



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estandarización y caracterización de un modelo celular de resistencia a la insulina

Paola Andrea Rivera Diaz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2019

Estandarización y caracterización de un modelo celular de resistencia a la insulina

Paola Andrea Rivera Diaz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Claudio Jaime Gómez Alegría, Ph.D.

Línea de Investigación:

Farmacología Molecular

Grupo de Investigación:

UNIMOL

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2019

*A mi papá, mi mamá y mi hermano por
su gran apoyo en todo este camino.*

Agradecimientos

A Dios por todas las oportunidades que ha puesto en mi camino.

A mi familia por su amor y apoyo infinito en este y todos los procesos de mi vida.

Al profesor Claudio Gómez por su instrucción y su paciencia, por ayudarme a no desistir.

A la profesora Doris Gómez por sus conocimientos y su apoyo permanente.

A la Universidad Nacional de Colombia, mi adorada *alma mater*, por su apoyo con la Beca Asistente Docente y su apoyo para el desarrollo de este proyecto de investigación (código Hermes: 39182).

A Colciencias por su apoyo con la beca de la Convocatoria 727 Doctorados Nacionales 2015.

A Alejandro Ondo de la Universidad del Rosario por toda su colaboración con la línea celular 3T3-L1.

A los profesores Fabio Aristizabal, Giovanny Garavito, Jaiver Rosas y Maria Constanza Lozano del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por su generosa colaboración para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del grupo de investigación UNIMOL.

A mis amigos, mi compañía en este camino doctoral.

A todas las muchas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

Muchas, muchas gracias a todos.

Resumen

La diabetes es una enfermedad metabólica de origen multifactorial que ha sido considerada la epidemia del siglo XXI. La mayor parte de los casos de diabetes corresponden a diabetes tipo 2, que se relacionan con obesidad y resistencia a la insulina, esta última entendida como una menor respuesta a la insulina por parte de las células y tejidos.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar y caracterizar a nivel molecular un modelo celular de resistencia a la insulina inducida farmacológicamente. Para ello se trabajó con células adiposas 3T3-L1, y se implementó un bioensayo colorimétrico para cuantificar el consumo de glucosa tanto basal como estimulado con insulina, el que sirvió de base para evaluar la resistencia inducida por diferentes fármacos.

De cinco fármacos evaluados, se observó resistencia a la insulina sólo en respuesta a glucocorticoides. El tratamiento con dexametasona 10 μM por 24 y 48 horas, o con prednisolona ≥ 10 μM por 48 horas, disminuyó significativamente el consumo de glucosa estimulado por insulina, indicando resistencia a la insulina. El tratamiento con indinavir, olanzapina o peróxido de hidrógeno (100 μM por 24 y 48 horas) no afectó la respuesta a insulina. Interesantemente, olanzapina aumentó significativamente el consumo basal de glucosa a 24 y 48 h.

La caracterización molecular de nuestro modelo se realizó a través de un análisis de proteómica cuantitativa tipo *label free*, el cual identificó 76 proteínas que se expresaron diferencialmente en las células con resistencia a insulina inducida por prednisolona (100 μM por 48 horas) comparadas con las células control. De éstas, 56 aumentaron y 20 disminuyeron su expresión entre 1.25 y 5 veces, lo que nos permitió identificar por primera vez un grupo de proteínas cuya expresión se relacionaría con resistencia a la insulina inducida por prednisolona. Estas proteínas fueron: ACADSB, ACOT9, ATP6V1A, CKAP4, CTTN, DCAKD, EIF4A3, ESYT2, FKBP5, GSN, NMT1, PHGDH, PNPLA2, RBM14,

SAMM50, SLC3A2, SRSF3, TUBA1A, SCD2, CAVIN1, ESYT1, LIPE, PKM, PLIN4, SPTBN1 y SUMO2.

En conclusión, se estandarizó y caracterizó a nivel proteómico un modelo celular de resistencia a la insulina inducida con prednisolona en adipocitos 3T3-L1. Este modelo debería ser útil en la identificación de nuevas dianas moleculares implicadas en la respuesta y en la resistencia a la insulina, en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2, y en la búsqueda de nuevos fármacos.

