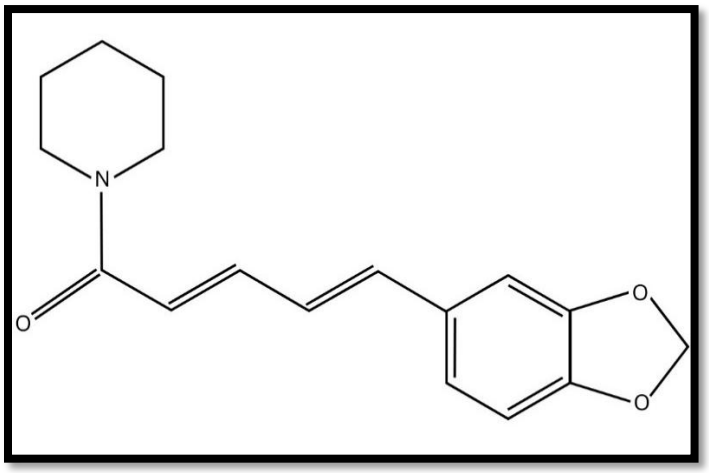


Figura 2: Estructura química de la piperina. (Adaptado de Derosa, 2016) **(35)**

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La piperina obtenida desde *Piper nigrum* L. aumenta la captación de glucosa en células musculoesqueléticas, a través de la activación de AMPK, en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia inducida por palmitato en miotubos C2C12.

3.2 Objetivos Específicos

I. Estandarizar la captación de glucosa mediante el uso del marcador 2-NBDG en un modelo de resistencia inducida por palmitato en miotubos C2C12.
II. Estudiar el efecto de piperina en la activación de AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato en miotubos C2C12.
III. Evaluar el efecto de piperina en la captación de glucosa en un modelo de resistencia inducida por palmitato en miotubos C2C12.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1. Línea celular C2C12

Para alcanzar los objetivos propuestos se realizaron ensayos en un modelo *in vitro* con la línea celular C2C12 (provenientes de músculo esquelético de ratón). Esta línea es ampliamente empleada en investigación, especialmente en estudios sobre el metabolismo, la resistencia a la insulina y en el desarrollo farmacéutico de fármacos y compuestos naturales **(39)**.

Inicialmente, las células C2C12 se presentan como mioblastos mononucleados, los cuales se fusionan para formar estructuras multinucleadas y se diferencian rápidamente en miotubos alargados, los que presentan un patrón de expresión proteica y respuesta a insulina similar a las células musculares humanas **(39)**.

4.1.1. Proliferación de línea celular C2C12

Estas células proliferan como mioblastos mononucleados en presencia de medio de crecimiento (MC) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina para prevenir la contaminación microbiana. Las células fueron incubadas en una atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO_2 **(40)**. El MC fue reemplazado cada 48 horas, evaluando confluencia todos los días hasta obtener aproximadamente un 90%, para así evitar la sobrepoblación y mantener su viabilidad.

4.1.2. Diferenciación de células C2C12

Una vez sea alcanzada la confluencia deseada (90%) el MC se reemplazó por medio de diferenciación (MD), el cual contiene DMEM suplementado con 2% de suero de caballo (HS) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina. Las células fueron incubadas en una

atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO_2 **(40)**. El MD fue reemplazado cada 48 horas. Se estableció un periodo de diferenciación de 6 días, logrando obtener miotubos multinucleados.

4.2. Modelo de resistencia inducida por palmitato

4.2.1 Modelo de resistencia para ensayo *Western Blot*

Para poder estudiar el efecto de piperina sobre la activación de AMPK se utilizaron 8 condiciones experimentales, las cuales fueron:

Condición experimental, contiene DMEM 1% glucosa con palmitato	**Control, contiene DMEM 1% glucosa con BSA libre de ácidos grasos (FAF)**
Con insulina y piperina	Con insulina y piperina
Sólo insulina	Sólo insulina
Sólo piperina	Sólo piperina
Sólo DMEM 1% glucosa con palmitato	Sólo DMEM 1% glucosa con BSA FAF

Tabla 1: Condiciones experimentales ensayo Western Blot. BSA: *albúmina de suero bovino*.

Se utilizaron placas de 60 mm. En el sexto día de diferenciación celular, se realizó una privación de suero y se indujo resistencia a la insulina en las células mediante el tratamiento con palmitato. Para el control, se preparó una solución de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA FAF) (Sigma-Aldrich, A4612) conjugada con DMEM bajo en glucosa (Gibco™ 11885084). Para las condiciones experimentales, se preparó una solución similar, pero con DMEM bajo en glucosa conjugado con palmitato (Sigma-Aldrich, 506345). Se utilizó una concentración de 250 µM de BSA FAF y palmitato para las respectivas condiciones **(41–43)**. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas para inducir resistencia a la insulina.

Después de 20 horas de incubación, algunas placas fueron estimuladas con piperina a 5 µg/mL, mientras que al resto de las placas se les añadió la misma concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) para igualar las condiciones de incubación en todas las placas **(41)**. Cabe destacar que la piperina utilizada en este trabajo fue extraída, aislada y purificada en nuestro laboratorio a partir de pimienta negra molida comercial (marca Gourmet). Su identidad química fue confirmada mediante técnicas cromatográficas, utilizando un estándar USP como referencia, y complementada con análisis espectroscópicos para validar su estructura **(44)**.

La incubación con piperina continuó por las 4 horas restantes. Al finalizar las 24 horas, algunas placas fueron estimuladas durante 15 minutos con una solución de insulina 100 nM (Actrapid, Novo Nordisk) preparada en DMEM bajo en glucosa. Pasado este tiempo, se retiró el medio de todas las placas, se lavaron dos veces con PBS frío estéril y finalmente, las placas fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior uso.

4.2.2 Modelo de resistencia para ensayo de captación de glucosa

Del mismo modo, para el ensayo de captación de glucosa con 2-NBDG se trabajó con las mismas ocho condiciones previamente mencionadas en el apartado **4.2.1**.

Se utilizaron placas de 12 pocillos. La inducción de resistencia a la insulina se realizó siguiendo el mismo procedimiento detallado en el apartado **4.2.1**. Sin embargo, en este caso, las placas no fueron congeladas después de la incubación con insulina, sino que se procedió directamente a la incubación con el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG, tal como se describe en el apartado **4.4**.

4.3. Western Blot

4.3.1. Extracción de proteínas totales

Una vez que todas las condiciones terminaron su periodo de incubación con sus respectivos estímulos, se procedió a realizar la extracción de proteínas totales, utilizando 150 µL de buffer NP40 con inhibidores de proteasas y fosfatasas en cada una de las placas, para así poder lisar las células. Se rasparon utilizando un raspador de células y se transfirió el contenido a tubos Eppendorf previamente rotulados. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos, pasado este tiempo se recuperó cuidadosamente el sobrenadante (evitando romper el pellet que contiene los restos celulares) y éste se transfirió a nuevos tubos Eppendorf. En caso de que la cuantificación de proteínas no se haga de inmediato, los tubos de muestra se deben almacenar a -80°C.

4.3.2. Cuantificación de proteínas mediante método Bradford

El método de Bradford es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de proteínas, basada en la interacción del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas presentes en una muestra **(45)**. Esta reacción genera un cambio de color de rojo a azul, cuya intensidad se mide a una longitud de onda de 595 nm para determinar la concentración proteica **(45)**.

Siguiendo la ley de Lambert-Beer, se construyó una curva de calibración con una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. A partir de la ecuación de la recta obtenida, se determinó la concentración de proteínas en las muestras.

I. Curva de calibración: Para llevar a cabo la curva de calibrado se utilizaron soluciones estándar de BSA en concentraciones de 0 – 0,125 – 0,25 – 0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 3 – 4 µg/µL. En una placa de 96 pocillos se realizó el ensayo por triplicado. En cada pocillo se añadieron 40 µL de reactivo de Bradford (BIO-RAD, 5000205), 158 µL de agua destilada y 2 µL de muestra (estándar BSA). Para el blanco, se reemplazó el BSA por 2 µL de agua destilada. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm y el valor promedio obtenido se corrigió restando la

absorbancia promedio del blanco. Finalmente, se generó una curva de calibración graficando la concentración (µg/µL) vs absorbancia, permitiendo obtener la ecuación de la recta utilizada para determinar la concentración de proteínas en las muestras de interés a analizar.

II. Cuantificación de proteínas de muestras: El ensayo se llevó a cabo por triplicado en una placa de 96 pocillos, añadiendo a cada uno 40 µL de reactivo de Bradford, 158 µL de agua destilada y 2 µL de muestra. Para el blanco, se sustituyó la muestra por 2 µL de buffer NP40. La absorbancia se midió a 595 nm y el valor promedio se corrigió restando la absorbancia media del blanco. Finalmente, la concentración de proteínas se determinó utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración.

Tras determinar la concentración de proteínas en cada muestra, se llevó a cabo la detección y cuantificación de AMPK y p-AMPK, empleando α-tubulina como control de carga.

4.3.3. Electroforesis

La electroforesis es una técnica esencial para separar moléculas cargadas, como proteínas, según su tamaño y carga eléctrica, mediante la aplicación de un campo eléctrico en una matriz de gel **(46)**.

I. Preparación de muestras: Se prepararon las soluciones para contener 30 µg de proteínas por muestra, añadiendo un volumen equivalente a un tercio del total de buffer de carga 4X para desnaturalizar las proteínas y facilitar su separación. El volumen final de 30 µL se completó con detergente NP40. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 90°C durante 5 minutos en un baño termorregulado.

II. Preparación de geles de poliacrilamida: Se emplearon vidrios de 1,5 mm para la preparación de los geles de electroforesis. El gel separador se formuló con una

solución de acrilamida al 12%, mientras que el gel concentrador se preparó con una solución de acrilamida al 5%, utilizando una peineta de 10 pocillos.

III. Carga y corrida de muestras: En el primer pocillo del gel se depositaron 4 µL del estándar de peso molecular (Thermo Scientific™, 26616), mientras que en los pocillos restantes se cargaron las muestras representadas en la **figura 3**. La electroforesis se corrió a voltaje constante de 80 V por 1 hora y luego a 100 V por 2 horas aproximadamente o hasta observar la caída del frente de electroforesis.

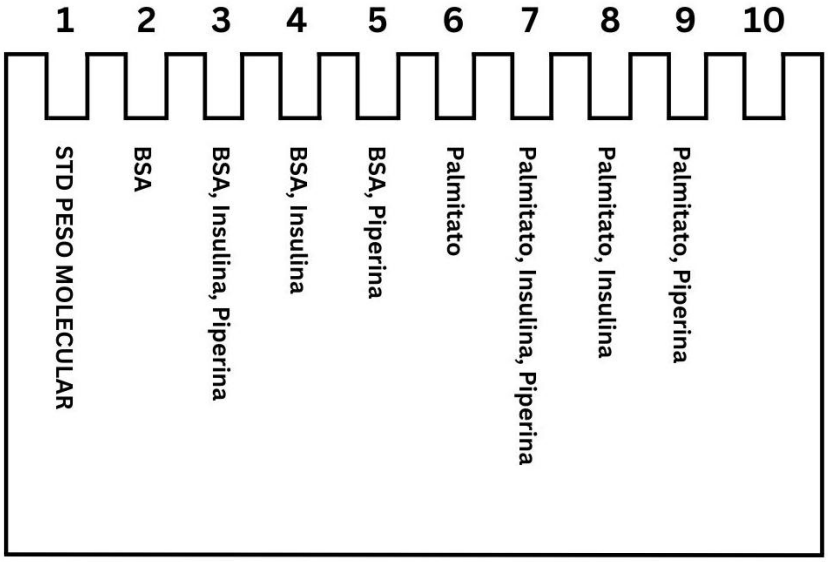


Figura 3: Imagen representativa del orden de muestras cargadas para electroforesis. *BSA: albúmina de suero bovino.*

4.3.4 Electrotransferencia

La electrotransferencia es el proceso mediante el cual las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida se transfieren a una membrana sintética de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (GVS, 1212636).

Tras finalizar la electroforesis, se retiraron los vidrios del gel, descartando el gel concentrador para así trabajar únicamente con el gel separador. Este se posicionó en el

lado negro de un cassette de transferencia, mientras que en el lado blanco se colocó una membrana de PVDF previamente activada con metanol durante un minuto.

La transferencia se llevó a cabo en buffer de transferencia 1X con un 20% de metanol, aplicando un voltaje de 40 mA por 16 horas. Finalizado el proceso, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación constante para visualizar las bandas de proteínas.

4.3.5 Incubación de anticuerpos primarios y secundario

I. Bloqueo de membrana: Se preparó una solución de bloqueo al 5% disolviendo 2,5 g de leche descremada en 50 mL de TBS-T, la cual fue filtrada antes de su uso. La membrana fue incubada en esta solución durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación constante para bloquear sitios no específicos.
II. Incubación con anticuerpo primario: Finalizado el bloqueo, la membrana se incubó con la solución de anticuerpo primario correspondiente a cada proteína de interés. Este proceso se llevó a cabo durante 16 horas a 4°C con agitación constante. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **tabla 2**.
III. Incubación con anticuerpo secundario: Tras completar la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue lavada tres veces con TBS-T durante 5 minutos cada vez. Luego, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente a cada proteína de interés. Para el análisis de AMPK y α-tubulina, se utilizó anticuerpo secundario anti-mouse (1:1000, ThermoFisher, #61 6520), mientras que para p-AMPK, se empleó anticuerpo secundario anti-rabbit (1:1000, Millipore, #401393). La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación constante. Finalmente, se realizó un segundo ciclo de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo.

Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Dilución	Marca y N° de catálogo

Anti-p-AMPK (Thr172)	62	1:1000	Cell signaling technology, 2531
Anti-AMPK	62	1:1000	Cell signaling technology, 2532
Anti-α-tubulina	55	1:5000	Sigma-Aldrich, T8203

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados. Fueron diluidos en solución bloqueo.

4.3.6 Revelado con film fotográfico

El proceso de revelado se realizó en un cuarto oscuro, minimizando cualquier filtración de luz. Para la detección de las proteínas, se empleó el reactivo ECL (Santa Cruz, sc-2048), una solución compuesta por luminol y peroxidasa, que genera una reacción de quimioluminiscencia al interactuar con el anticuerpo secundario. Esta señal luminosa fue capturada en films fotográficos, permitiendo la visualización de las bandas correspondientes.

4.3.7 Análisis cuantitativo de bandas con ImageJ

La cuantificación densitométrica de las bandas se llevó a cabo utilizando el software ImageJ, estableciendo una relación matemática entre la intensidad de la señal de la proteína de interés y la del control de carga (α-tubulina).

4.4. Captación de glucosa con marcador 2-NBDG

El marcador 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) es un análogo fluorescente de la glucosa ampliamente utilizado para rastrear la captación intracelular de glucosa en células de mamíferos mediante imágenes de fluorescencia **(47,48)**. Su incorporación a las células es mediada por los transportadores de glucosa de manera dependiente de concentración, tiempo y temperatura, similar a la

glucosa natural **(47)**. Gracias a su facilidad de separación mediante HPLC-FLD, 2-NBDG permite evaluar eficientemente la actividad de captación de glucosa, convirtiéndolo en una herramienta útil en investigaciones preclínicas **(47)**.

4.4.1. Preparación de muestras con marcador 2-NBDG

Para llevar a cabo el ensayo de captación de glucosa con 2-NBDG, se optimizó la metodología descrita por Yang et al. (2022), mientras que las condiciones generales para esta técnica fueron adaptadas a partir del trabajo de Bala et al. (2021) **(47,49)**.

Tras completar la incubación con insulina, se retiró el medio de los pocillos y se añadió a todas las condiciones una solución de PBS estéril con 2-NBDG (Invitrogen, N13195) a una concentración de 50 µM. Las placas se incubaron durante 30 minutos en un ambiente oscuro a 37°C y 5% de CO_2. Después de este tiempo, se lavaron las muestras dos veces con PBS estéril frío para eliminar el 2-NBDG extracelular. Posteriormente, las células fueron lisadas utilizando 100 µL de buffer NP40 por pocillo. Una vez completada la lisis, el contenido celular fue transferido a tubos Eppendorf rotulados. Se reservaron 5 µL de cada condición para realizar determinación de proteínas por el método de Bradford, con el fin de asegurar la integridad de la muestra, mientras que los 95 µL restantes fueron destinados para la evaluación de la captación de glucosa en el ensayo.

Para la extracción del 2-NBDG, se realizó una precipitación de proteínas utilizando metanol, en una proporción de 2:1 V/V (metanol a lisado celular). Es decir, a los 95 µL de muestra se les agregó 190 µL de metanol. Una vez preparadas las muestras, estas fueron centrifugadas dos veces a 13.500 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a nuevos tubos Eppendorf para su posterior análisis en el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En caso de no realizar el análisis inmediato, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.

4.4.2. Evaluación de captación de glucosa en equipo HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), también conocida como cromatografía líquida de alta presión, es una técnica analítica fundamental en áreas como la química, la bioquímica y la farmacología **(50)**. Se utiliza ampliamente para identificar, separar, detectar y cuantificar una amplia gama de compuestos, incluidos fármacos y sus productos de degradación **(50)**. Esta técnica se basa en el principio de que una muestra disuelta se inyecta en una columna que contiene una fase estacionaria, mientras que una fase móvil fluye a alta presión a través de la columna **(50)**. La separación de los componentes de la muestra se logra mediante el proceso de adsorción en la fase estacionaria, que varía según la afinidad de los solutos **(50)**. El HPLC ofrece importantes ventajas, como rapidez, precisión, especificidad, exactitud y facilidad de automatización, lo que la convierte en una herramienta ideal para el análisis de fármacos y otros compuestos de interés **(50)**.

Para evaluar la captación de glucosa en las células C2C12 utilizando el marcador 2-NBDG mediante HPLC, una vez preparadas las muestras, estas se transfirieron a viales ámbar. Además, se incluyó un vial adicional como blanco, el cual contenía únicamente metanol. El análisis se realizó utilizando el cromatógrafo de alta resolución Shimadzu L20A, bajo las condiciones establecidas en la **tabla 3**, siguiendo los parámetros descritos por Yang et al. (2022) **(47)**.

Condiciones cromatográficas para 2-NBDG	
Fase móvil	Fase A (80%): Ácido fórmico al 0,1%, diluido en agua destilada Fase B (20%): Ácido fórmico al 0,1%, diluido en acetonitrilo
Detector	Fluorescencia
Onda de detección UV	480 nm
Onda de excitación	475 nm
Onda de emisión	550 nm

Columna	C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Tasa de flujo	0,3 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	15 minutos

Tabla 3: Condiciones cromatográficas para 2-NBDG.

4.5. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio ± error estándar de la media (SEM), basados en, al menos, tres experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó utilizando el análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA), con un nivel de significancia inferior al 5% ($p<0.05$). Posteriormente, se aplicó el test de Tukey como prueba post-hoc. La comparación entre dos condiciones experimentales se efectuó mediante el test t de Student de 2 colas ($p<0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de piperina en la activación de AMPK en modelo de resistencia inducida por palmitato

Se evaluó el efecto de piperina (5 µg/mL) sobre la relación p-AMPK/AMPK en presencia o ausencia de insulina (100 nM) en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación (**figura 4**). Se observó un aumento visual en la relación p-AMPK/AMPK en la condición tratada con palmitato, insulina y piperina, aunque esta diferencia presentó una alta variabilidad entre réplicas y no alcanzó significancia estadística. Por lo tanto, no se puede confirmar una tendencia clara y se requieren experimentos adicionales para validar este posible efecto.

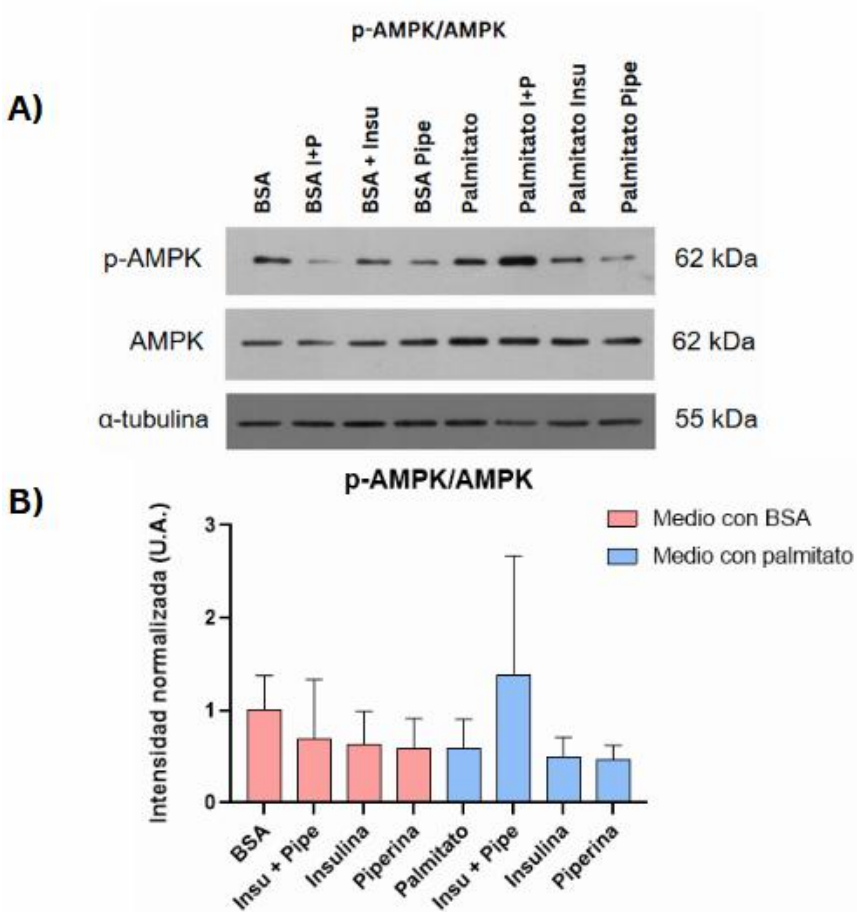


Figura 4: Efecto de piperina e insulina sobre la relación p-AMPK/AMPK en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. (A) Imagen representativa del efecto de piperina en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, evaluando la relativización de la fosforilación de AMPK en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. Se utilizó α-tubulina como control de carga. (B) Cuantificación densitométrica en la relación p-AMPK/AMPK en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina (n=3). El gráfico muestra el promedio de los datos junto con su desviación estándar. *BSA: albúmina de suero bovino; Insu (I): insulina; Pipe (P): piperina; p-AMPK: proteína AMPK fosforilada.*

Se evaluó el efecto de piperina (5 µg/mL) sobre la fosforilación de AMPK en el residuo Thr172, en presencia o ausencia de insulina (100 nM), en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, relativizando respecto al control de carga (**figura 5**). Se observó un leve aumento en la fosforilación de AMPK en las células tratadas con palmitato, insulina y piperina en comparación con otras condiciones; sin embargo, esta diferencia presentó una considerable variabilidad entre réplicas y no alcanzó significancia estadística. Por lo tanto, el efecto de la piperina sobre la activación de AMPK en este modelo no puede ser confirmado con los datos actuales y requiere mayor número de experimentos para ser validado.

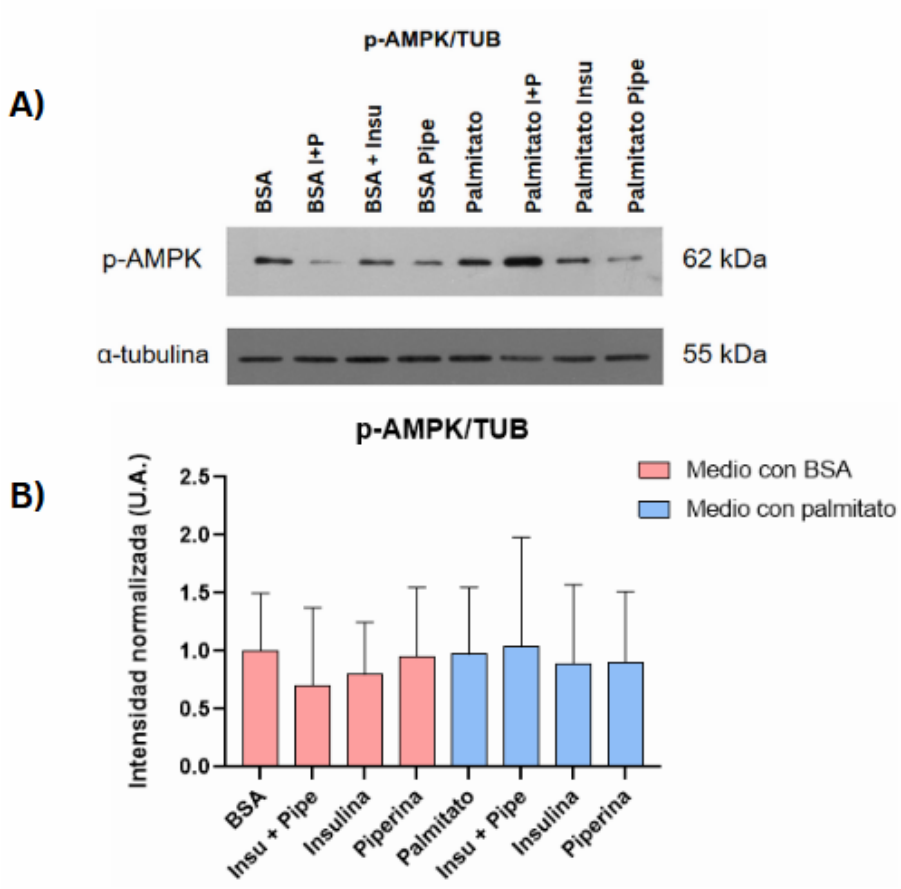


Figura 5: Efecto de piperina e insulina sobre la fosforilación de la proteína AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato. (A) Imagen representativa del efecto de piperina en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, mediante la evaluación de la fosforilación de AMPK en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. Se utilizó α-tubulina como control de carga. (B) Cuantificación densitométrica en la relación p-AMPK/α-tubulina en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina (n=3). El gráfico muestra el promedio de los datos junto con su desviación estándar. *BSA: albúmina de suero bovino; Insu (I): insulina; Pipe (P): piperina; p-AMPK: proteína AMPK fosforilada.*

Además, se evaluó el efecto de piperina (5 µg/mL) sobre la expresión de la proteína AMPK en presencia o ausencia de insulina (100 nM) en miotubos C2C12 que se encontraban en el sexto día de diferenciación (**figura 6**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

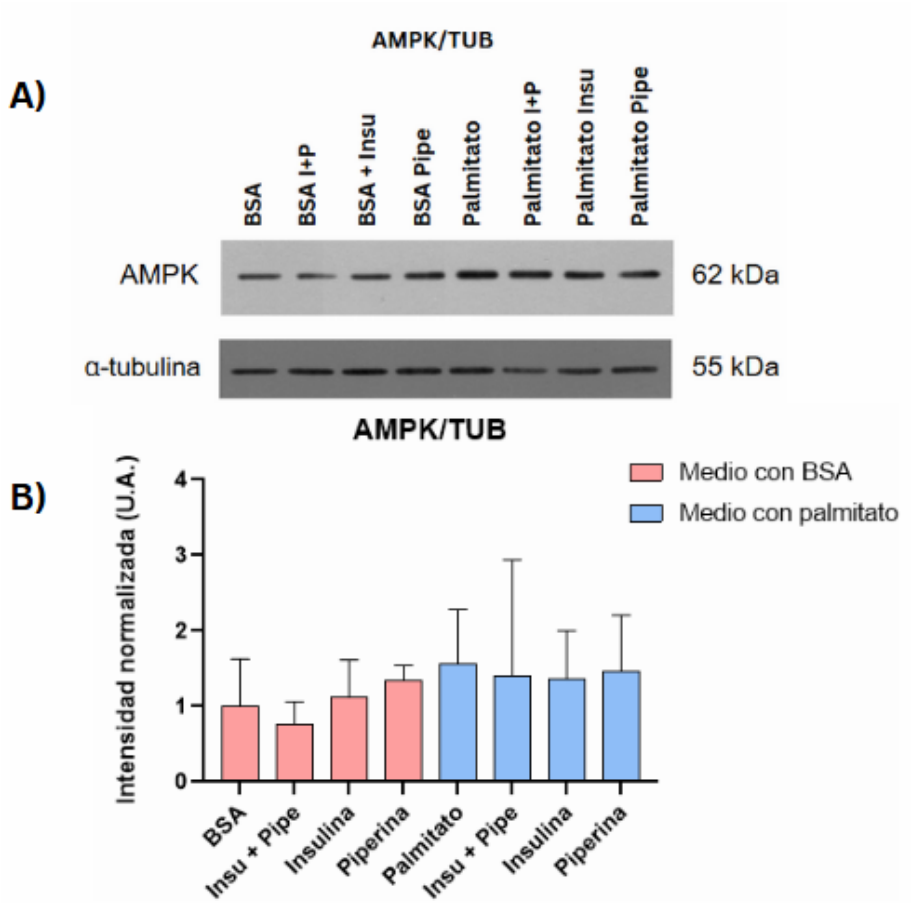


Figura 6: Efecto de piperina e insulina sobre la expresión de la proteína AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato. (A) Imagen representativa del efecto de piperina en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, mediante la expresión de AMPK total en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. Se utilizó α-tubulina como control de carga. (B) Cuantificación densitométrica en la relación AMPK/tubulina en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina (n=3). El gráfico muestra el promedio de los datos junto con su desviación estándar. *BSA: albúmina de suero bovino; Insu (I): insulina; Pipe (P): piperina.*

5.2. Captación de glucosa con marcador 2-NBDG en modelo de resistencia inducida por palmitato

En la **figura 7** se presenta un cromatograma a modo de ejemplo, el cual corresponde a la intensidad detectada de una solución de 2-NBDG disuelto en metanol (0,0015 µg/mL). En la **figura 8**, por otro lado, se presenta un cromatograma representativo del ensayo de captación de glucosa en miotubos C2C12 en una de las condiciones evaluadas. Como se observa en los cromatogramas de las figuras ya mencionadas, este análogo fluorescente de glucosa se separa en dos picos, correspondiente a sus dos anómeros (α y β). Para poder obtener una medida representativa de la concentración total del 2-NBDG presente en las muestras que se mostrarán a continuación (**figura 10 y 11**), es necesario sumar las áreas de ambos picos, lo que permite determinar la intensidad de la señal fluorescente detectada. Cabe mencionar que la intensidad es directamente proporcional a la cantidad de glucosa captada.

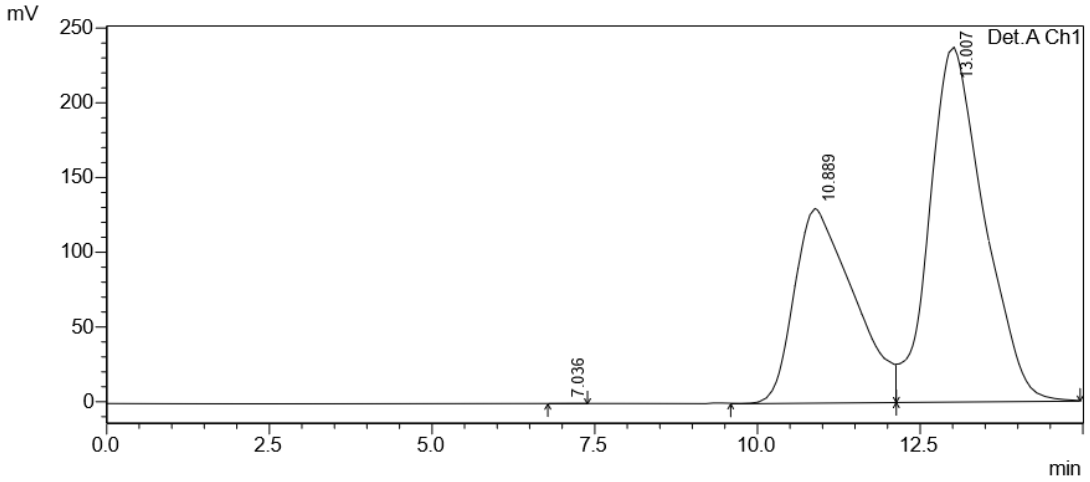


Figura 7: Cromatograma y tiempo de retención de 2-NBDG. Imagen representativa de los picos correspondientes a los anómeros α y β que forman el estándar de 2-NBDG, a una concentración de 0,0015 µg/mL.

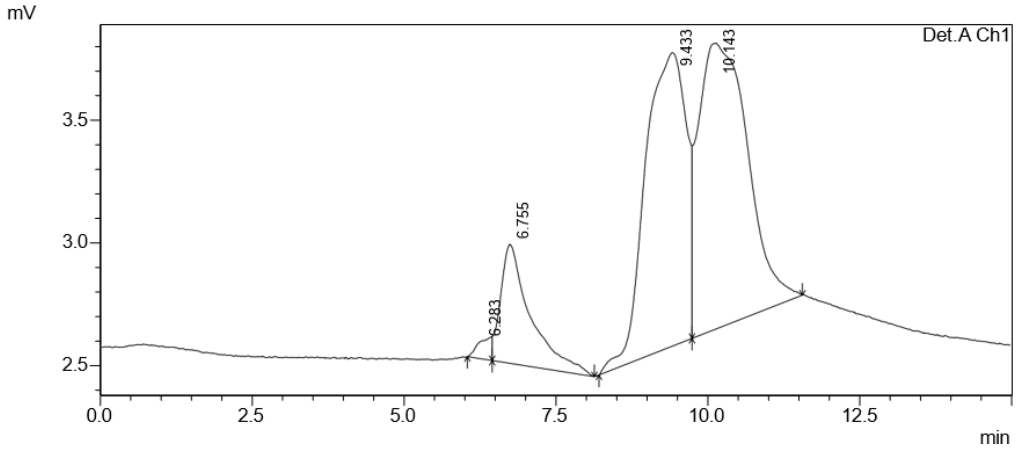


Figura 8: Cromatograma y tiempo de retención de 2-NBDG en miotubos C2C12. Imagen representativa de la captación de glucosa en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación en la condición control (BSA) con insulina (100 nM) y piperina (5 µg/mL).

En la **figura 9** se presenta la curva de calibración de 2-NBDG, en la que se utilizaron soluciones estándar de este análogo de glucosa conjugado con metanol, con concentraciones de: 0 - 1,9 - 3,8 - 5,7 - 7,6 - 9,5 - 11,4 - 13,3 - 15,2 µg/mL.

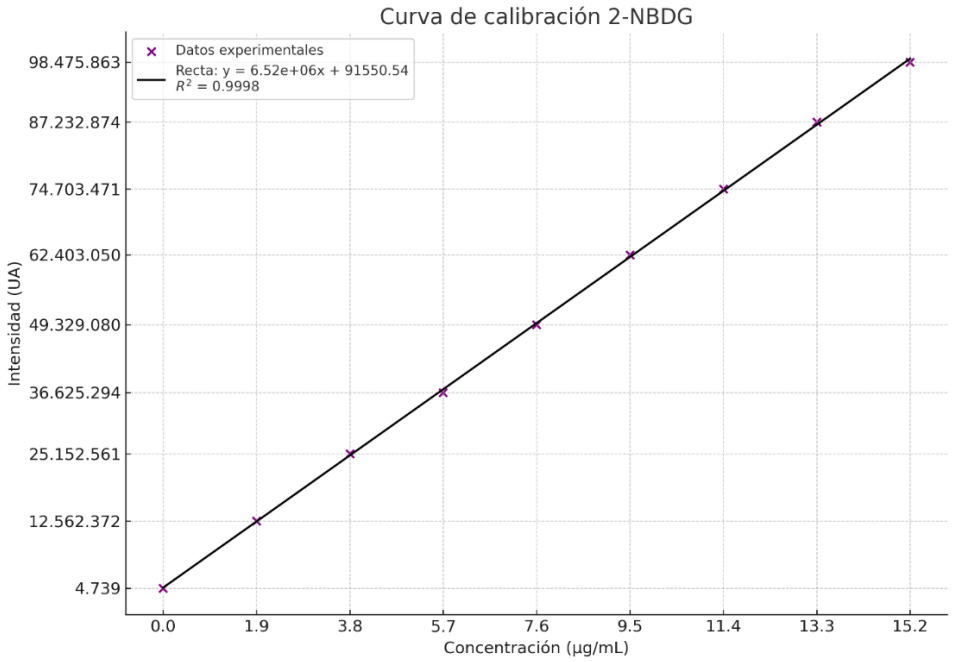


Figura 9: Curva de calibración de estándar 2-NBDG.

En la **figura 10** se muestran los resultados obtenidos en el primer ensayo de incorporación de 2-NBDG en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, dentro de las ocho condiciones evaluadas. De manera preliminar, se observa una tendencia hacia un aumento en la captación de glucosa en las células con resistencia inducida con palmitato que fueron tratadas con insulina (100 nM) y en las tratadas con piperina (5 µg/mL). Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para confirmar con mayor precisión el efecto de estos estímulos. Se muestran los datos del área bajo la curva calculada de forma directa (**Figura 10A**) y relativizados por la cantidad de proteínas totales calculada mediante el método de Bradford para cada condición (**Figura 10B**).

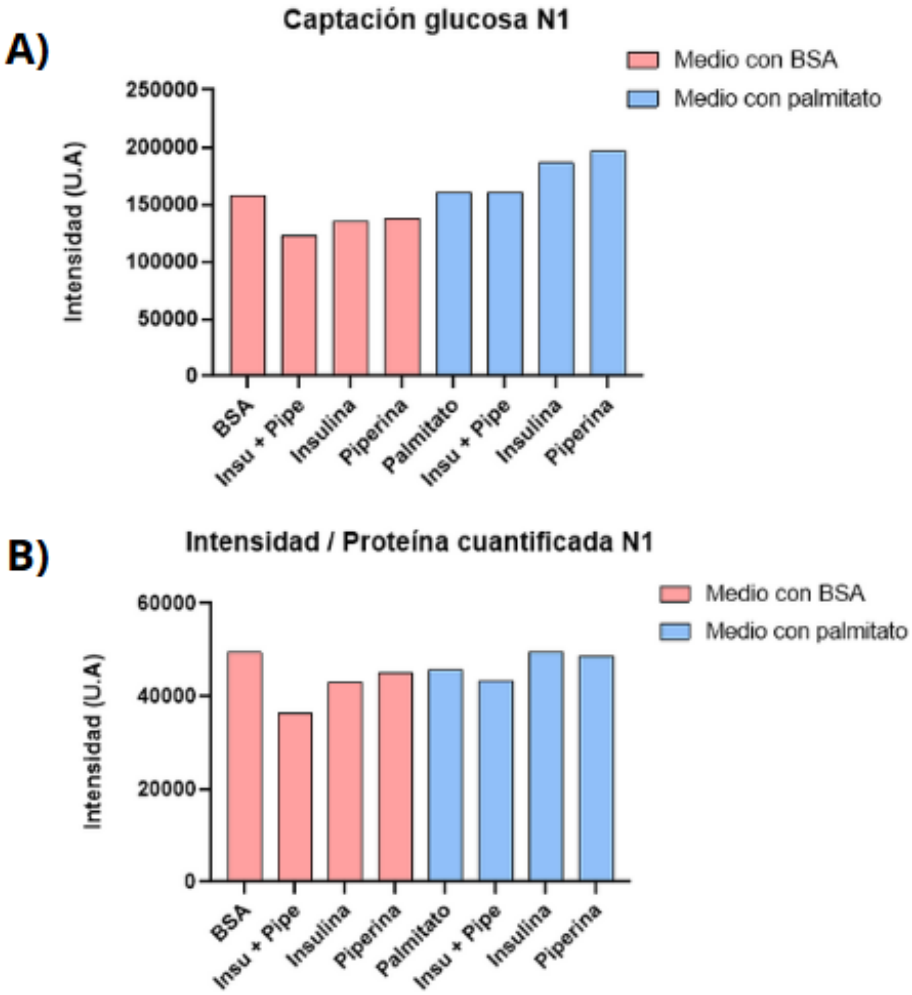


Figura 10: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa (primera repetición) en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. (A) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del 2-NBDG captada en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. (B) Relativización de la proporción intensidad/proteína en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. *BSA: albúmina de suero bovino; Insu: insulina; Pipe: piperina.*

En la **figura 11** se muestran los resultados obtenidos en el segundo ensayo de incorporación de 2-NBDG en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, dentro de las ocho condiciones evaluadas. De manera preliminar, se observa una tendencia hacia la recuperación de la captación de glucosa en aquellas células que presentaban resistencia inducida por palmitato que fueron tratadas con piperina (5 µg/mL) e insulina (100 nM). Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para confirmar con mayor precisión el efecto de estos estímulos. Se muestran los datos del área bajo la curva calculada de forma directa (**Figura 11A**) y relativizados por la cantidad de proteínas totales calculada mediante el método de Bradford para cada condición (**Figura 11B**).

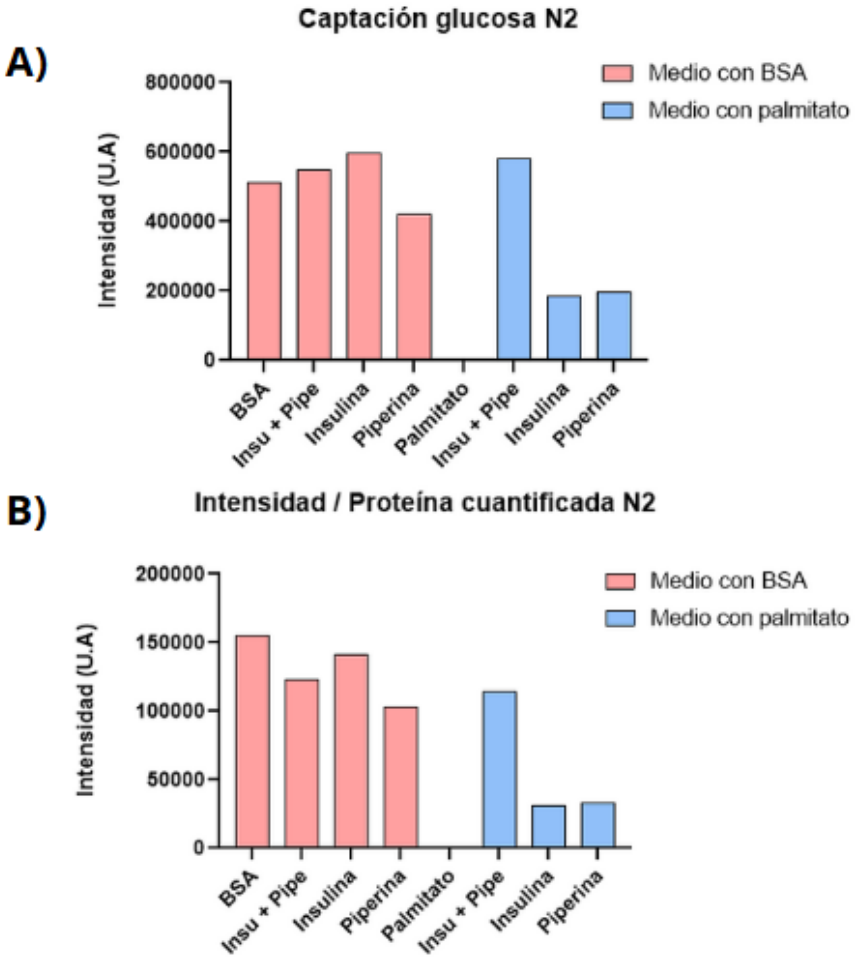


Figura 11: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa (segunda repetición) en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. (A) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del 2-NBDG captada en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. (B) Relativización de la proporción intensidad/proteína en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. *BSA: albúmina de suero bovino; Insu: insulina; Pipe: piperina*.

En la **figura 12** se muestra el promedio de los resultados obtenidos de las **figuras 10 y 11** respecto al ensayo de captación de 2-NBDG en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación. Se observa una tendencia a la recuperación de la capacidad de captar

glucosa en las células con resistencia inducida por palmitato que fueron tratadas con piperina (5 µg/mL) e insulina (100 nM). Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para confirmar con mayor precisión el efecto de estos estímulos.

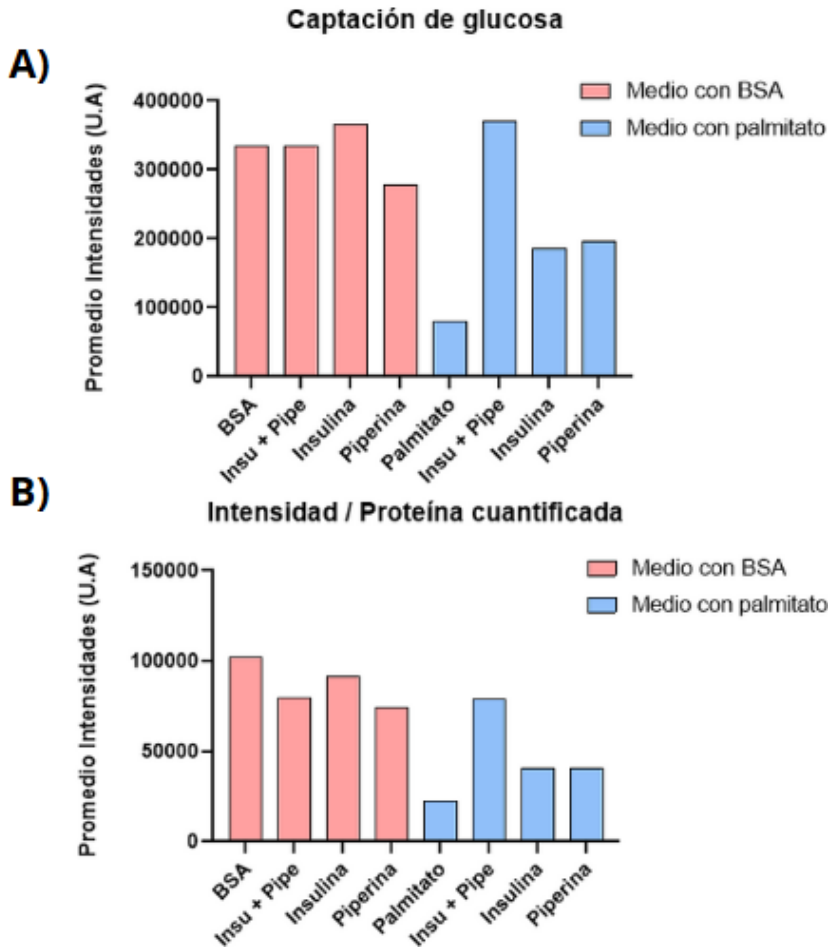


Figura 12: Efecto de piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. (A) Cuantificación promediada de la intensidad de fluorescencia del 2-NBDG captada en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. (B) Relativización promediada de la proporción intensidad/proteína en miotubos C2C12 en el sexto día de diferenciación, medida mediante el detector de fluorescencia de HPLC, en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. (n=2). *BSA: albúmina de suero bovino; Insu: insulina; Pipe: piperina.*

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica cuya prevalencia ha aumentado significativamente en las últimas décadas, proyectándose que en 2045 afectará a 783 millones de personas a nivel mundial **(1,2)**. En Chile, la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2017 reportó que el 12,3% de la población tiene diabetes **(1)**. Esta patología, además de su alta frecuencia, está asociada a una importante carga de morbilidad y mortalidad, siendo actualmente una de las principales preocupaciones de salud pública **(3,4)**.

La fase previa a la DM2 es la resistencia a la insulina, ésta se define como una disminución en la sensibilidad a esta hormona en sus tejidos diana, afectando así la captación de glucosa **(17)**. La resistencia insulínica afecta principalmente a tres órganos extra-pancreáticos: el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado **(5)**. De estos, el músculo esquelético es responsable del 80% del ingreso de la glucosa postprandial, por lo que se considera el principal regulador de la homeostasis de la glucosa y, por consiguiente, el principal responsable de la resistencia a la insulina **(7,16,22)**. Este trastorno metabólico es reversible y, actualmente, no existe un tratamiento farmacológico específico para él **(7)**. Los enfoques más efectivos se centran en cambios en el estilo de vida, como una alimentación saludable y la práctica regular de ejercicio **(7)**.

En este contexto, el palmitato, el ácido graso saturado más abundante en la dieta, se ha utilizado para establecer modelos de resistencia a la insulina *in vitro*, ya que simula las condiciones fisiopatológicas presentes en el músculo esquelético de pacientes con resistencia a la insulina asociada a consumo de dieta rica en grasa. Su uso con este fin está particularmente bien documentado en las líneas celulares musculares C2C12 y L6 **(39)**. Su acción está mediada por mecanismos moleculares como la acumulación de diacilglicerol (DAG) y ceramidas, lo que interfiere con la señalización de la insulina al reducir la captación de glucosa, especialmente en el músculo esquelético **(30)**. El palmitato activa también la vía PKC/NF-κB, lo que contribuye a la inflamación y a la disfunción de la señalización de la insulina **(30)**. El palmitato se utiliza y prefiere en

estudios *in* vitro ya que induce consistentemente un estado de resistencia mediante mecanismos moleculares bien definidos que afectan la cascada de señalización de la insulina, lo que facilita el estudio de intervenciones terapéuticas **(39)**.

Los productos naturales han sido ampliamente estudiados por su potencial terapéutico en diversas enfermedades humanas **(34)**. Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido utilizadas en la medicina tradicional debido a sus compuestos bioactivos y sus beneficios para la salud **(34)**.

Es por todo lo ya mencionado que surge el interés por la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la prevención y/o manejo de esta condición, en base a compuestos aislados desde plantas con usos terapéuticos documentados. El presente trabajo busca contribuir al conocimiento de estos tratamientos mediante el estudio del efecto de la piperina, el cual es un compuesto alcaloide encontrado en la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) **(35)**.

6.1. Efecto de piperina sobre la activación de AMPK en un modelo de resistencia inducida por palmitato

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la línea celular C2C12, la cual se obtuvo inicialmente mediante la inmortalización de células satélite aisladas de músculo esquelético de ratón **(51)**. Se considera un modelo idóneo ya que presentan un patrón de expresión proteica y respuesta a insulina similar a las células musculares humanas **(39)**. Este modelo también permite obtener resultados de manera rápida, además de permitir la manipulación genética mediante herramientas moleculares, generando sistemas de silenciamiento y sobreexpresión proteica. También se debe considerar que el modelo de resistencia a la insulina en estas células se encuentra ampliamente validado en la literatura **(30,39)**. Como limitaciones de este modelo podemos mencionar que, al tratarse de células de origen murino, su comportamiento puede variar respecto a lo que ocurre en el músculo humano. Por otro lado, al tratarse de células inmortalizadas, estas pueden

presentar modificaciones genéticas que afecten la cascada de señalización de insulina. Para minimizar este riesgo, se utilizaron células dentro de los primeros 10 pasajes.

Aunque en este estudio no se midieron directamente los marcadores clásicos de la señalización de insulina, la inducción de resistencia a la insulina con palmitato en las condiciones propuestas está respaldada por evidencia previa. En el trabajo de Vásquez (2023), se confirmó la inducción de resistencia mediante la observación de una disminución significativa en la fosforilación de proteínas clave de la vía insulínica, como Akt y el receptor de insulina (IR), en células C2C12 tratadas con palmitato en comparación con células no tratadas pero estimuladas con insulina **(41)**. Estos hallazgos avalan que el protocolo de exposición a palmitato utilizado en este y otros estudios es efectivo para generar resistencia a la insulina en este modelo celular, otorgando soporte biológico a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Uno de los objetivos propuestos en este estudio fue evaluar el efecto de la piperina sobre la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato en miotubos C2C12. La relevancia de estudiar esta vía radica en que se ha sugerido que la activación de AMPK es un componente clave en el efecto sensibilizador de la insulina, ya que se ha observado que el ejercicio agudo activa AMPK, lo que a su vez aumenta la captación de glucosa en los tejidos **(28)**.

En las **figuras 4 y 5**, se muestran los resultados de la fosforilación de AMPK en las condiciones control (BSA) y en las condiciones experimentales inducidas por palmitato. A pesar de observarse una tendencia al aumento de la fosforilación de AMPK en las células tratadas con palmitato, insulina y piperina, los resultados no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. Este hallazgo sugiere que, en el modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato, la piperina no genera un efecto directo claro sobre la activación de AMPK.

Varias razones podrían explicar este resultado, entre ellas las condiciones experimentales, dado que los efectos de compuestos como la piperina pueden depender tanto de la dosis como del tiempo de tratamiento. En este estudio, se utilizó una concentración de 5 µg/mL (aproximadamente 17.5 µM), la cual podría haber sido insuficiente para inducir una activación significativa de AMPK. Asimismo, la incubación con piperina durante 4 horas podría haber sido demasiado breve para observar un efecto relevante sobre esta vía. Además, no se descarta que la actividad del extracto de piperina utilizado en el trabajo haya disminuido con el tiempo debido a procesos de degradación, lo que podría haber afectado los resultados. Finalmente, es importante considerar la sensibilidad limitada de la técnica de Western Blot, ya que la magnitud de la activación de AMPK pudo haber sido inferior a las detectables por el método.

Publicaciones previas han sugerido que piperina podría tener efectos en la activación o modulación de AMPK, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el estudio de Maeda et al. (2018), se llevaron a cabo diversas mediciones para identificar qué especias promovían la captación de glucosa **(34)**. Entre las mediciones realizadas se incluyó la cantidad de proteína GLUT-4, activación de AMPK y la Ca^{2+}/calmodulina-dependiente proteína quinasa beta (CaMKKβ), entre otras **(34)**. Los resultados mostraron que la incubación con extracto de pimienta negra y blanca (piperina), en concentraciones de 20-30 µM por 1 hora, aumentó los niveles de Ca^{2+} intracelular en miotubos L6 provenientes de rata, provocando así la activación de una enzima necesaria para la fosforilación de AMPK, la CaMKKβ, a través del canal vanillioide 1 (TRPV1) **(34)**. La activación de AMPK (mediada por la fosforilación) facilita la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática, por lo que este también sería parte del mecanismo propuesto para explicar cómo la piperina mejora la captación de glucosa en estas células musculares **(34)**. En este mismo trabajo se realizó un estudio *in vivo* para complementar y validar los hallazgos obtenidos en los estudios *in vitro*. Aquí se utilizaron ratas Wistar a las cuales se trataron por vía oral con piperina (0.01 o 0.1 mg/kg) 4 horas antes de ser expuestas a una prueba de tolerancia de glucosa oral **(34)**. Con esto se obtuvo que la administración oral de piperina disminuyó significativamente la hiperglicemia posprandial, así como también, promovió la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática del músculo

esquelético, lo que se acompañó de un aumento en la fosforilación de AMPK y de CAMKKβ, indicando la activación de esta vía metabólica **(34)**.

Un trabajo realizado en 2017 estudió el efecto de piperina en diferentes líneas celulares, dentro de las líneas musculares utilizadas se encontraban mioblastos C2C12 y miotubos L6. Este estudio se centró en investigar cómo la piperina estándar (30 μM, con tiempo de incubación variable dependiendo del tipo de experimento, desde 1 hasta 24 horas) induce efectos metabólicos beneficiosos en células musculares en estado estándar (basal) **(38)**. Este estudio mostró que la piperina estimula la activación de AMPK en miotubos C2C12 y mioblastos primarios, lo que incrementa la captación de glucosa. La fosforilación de AMPKα ocurrió de forma dependiente de la dosis y el tiempo, y fue confirmada por la activación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (una proteína regulada directamente por AMPK). Además, el efecto de la piperina en la captación de glucosa fue inhibido por el compuesto C, un bloqueador de AMPK, lo que demuestra que este proceso depende de AMPK **(38)**. La piperina también aumentó los niveles de lactato intracelular y la relación AMP:ATP, indicando un estado de estrés energético que activa la vía AMPK-p38 MAPK y facilita la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática **(38)**. Estos hallazgos sugieren que la piperina mejora la captación de glucosa en el músculo esquelético a través de la activación de la vía AMPK-p38 MAPK, con el lactato como mediador clave **(38)**.

Aunque los resultados del presente estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas, es importante considerar las limitaciones asociadas al bajo número de repeticiones biológicas (n=3), lo cual podría haber restringido el poder estadístico del análisis. Por ello, se sugiere realizar estudios adicionales con un mayor número de repeticiones, así como explorar diferentes tiempos de incubación y ampliar el rango de concentraciones de piperina, con el objetivo de obtener una caracterización más precisa de su posible efecto sobre la activación de AMPK en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato.

6.2. Efecto de piperina sobre la captación de glucosa en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato

El ensayo de captación de glucosa utilizando el análogo fluorescente 2-NBDG es una herramienta funcional reconocida para evaluar el transporte de glucosa en células musculares. Bala et al. (2021) validaron y estandarizaron este protocolo específicamente en miotubos C2C12 sometidos a resistencia a la insulina inducida por estrés inflamatorio con TNF-α o estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) **(49)**. Aunque el enfoque principal del estudio de Bala et al. no fue investigar tratamientos para revertir la resistencia, sino demostrar la eficacia de su protocolo, esta validación respalda la aplicación de este método para evaluar captación funcional en modelos celulares de resistencia a la insulina.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del alcaloide piperina sobre miotubos C2C12 con resistencia inducida por palmitato en las condiciones control (BSA): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina, y en las condiciones experimentales (palmitato): con insulina y piperina, sólo con insulina, sólo con piperina. Para complementar los resultados obtenidos mediante *Western Blot* se realizó un ensayo de captación de glucosa con el marcador 2-NBDG, donde se midió la intensidad de la señal fluorescente emitida por parte de este mediante el equipo HPLC (entendiendo que la intensidad es directamente proporcional a la cantidad de glucosa captada por las células). El 2-NBDG es un análogo fluorescente de la glucosa, diseñado para imitar su estructura y ser utilizado como indicador en ensayos de captación de glucosa **(47,52)**. Este compuesto se capta en las células a través de los transportadores de glucosa (GLUTs), compitiendo con la glucosa por su entrada en la célula **(52)**. El 2-NBDG emite fluorescencia permitiendo cuantificar la cantidad de glucosa captada por la célula, lo que refleja la actividad de captación de glucosa **(52)**.

En las **figuras 10, 11 y 12** se obtuvieron resultados representativos donde se observó una tendencia hacia la recuperación de la captación de glucosa en las células con resistencia inducida por palmitato cuando fueron tratadas con piperina (5 µg/mL) e

insulina (100 nM), en comparación con las condiciones individuales o sin tratamiento. Este patrón sugiere un efecto sinérgico potencial entre piperina e insulina, que podría estar contribuyendo a restaurar parcialmente la sensibilidad insulínica en este modelo de disfunción metabólica. El ensayo de captación de glucosa ofrece un enfoque complementario de carácter funcional, que puede ser más sensible o integrativo al reflejar el resultado acumulado de múltiples rutas de señalización involucradas en la captación de glucosa, más allá de la fosforilación de un único blanco molecular. Así, la captación de glucosa puede aumentar incluso en ausencia de una activación detectable de AMPK, posiblemente por mecanismos alternativos o redundantes, como la modulación de GLUT-4, la activación basal de otras quinasas, o efectos indirectos de la piperina sobre el metabolismo celular.

Es importante mencionar que en el ensayo de captación de glucosa utilizando el análogo fluorescente 2-NBDG, no se observó el incremento esperado en la incorporación de este marcador en presencia de insulina, lo cual es una respuesta típica esperada en células musculares sensibles a esta hormona. La ausencia de un incremento significativo sugiere que, bajo los parámetros establecidos (concentración de 2-NBDG, tiempo de incubación, estado de las células), los miotubos C2C12 podrían no estar incorporando cantidades suficientes de 2-NBDG para generar una señal detectable y diferenciable mediante la técnica de HPLC-FLD. Además, al comparar las concentraciones intracelulares estimadas de 2-NBDG con la curva de calibración realizada con el estándar puro, se evidenció que los valores detectados en las muestras celulares están muy por debajo del rango utilizado en la calibración. Esto indica que la sensibilidad del método, o bien la eficiencia de incorporación y extracción del 2-NBDG en las células, podría ser insuficiente para reflejar cambios sutiles en la captación inducida por insulina o piperina en este modelo. En consecuencia, se recomienda optimizar las condiciones experimentales del ensayo, ajustando parámetros como la concentración y el tiempo de incubación de 2-NBDG. De igual forma se sugiere el uso de técnicas complementarias, como la microscopía de fluorescencia en células vivas, ya que podría facilitar una detección más directa y sensible de la captación de glucosa a nivel celular.

Cabe señalar que en la segunda repetición del ensayo de captación (**figura 11**) se observó una ausencia de señal en la condición experimental con sólo palmitato, lo que podría deberse a múltiples factores, tales como: citotoxicidad inducida por palmitato, interferencia en la incorporación de 2-NBDG debido a que el palmitato induce resistencia a la insulina al alterar la señalización y la función de los transportadores de glucosa, especialmente GLUT-4, lo que inhibe la entrada de 2-NBDG, posiblemente llevándola por debajo del límite de detección. Otros factores que pueden explicar esta ausencia de señal son las diferencias en la calidad celular al momento del tratamiento (variaciones en la densidad celular, el estado de diferenciación, el pH del medio o la calidad del suero podrían haber influido negativamente en la sensibilidad del ensayo) o problemas técnicos en la detección de fluorescencia (HPLC). Estas limitaciones metodológicas deben considerarse en futuras optimizaciones del modelo experimental. Se sugiere ajustar cuidadosamente la concentración de palmitato y su tiempo de exposición (ya que si este es muy prolongado puede causar un daño celular excesivo o citotoxicidad, afectando la viabilidad y la funcionalidad metabólica), estandarizar la curva dosis-respuesta del 2-NBDG de manera adecuada, controlar rigurosamente la viabilidad celular previa al ensayo y asegurar condiciones estables durante la cuantificación por HPLC.

Los resultados preliminares de este estudio son respaldados por un trabajo reciente que evaluó el efecto de PipeNig®-FL, un extracto fluido de pimienta negra rico en trans-β-cariofileno, sobre la captación de glucosa y la translocación de GLUT-4 en miotubos C2C12 diferenciados **(53)**. En dicho estudio, las células fueron privadas de glucosa y suero durante 24 horas antes de ser tratadas con concentraciones de 1, 10 y 100 nM de PipeNig®-FL durante 30 minutos, en presencia de 100 µM de 2-NBDG para medir la captación de glucosa. Para el análisis de translocación de GLUT-4, se incubaron con PipeNig®-FL o insulina (25 nM) durante el mismo tiempo. Los resultados mostraron un aumento significativo en la captación de glucosa y una translocación clara de GLUT-4 hacia la membrana plasmática, con efectos similares a los de la insulina, lo cual respalda el potencial de compuestos derivados de *Piper nigrum* para mejorar la captación de glucosa en células musculares **(53)**.

Con respecto al uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Detección de Fluorescencia (HPLC-FLD), este es un método que implica la lisis y extracción de las células después de la incubación con 2-NBDG, seguida de la separación de este análogo de glucosa de otras sustancias celulares y compuestos en el sistema y su posterior detección de fluorescencia **(47)**. La separación cromatográfica permite diferenciar el 2-NBDG de otros compuestos fluorescentes celulares endógenos o productos de degradación, reduciendo interferencias y evitando resultados falsos positivos. Además, esta es una técnica que se describe como sensible, simple y precisa para la cuantificación intracelular de 2-NBDG **(47)**. Sin embargo, este método se puede ver afectado por diversas variables, por ejemplo, la calidad y polaridad de la fase móvil y columna cromatográfica, ya que el uso de una fase inadecuada o poco compatible puede causar coelución o mala resolución, afectando de este modo la detección. Dentro de las limitaciones también se encuentra la pérdida de sensibilidad por saturación o deterioro de la columna, ya que el uso repetido con muestras celulares puede ensuciar la columna, obstruirla o modificar su química superficial, disminuyendo la eficiencia y provocando variabilidad inter-ensayo. Finalmente, también existe una variabilidad en la calidad de la extracción o lisado celular, dado que la cuantificación del 2-NBDG depende de una extracción eficiente y uniforme desde las células, esto puede verse afectado por la densidad celular, grado de diferenciación, heterogeneidad del cultivo y de la técnica aplicada por parte del analista. Es por esto que, se sugiere realizar experimentos complementarios con otras metodologías donde se pueda evaluar la captación de glucosa con el marcador 2-NBDG, como la microscopía de fluorescencia en células vivas.

Con respecto a las limitaciones de este trabajo, la estandarización de la técnica de captación de glucosa con 2-NBDG en miotubos C2C12 con resistencia inducida por palmitato no pudo completarse en su totalidad, sin embargo, se estableció un protocolo teórico robusto y se logró implementar de forma preliminar un diseño experimental que permitió obtener resultados representativos en dos repeticiones independientes (n=2). Para completar la estandarización experimental de la técnica de captación de glucosa con 2-NBDG en miotubos C2C12 con resistencia inducida por palmitato, es necesario optimizar principalmente dos variables críticas: la concentración de 2-NBDG y el tiempo

de incubación con este marcador. En este estudio se utilizó una concentración de 50 µM y un tiempo de incubación de 30 minutos, parámetros que podrían haber sido insuficientes para lograr una incorporación celular suficiente y una señal detectable robusta. Por ello, se sugiere explorar rangos mayores de concentración y tiempos de incubación más prolongados, buscando un balance que maximice la señal sin afectar la viabilidad celular ni la especificidad del ensayo.

Debido que hubo un bajo número de repeticiones, no fue posible extraer conclusiones estadísticas robustas, por lo que se sugiere, primeramente, llevar a cabo la estandarización de este método en el modelo de resistencia inducida por palmitato. Asimismo, se recomienda realizar más experimentos con mayores repeticiones con análisis estadísticos cuantitativos.

Aunque preliminares, estos resultados tienden a indicar que la piperina podría tener un rol beneficioso en la mejora de la captación de glucosa en células con resistencia a la insulina inducida por lípidos, y sientan una base sólida para futuras investigaciones con mayor validación experimental.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el efecto del alcaloide piperina sobre la captación de glucosa en miotubos C2C12 en un modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato. Para ello, se abordaron dos aproximaciones complementarias: la evaluación de la activación de AMPK mediante Western Blot y la cuantificación funcional de captación de glucosa a través del marcador fluorescente 2-NBDG medido por HPLC-FLD.

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la activación de AMPK bajo las condiciones experimentales utilizadas, se identificó una tendencia al aumento en la fosforilación de AMPK en las células tratadas con palmitato, insulina y piperina. Este hallazgo sugiere un posible efecto modulador de la piperina sobre esta vía metabólica, aunque la magnitud de la respuesta podría haber estado por debajo del umbral de detección del ensayo o requerir ajustes en dosis y tiempos de exposición.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos de captación de glucosa indicaron una tendencia consistente a la recuperación de la captación en las condiciones con palmitato donde se estimuló con piperina e insulina, en comparación con las condiciones individuales o sin tratamiento. Esta observación preliminar plantea la posibilidad de un efecto sinérgico o coadyuvante de la piperina en la mejora funcional de la sensibilidad insulínica en células musculares resistentes.

No obstante, el bajo número de repeticiones y la falta de estandarización completa de algunos procedimientos limitan la solidez estadística de los resultados, por lo que se requieren estudios adicionales con mayor robustez experimental.

En conjunto, los hallazgos obtenidos proporcionan una base teórica y preliminar desde la cual desarrollar futuras investigaciones orientadas a validar el potencial terapéutico de la piperina en la regulación del metabolismo de glucosa en contextos de resistencia insulínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Von Oetinger G. A., Trujillo G. L.M., Soto I. N. Análisis de la investigación clínicacientífica sobre diabetes mellitus en Chile-13 años [Analysis of Clinical-Scientific Research on Diabetes Mellitus in Chile: A 13-Year Study]. Rev Med Chil. [Internet]. 2023;151(12):1604-1612. Disponible en: https://doi.org/10.4067/s0034-98872023001201604.

2. Tinajero M.G., Malik V.S. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes: A Global Perspective. Endocrinol Metab Clin North Am. [Internet]. 2021;50(3):337-355. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.05.013.

3. Naranjo-Hernández Y. La diabetes mellitus: un reto para la Salud Pública. Rev Finlay [Internet]. 2016;6(1). Disponible en: http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/399

4. Fernández-Esteban I., Pérez-Navarro A., Subirà-Casacuberta C., et al. Epidemiología de la diabetes mellitus. Rev Med Clin Las Condes [Internet]. 2016;27(2):201-7. Disponible en: https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-epidemiologia-de-la-diabetes-mellitus-S0716864016300037

5. Galicia-Garcia U., Benito-Vicente A., Jebari S., et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Mol Sci. [Internet]. 2020;21(17):6275. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ijms21176275.

6. Faselis C., Katsimardou A., Imprialos K., et al. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. Curr Vasc Pharmacol. [Internet]. 2020;18(2):117-124. Disponible en: https://doi.org/10.2174/1570161117666190502103733. PMID: 31057114.

7. Merz K.E., Thurmond D.C. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. Compr Physiol. [Internet]. 2020;10(3):785-809. Disponible en: https://doi.org/10.1002/cphy.c190029.

8. Leiva A.M., Martínez M. A., Petermann F., et al . Factores asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en Chile. Nutr. Hosp. [Internet]. 2018; 35(2): 400-407. Disponible en: https://dx.doi.org/10.20960/nh.1434.

9. Rojas de P E., Molina R., Rodríguez C. Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. Rev. Venez. Endocrinol. Metab. [Internet]. 2012; 10 (Suppl 1):

7-12. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102012000400003&lng=es.

10. Gutiérrez-Rodelo C., Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes J.A. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. Gac Med Mex. [Internet]. 2017;153(2):214-228. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28474708/.

11. Yaribeygi H., Farrokhi F.R., Butler A.E., et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. J Cell Physiol. [Internet]. 2019;234(6):8152-8161. Disponible en: https://doi.org/10.1002/jcp.27603.

12. Martínez B.A., Maldonado H.J., López A.M. Diagnostic methods of insulin resistance in a pediatric population. Bol Med Hosp Infant Mex. [Internet]. 2011;68(5):397-404. Disponible en: https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=33864.

13. Lee S.H., Park S.Y., Choi C.S. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. Diabetes Metab J. [Internet]. 2022;46(1):15-37. Disponible en: https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280.

14. Leyva Montero M. de los Á., Rodríguez Moldón Y., Rodríguez Duque R., et al. Mecanismos moleculares de la secreción de insulina. ccm [Internet]. 2020; 24(2):764-780. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812020000200764&lng=es.

15. Tokarz V.L., MacDonald P.E., Klip A. The cell biology of systemic insulin function. J Cell Biol. [Internet]. 2018;217(7):2273-2289. Disponible en: https://doi.org/10.1083/jcb.201802095.

16. Abdul-Ghani M.A., DeFronzo R.A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. J Biomed Biotechnol. [Internet]. 2010;2010:476279. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2010/476279.

17. Sampath Kumar A., Maiya A.G., Shastry B.A., et al. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. Ann Phys Rehabil Med. [Internet]. 2019;62(2):98-103. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.rehab.2018.11.001.

18. Cipriani-Thorne E., Quintanilla A. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. Revista Medica Herediana. [Internet]. 2010;21(3):160–71. Disponible en: https://doi.org/10.20453/rmh.v21i3.1126.

19. Alvim R.O., Cheuhen M.R., Machado S.R., et al. General aspects of muscle glucose uptake. An Acad Bras Cienc. [Internet]. 2015;87(1):351-68. Disponible en: https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140225.

20. Świderska E., Strycharz J., Wróblewski A., et al. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. Blood Glucose Levels. IntechOpen. [Internet]. 2020. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80402.

21. Peifer-Weiß L., Al-Hasani H., Chadt A. AMPK and Beyond: The Signaling Network Controlling RabGAPs and Contraction-Mediated Glucose Uptake in Skeletal Muscle. Int J Mol Sci. [Internet]. 2024;25(3):1910. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ijms25031910.

22. Hulett N.A., Scalzo R.L., Reusch J.E.B. Glucose Uptake by Skeletal Muscle within the Contexts of Type 2 Diabetes and Exercise: An Integrated Approach. Nutrients. [Internet]. 2022;14(3):647. Disponible en: https://doi.org/10.3390/nu14030647.

23. Chang L., Chiang S.H., Saltiel A.R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. Mol Med. [Internet]. 2004;10(7-12):65-71. Disponible en: https://doi.org/10.2119/2005-00029.Saltiel.

24. Khan A.H., Pessin J.E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. Diabetologia. [Internet]. 2002;45(11):1475-83. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s00125-002-0974-7.

25. Draicchio F., Behrends V., Tillin N.A., et al. Involvement of the extracellular matrix and integrin signalling proteins in skeletal muscle glucose uptake. J Physiol. [Internet]. 2022;600(20):4393-4408. Disponible en: https://doi.org/10.1113/JP283039.

26. Sylow L., Kleinert M., Richter E.A., et al. Exercise-stimulated glucose uptake - regulation and implications for glycaemic control. Nat Rev Endocrinol. [Internet]. 2017;13(3):133-148. Disponible en: https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.162.

27. Schimmack G., Defronzo R.A., Musi N. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. Diabetes Obes Metab. [Internet].

2006;8(6):591-602. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00561.x.

28. Fujii N., Jessen N., Goodyear L.J. AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. Am J Physiol Endocrinol Metab. [Internet]. 2006;291(5):E867-77. Disponible en: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00207.2006.

29. Coll T., Eyre E., Rodríguez-Calvo R., et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. J Biol Chem. [Internet]. 2008;283(17):11107-16. Disponible en: https://doi.org/10.1074/jbc.M708700200.

30. Jové M., Planavila A., Vázquez-Carrera M. El ácido palmítico estimula la producción de interleucina 6 en células musculares esqueléticas por activación de la proteincinasa C y el factor nuclear κB. Clín Invest Arterioscler. [Internet]. 2005;17(6):259-69. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S0214-9168(05)73353-2.

31. Sawada K., Kawabata K., Yamashita T., et al. Ameliorative effects of polyunsaturated fatty acids against palmitic acid-induced insulin resistance in L6 skeletal muscle cells. Lipids Health Dis. [Internet]. 2012;11:36. Disponible en: https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-36.

32. Guo Q., Wei X., Hu H., et al. The saturated fatty acid palmitate induces insulin resistance through Smad3-mediated down-regulation of FNDC5 in myotubes. Biochem Biophys Res Commun. [Internet]. 2019;520(3):619-626. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.077.

33. Trefts E., Shaw R.J. AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time. Mol Cell. [Internet]. 2021;81(18):3677-3690. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.015.

34. Maeda A., Shirao T., Shirasaya D., et al. Piperine Promotes Glucose Uptake through ROS-Dependent Activation of the CAMKK/AMPK Signaling Pathway in Skeletal Muscle. Mol Nutr Food Res. [Internet]. 2018;62(11):e1800086. Disponible en: https://doi.org/10.1002/mnfr.201800086.

35. Derosa G., Maffioli P., Sahebkar A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. Adv Exp Med Biol. [Internet]. 2016;928:173-184. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-41334-1_8.

36. Jwa H., Choi Y., Park U.H., et al. Piperine, an LXRα antagonist, protects against hepatic steatosis and improves insulin signaling in mice fed a high-fat diet. Biochem Pharmacol. [Internet]. 2012;84(11):1501-10. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.009.

37. Liu C., Yuan Y., Zhou J., et al. Piperine ameliorates insulin resistance via inhibiting metabolic inflammation in monosodium glutamate-treated obese mice. BMC Endocr Disord. [Internet]. 2020;20(1):152. Disponible en: https://doi.org/10.1186/s12902-020-00617-1.

38. Kim N., Nam M., Kang M.S., et al. Piperine regulates UCP1 through the AMPK pathway by generating intracellular lactate production in muscle cells. Sci Rep. [Internet]. 2017;7:41066. Disponible en: https://doi.org/10.1038/srep41066.

39. Wong C.Y., Al-Salami H., Dass C.R. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage. J Pharm Pharmacol. [Internet]. 2020;72(12):1667-1693. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jphp.13359.

40. Ge L., Dong X., Gong X., et al. Mutation in myostatin 3'UTR promotes C2C12 myoblast proliferation and differentiation by blocking the translation of MSTN. Int J Biol Macromol. [Internet]. 2020;154:634-643. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.043.

41. Vásquez P. Efecto de la piperina en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas, en un modelo de resistencia inducida por palmitato [Internet] [Tesis Pregrado]. UNAB (Universidad Andrés Bello); 2023. Disponible en: https://repositorio.unab.cl/items/add083f8-8871-4c8e-91fa-c88317edb12e

42. Gao D., Nong S., Huang X., et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. J Biol Chem. [Internet]. 2010;285(39):29965-73. Disponible en: https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128694.

43. Nakamura S., Takamura T., Matsuzawa-Nagata N., et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem. [Internet]. 2009;284(22):14809-18. Disponible en: https://doi.org/10.1074/jbc.M901488200.

44. Ponce Rivera BA. Aislación de piperina a partir de pimienta negra comercial (Gourmet) y estudio de su actividad citotóxica en células RAW 264.7 TIB-7 [Tesis de grado]. Santiago: Universidad Andrés Bello; 2019. 122p. Disponible en:

https://es.scribd.com/document/595522710/Version-final-informe-Seminario-de-titulo-Bastian-Ponce-Rivera

45. Kielkopf C.L., Bauer W., Urbatsch I.L. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. Cold Spring Harb Protoc. [Internet]. 2020;2020(4):102277. Disponible en: https://doi.org/10.1101/pdb.top102277.

46. Hirano S. Western blot analysis. Methods Mol Biol. [Internet]. 2012;926:87-97. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_6.

47. Yang L., Wu S., Wei J., et al. A sensitive and simple HPLC-FLD-based method for the measurement of intracellular glucose uptake. Food Chem. [Internet]. 2022;372:131218. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131218.

48. Yamamoto T., Tanaka S., Suga S., et al. Syntheses of 2-NBDG analogues for monitoring stereoselective uptake of D-glucose. Bioorg Med Chem Lett. [Internet]. 2011;21(13):4088-96. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.04.148.

49. Bala M., Gupta P., Gupta S., et al. Efficient and modified 2-NBDG assay to measure glucose uptake in cultured myotubes. J Pharmacol Toxicol Methods. [Internet]. 2021;109:107069. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.vascn.2021.107069.

50. Chawla G., Chaudhary K.. A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis. [Internet]. 2019;6(2):27–39. Disponible en: https://doi.org/10.18231/j.ijpca.2019.006.

51. Asakura A, Kikyo N. Immunofluorescence analysis of myogenic differentiation. Methods Cell Biol [Internet]. 2022;170:117–25. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.02.010

52. Zou C., Wang Y., Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. J Biochem Biophys Methods. [Internet]. 2005;64(3):207-15. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.001.

53. Geddo F., Scandiffio R., Antoniotti S., et al. PipeNig®-FL, a Fluid Extract of Black Pepper (Piper Nigrum L.) with a High Standardized Content of Trans-β-Caryophyllene, Reduces Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes and Improves Glucose Uptake in C2C12 Myotubes. Nutrients. [Internet]. 2019;11(11):2788. Disponible en: https://doi.org/10.3390/nu11112788.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1: Protocolo *Western Blot*

A. Cultivo celular

- Sembrar células C2C12 en placas de 60 mm de diámetro utilizando como medio de cultivo los indicados en la **tabla 4**:

Medio de cultivo	Composición
Medio de crecimiento (MC)	DMEM 10% FBS + 1% P/E/A
Medio de diferenciación (MD)	DMEM 2% HS + 1% P/E/A
Medio con estímulo a evaluar	- Palmitato 250 µM - Piperina 5 µg/ml - Insulina 100 nM

Tabla 4: Medios utilizados en cultivo celular de células C2C12. *FBS: Suero Fetal Bovino; P/E/A: penicilina/estreptomicina/anfotericina.*

- La elección del medio de cultivo a utilizar depende del diseño experimental mostrado en la **tabla 5**.

Día del cultivo celular	Medio de cultivo utilizado
Día 0	Medio de crecimiento (MC)
Día 2	Medio de diferenciación (MD)
Día 6	MD libre de suero 1 g/L glucosa + Palmitato 250 µM
Día 7	- MD libre de suero 1 g/L glucosa + Piperina 5 µg/ml (4 horas)

	- MD libre de suero 1 g/L glucosa + Insulina 100 nM (15 minutos)

Tabla 5: Condiciones utilizadas durante el periodo del cultivo celular.

- En el día 7 de diferenciación, poner las placas sobre hielo y eliminar el medio de cultivo, lavar placas 2 veces con 2 mL de PBS frío, asegurando que se retire el PBS en su totalidad para evitar diluir las muestras.
- Terminado este proceso del séptimo día, se pueden almacenar las placas a -80°C para su posterior uso o empezar directamente con la extracción de proteínas totales.

B. Extracción de proteínas totales

- Retirar placas del congelador y almacenar en una caja con hielo mientras se realiza el experimento.
- Rotular tubos eppendorf para cada una de las condiciones a evaluar.
- A cada placa (de 60 mm) agregar 150 µL buffer de lisis (NP40 o RIPA). Una vez agregado, homogeneizar y raspar con un raspador de células.
- Recuperar contenido raspado en tubo eppendorf. Se recomienda raspar la mayor cantidad posible ya que de esto dependerá la cantidad de muestra que se tenga para realizar los siguientes experimentos.
- Limpiar raspador con agua destilada y secar cada vez que se cambie de placa o pocillo para evitar contaminación de las muestras.
- Una vez que se hayan raspado todas las placas, centrifugar tubos eppendorf a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- La centrifuga se debe configurar en la temperatura deseada antes de colocar los tubos en el rotor.
- En caso de que la cantidad de tubos sea impar, se debe utilizar un contrapeso para equilibrar el rotor de la centrifuga.

- Rotular una nueva serie de tubos Eppendorf.
- Recuperar sobrenadante y depositar en tubo Eppendorf, descartar el pellet.
- Guardar muestras a -80°C.

C. Cuantificación de proteínas

Para llevar a cabo la cuantificación de proteínas se utilizó una microplaca (96 pocillos). Cada condición se debe realizar en duplicado o triplicado. Para realizar la cuantificación de proteínas se utilizará el método de Bradford.

D. Método Bradford:

- Preparar solución de reactivo de Bradford considerando que a cada pocillo se debe agregar 40 µL de reactivo de Bradford, 158 µL de agua destilada y 2 µL de muestra. Para el blanco utilizar 2 µL de buffer de lisis utilizado en la extracción de proteínas.
- Preparar curva de calibrado a partir de un estándar de BSA en concentraciones de 0.125; 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0 y 4.0 µg/mL. Para el blanco utilizar 2 µL de agua destilada.
- Realizar la determinación para las muestras de concentración desconocida y para el blanco utilizar 2 µL de buffer de lisis utilizado en la extracción de proteínas.
- Medir absorbancia a 595 nm.
- Calcular promedio de absorbancias de las muestras y restarle la absorbancia del blanco, para obtener absorbancia corregida.
- Utilizar la curva de calibración para calcular la concentración de proteínas (µg/µL) a partir de la absorbancia corregida.

E. Preparación de muestras:

- Luego de calcular la concentración de proteínas, se debe calcular el volumen necesario para las muestras que serán cargadas en el gel de electroforesis.
- Realizar cálculos para cargar 25 µg de proteínas por muestra:

Ejemplo de cálculo para solución de muestras:

- Llevar todas las muestras a la misma concentración: 1 µg/µL
- Utilizando C1 x V1 = C2 x V2 determinar volumen de muestra a agregar:

  Donde:

  - ➔ C1: Concentración obtenida en cuantificación de proteínas
  - ➔ V1: Valor a determinar
  - ➔ C2: 1 µg/µL
  - ➔ V2: 25 µg/µL

- Agregar a todas las muestras buffer de carga 4X (1/3 del volumen de muestra).
- De ser necesario, se puede completar el volumen con buffer de lisis.

F. Preparación de reactivos

Para optimizar tiempos en los siguientes experimentos se recomienda mantener un stock de los siguientes reactivos (utilizar mascarilla en todo el procedimiento):

I. Solución de acrilamida A/BA:

- Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua destilada	c.s.p. 100 mL

Tabla 6: Preparación de solución de Acrilamida/Bisacrilamida.

- Agitar con agitador magnético.
- Filtrar solución para eliminar pelusas,
- Almacenar a 4°C.

II. Buffer lower 4X:

- Pesar los siguientes reactivos y ajustar pH= 8.8:

Reactivo	Cantidad
Tris-base	80 g
Agua destilada	c.s.p. 450 mL

Tabla 7: Reactivos buffer lower 4X.

- Una vez ajustado el pH, agregar:

Reactivo	Cantidad
SDS 10%	20 mL
Agua destilada	c.s.p. 500 mL

Tabla 8: Preparación de buffer lower 4X.

- Agitar con agitador magnético.

- Almacenar a temperatura ambiente.

III. Buffer upper 4X:

- Pesar los siguientes reactivos y luego ajustar pH= 6.8.

Reactivo	Cantidad
Tris-base	30 g
Agua destilada	c.s.p. 450 mL

Tabla 9: Reactivos buffer upper 4X.

- Una vez ajustado el pH, agregar:

Reactivo	Cantidad
SDS 10%	20 mL
Agua destilada	c.s.p. 500 mL

Tabla 10: Preparación de buffer upper 4X.

- Agitar con agitador magnético.
- Almacenar a 4°C.

IV. Buffer de corrida 10X:

- Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad

Tris-base	30.25 g
Glicina	114 g
SDS	10 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 11: Preparación de buffer de corrida 10X.

- Agitar con agitador magnético.
- Almacenar a temperatura ambiente.

V. Buffer de transferencia 10X:

- Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Tris-base	30.25 g
Glicina	114 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 12: Preparación de buffer de transferencia 10X.

- Agitar con agitador magnético.
- Almacenar a temperatura ambiente.

VI. TBS 10X:

- Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad

Tris-base	30 g
KCl	2 g
NaCl	80 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 13: Preparación TBS 10X.

- Agitar con agitador magnético.
- Ajustar a pH= 7.4.
- Almacenar a temperatura ambiente.

G. Electroforesis

- Montar vidrios de 1.5 mm en soporte asegurando que ambos vidrios queden alineados.
- Preparar soluciones de geles de electroforesis:

a) Preparación del gel separador continuo:

- En tubo falcon de 50 mL agregar los siguientes reactivos en el mismo orden presentado en la **tabla 14:**

Reactivo	Volumen
Agua destilada	5.2 mL
Buffer lower 4X	3.8 mL
A/BA	6.0 mL
TEMED	8 µL
APS 10%	68 µL

Tabla 14: Preparación del gel separador continuo al 12% de acrilamida.

- Agitar en vórtex.
- Agregar solución del gel separador (aproximadamente 7 mL por vidrio) a los vidrios de electroforesis.
- Agregar 1 mL de isopropanol sobre gel para emparejar y eliminar burbujas.
- Esperar aproximadamente 30-40 minutos para que gelifique.
- Antes de agregar el gel concentrador **(b)** eliminar isopropanol.

b) Preparación del gel concentrador:

- En tubo falcon de 15 mL agregar los siguientes reactivos en el mismo orden presentado en la **tabla 15:**

Reactivo	Volumen
Agua destilada	5.7 mL
Buffer upper 4X	2.5 mL
A/BA	1.7 mL
TEMED	10 µL
APS 10%	90 µL

Tabla 15: Preparación del gel concentrador 5%.

- Agitar en vórtex.
- Agregar solución de gel concentrador a los vidrios y colocar peineta de 10 pocillos.
- Esperar aproximadamente 30 minutos hasta que gelifique. En caso de dudas, esperar más tiempo antes de retirar la peineta para asegurar la correcta formación de los pocillos.

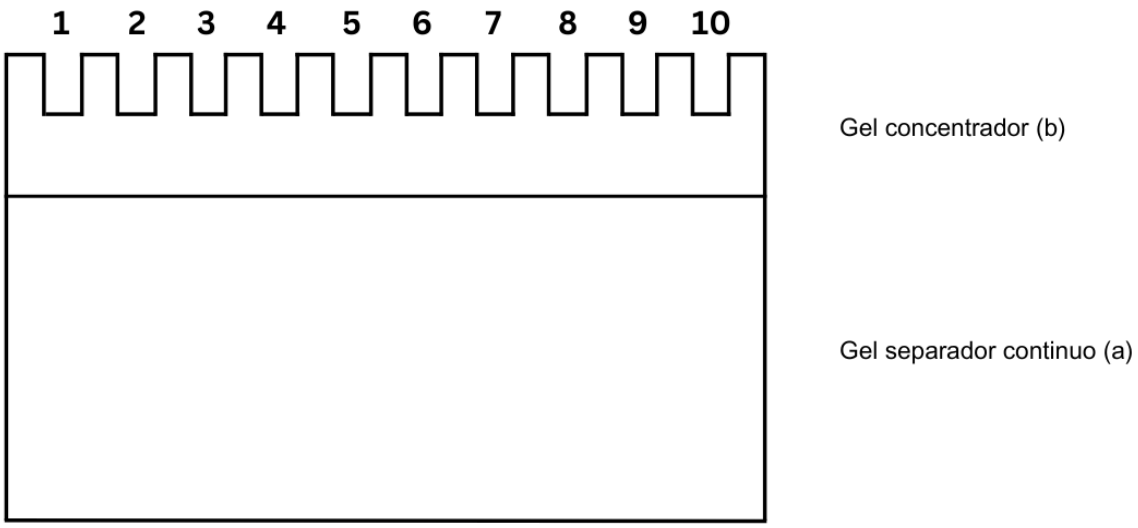


Figura 13: Imagen representativa de geles de electroforesis utilizando peineta de 10 pocillos.

- Una vez que se encuentren los geles gelificados, montar sistema de electroforesis en soporte para vidrios dentro del tanque y agregar buffer de corrida 1X (**tabla 16**):

Reactivo	Volumen
Buffer de corrida 10X	100 mL
Agua destilada	900 mL

Tabla 16: Preparación de buffer de corrida 1X.

- Llevar muestras a baño termorregulado a 90°C por 5 minutos y luego cargar muestras en el gel.
- Se recomienda cargar el estándar de peso molecular (4 µL) en primer lugar con la finalidad de poder identificar de forma más sencilla la ubicación de proteína de interés (**figura 14**):

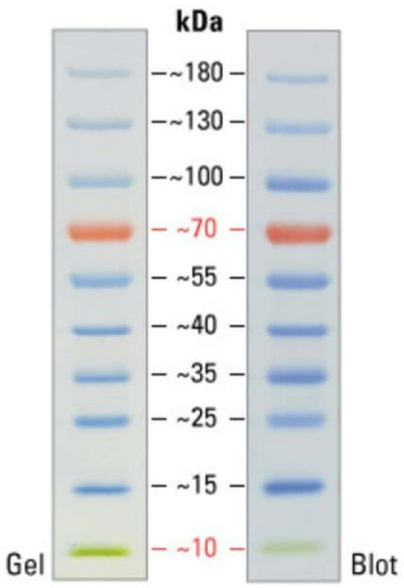


Figura 14: Pesos moleculares de estándar utilizado (Thermo Scientific™, #26616).

- Correr electroforesis a 80 V por 60 minutos (o hasta pasar el gel separador) y después a 100 V por 90 minutos o hasta la caída del frente de electroforesis.

H. Electrotransferencia

- Una vez terminada la electroforesis, desmontar y limpiar los vidrios con agua destilada.
- Separar los vidrios con ayuda de una espátula, cortar el gel concentrador y descartarlo, ya que sólo se trabajará con el gel separador continuo.
- En una bandeja de vidrio colocar buffer de transferencia 1X (**tabla 17**) y, posteriormente, sumergir el cassette de transferencia.

Reactivo	Volumen
Buffer de transferencia 10X	100 mL
Metanol	200 mL

Agua destilada	700 mL

Tabla 17: Preparación de buffer de transferencia 1X.

- Activar membrana de PVDF con metanol por aproximadamente 1 minuto.
- Abrir cassette. En el lado blanco/transparente colocar membrana de PVDF, y en el lado negro del cassette posicionar el gel, procurando que éste se encuentre en contacto con el lado liso de la membrana.
- Cerrar cassette, asegurando que no queden burbujas, ya que la presencia de estas puede provocar una transferencia incompleta y dificultar los pasos siguientes.
- Montar sistema de electrotransferencia, agregar buffer de transferencia 1X en el tanque y conectar lo electrodos, asegurándose de que los colores coincidan. Poner tanque dentro de una caja de plumavit y una unidad refrigerante de larga duración entre el tanque y la caja para evitar aumento de la temperatura.
- Transferir a 40 mA durante 16 horas.
- Terminada la electrotransferencia, desmontar y verificar que se haya transferido el estándar de peso molecular, para asegurar que la transferencia haya sido exitosa.
- Teñir la membrana con Rojo Ponceau por 5 minutos con agitación constante a temperatura ambiente para confirmar el éxito de la transferencia. Para optimizar el uso de la membrana en los pasos siguientes, esta se puede cortar mientras aún siga teñida para incubar más de un anticuerpo a la vez.
- Limpiar el Rojo Ponceau de la membrana con agua destilada. Luego continuar con tres lavados de 5 minutos con TBS-T (**tabla 18**), reemplazando el TBS-T entre lavados.

Reactivo	**Cantidad**
TBS 10X	100 mL
Tween 20	1 g

Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 18: Preparación de TBS-T.

I. Incubación de anticuerpos

- Bloquear membrana con solución de bloqueo de leche descremada al 5% en TBS-T (2.5 g en 50 mL) previamente filtrada durante 60 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.
- Preparar anticuerpos primarios de la siguiente forma:
    I. Solución anti-AMPK (1:1000): 5 µL de anticuerpo anti-AMPK en 5 mL de solución bloqueo. Agregar 10 µL de azida 10% y homogenizar.
    II. Solución anti-p-AMPK (1:1000): 5 µL de anticuerpo anti-p-AMPK en 5 mL de solución bloqueo. Agregar 10 µL de azida 10% y homogenizar.
    III. Solución anti-α-tubulina (1:5000): 2 µL de anticuerpo anti-α-tubulina en 10 mL de solución de bloqueo. Agregar 20 µL de azida 10% y homogenizar.
- Incubar anticuerpos primarios durante aproximadamente 12 horas a 4°C con agitación constante.
- Terminado el tiempo de incubación, recuperar la solución de éste y almacenar a -20°C (puede ser reutilizada múltiples veces).
- Lavar membrana tres veces con TBS-T por 5 minutos con agitación constante, cambiando el TBS-T entre lavados.
- Incubar anticuerpo secundario anti-mouse (1:1000, ThermoFisher, #61-6520) durante 60 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.
- Recuperar solución de anticuerpo secundario y guardar a -20°C.
- Lavar membrana tres veces con TBS-T por 5 minutos con agitación constante, cambiando el TBS-T entre lavados.

J. Revelado con films fotográficos

- En tres bandejas colocar las soluciones de revelado, fijado y agua, respectivamente, para facilitar el flujo de trabajo.
- Sobre una toalla de papel eliminar el excedente de TBS-T de la membrana y dejarla en un recipiente plástico limpio y seco.
- Apagar luz blanca y trabajar con luz roja a partir de este punto en adelante.
- Preparar solución ECL (Santa Cruz, sc-2048) agregando 1 mL de reactivo A y B, mezclar y depositar sobre la membrana.
- Observar reacción de quimioluminiscencia.
- Sobre una toalla de papel eliminar el excedente de la solución ECL.
- Cortar una bolsa plástica que permita depositar la membrana en su interior. Colocar bolsa dentro del cassette de revelado.
- Abrir caja con films, cortar del tamaño aproximado de la membrana y cortar esquina superior derecha para identificar la orientación del revelado.
- Dejar film sobre la bolsa que contiene la membrana, cuidando que no se moje, humedezca o mueva para mantener la calidad del revelado y cerrar el cassette de revelado.
- Determinar el tiempo de exposición, sacar film y sumergir en solución de revelado hasta observar la aparición de bandas.
- Una vez se logren observar las bandas, sumergir en solución de fijado y posteriormente en agua.
- Terminado el proceso de revelado, limpiar el cuarto y dejar films sobre recipiente plástico.
- Dejar secar films para después escanearlos.
- Manipular siempre los films por las orillas para evitar manchas por huellas digitales.
- En caso de reutilizar la membrana, esta se debe guardar en TBS-T a 4°C y al momento de usarla se debe incubar por 5 minutos en solución de Stripping para

retirar el anticuerpo primario anterior. Luego se debe lavar dos veces con TBS-T durante 5 minutos y repetir todos los pasos desde el bloqueo de la membrana.

K. Análisis de resultados con ImageJ

- Abrir la imagen de films escaneados y recortar el film que se quiera analizar.
- En caso de que se encuentre ladeada la imagen, rotarla hasta que quede derecha para facilitar la medición.
- Transformar la imagen a blanco y negro mediante los comandos Image > Type > 16-bit.
- Para seleccionar las bandas se deben usar los comandos Analize > Gels > select First Lane (Ctrl + 1) > Analize > Gels > Select Next Lane (Ctrl + 2) > Plot Lane (Ctrl + 3):

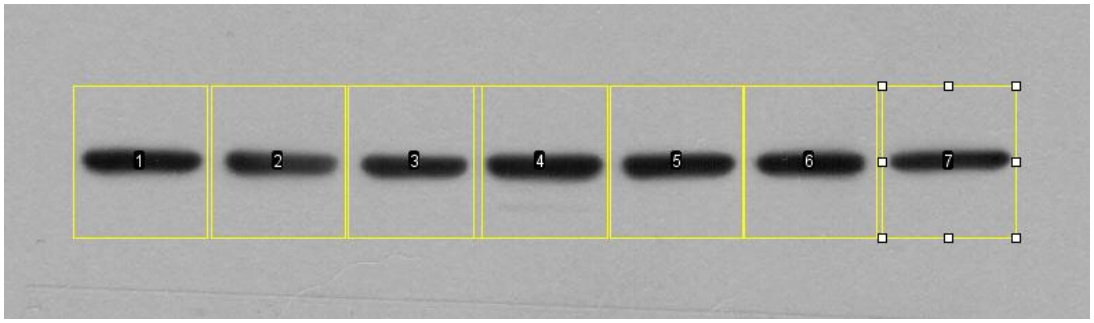


Figura 15: Ejemplo de cuantificación de bandas utilizando ImageJ.

- En plot lane se debe utilizar la línea recta para seleccionar la curva que representa la señal.
- Con la varita mágica seleccionar las curvas para obtener los resultados.
- Copiar en Excel los resultados de las señales de las bandas.
- Se debe hacer el mismo procedimiento con el revelado del control de carga.

- La relación se calcula como proteína de interés / control de carga, y se procede a graficar para el análisis de bandas.

9.2. Anexo 2: Abreviaturas

2-NBDG: 2-(N-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino)-2-deoxi-D-glucosa
ADP: Adenosín difosfato
AKT: Proteína quinasa B
AMP: Adenosín monofosfato
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
ATP: Adenosín trifosfato
BCAAs: Aminoácidos de cadena ramificada (Branched-Chain Amino Acids)
BSA: Albúmina de suero bovino
Ca^{2+}: Calcio
CO2: Dióxido de carbono
CoA: Coenzima-A
DAG: Diacilglicerol
DM: Diabetes Mellitus
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
FBS: Suero fetal bovino
FFA: Ácidos grasos libres (Free Fatty Acids)
GLUT: Transportadores de glucosa
HS: Suero de caballo
IL-6: Interleucina-6
IRS: Sustratos del receptor de insulina
kDa: Kilodalton
L: Litro
mA: Miliamperio

MC: Medio de crecimiento

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MD: Medio de diferenciación

NK-κB: Factor nuclear kappa B

nM: Nanomolar

p-AMPK: Proteína quinasa activada por AMP fosforilada

PDK1: Proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol 3-quinasa 1

PKC: Quinasa C

PBS: Buffer fosfato salino

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PIP3: Fosfatidilinositol trifosfato

RPM: Revoluciones por minuto

TBS: Tampón tris salino

TLC: Cromatografía en capa fina