Palabras clave: Consumo de glucosa; Resistencia a la insulina; Células adiposas; Células 3T3-L1; Insulina; Glucocorticoides; Prednisolona; Dexametasona; Proteómica *label free*.

Abstract

Diabetes is a metabolic disease of multifactorial origin that has been considered the epidemic of the 21st century. Most cases of diabetes are type 2 diabetes, which are associated with obesity and insulin resistance, the latter understood as a lower response to insulin by cells and tissues.

The objective of this work was to standardize and characterize at the molecular level a cellular model of pharmacologically induced insulin resistance. To do this, we worked with 3T3-L1 adipose cells, and a colorimetric bioassay was implemented to quantify both basal and insulin-stimulated glucose consumption, which served as the basis for evaluating resistance induced by different drugs.

Out of five drugs evaluated, insulin resistance was observed only in response to glucocorticoids. Treatment with dexamethasone 10 μM for 24 and 48 hours, or with prednisolone ≥ 10 μM for 48 hours, significantly decreased the insulin-stimulated glucose consumption, indicating insulin resistance. Treatment with indinavir, olanzapine or hydrogen peroxide (100 μM for 24 and 48 hours) did not affect insulin response. Interestingly, olanzapine significantly increased baseline glucose consumption at 24 and 48 hours.

The molecular characterization of our model was performed through a label-free quantitative proteomic analysis, which identified 76 proteins that were expressed differentially in cells with prednisolone-induced insulin resistance (100 μM for 48 hours) compared to control cells. Of these, 56 increased and 20 decreased their expression between 1.25 and 5 times, which allowed us to identify for the first time a group of proteins whose expression would be related to prednisolone-induced insulin resistance. These proteins were: ACADSB, ACOT9, ATP6V1A, CKAP4, CTTN, DCAKD, EIF4A3, ESYT2, FKBP5, GSN, NMT1, PHGDH, PNPLA2, RBM14, SAMM50, SLC3A2, SRSF3, TUBA1A, SCD2, CAVIN1, ESYT1, LIPE, PKM, PLIN4, SPTBN1 y SUMO2.

In conclusion, a cellular model of prednisolone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes was standardized and characterized at the proteomic level. This model should be useful in identifying new molecular targets involved in insulin response and resistance, in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, and in the search for new drugs.

Keywords: Glucose uptake; Insulin; Insulin resistance; Adipose cells; 3T3-L1 cells; Insulin; Glucocorticoids, Prednisolone; Dexamethasone; Label free proteomics.

Contenido

Resumen	V
Abstract	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
1. Planteamiento del problema y justificación	1
2. Objetivos	4
3. Marco Teórico	5
3.1. Insulina.....	5
Efectos fisiológicos de la insulina.....	6
Receptor de insulina y vías de señalización	7
3.2. Diabetes.....	10
Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)	11
Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)	12
Tratamiento farmacológico de la diabetes	13
3.3. Resistencia a la insulina	15
Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina	17
Fármacos inductores de diabetes y resistencia a la insulina	18
3.4. Modelos de diabetes y de resistencia a la insulina.....	22
Modelos <i>in vivo</i>	22
Modelos <i>in vitro</i>	24
4. Materiales y Métodos	26
4.1. Materiales	26
4.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1.....	27
Cultivo de células 3T3-L1	27
Diferenciación de células 3T3-L1	27
4.3. Evaluación del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1	29
Bioensayo de consumo de glucosa.....	29
Optimización de las condiciones del bioensayo de consumo de glucosa.....	30

Determinación de los parámetros cinéticos del consumo de glucosa	30
Límite de detección (LOD).....	31
Límite de cuantificación (LOQ).....	31
4.4. Tratamientos farmacológicos	32
Evaluación de inductores de resistencia a la insulina	32
Evaluación del modelo frente a un sensibilizador a la insulina	32
4.5. Extracción de proteína total de adipocitos 3T3-L1 y análisis proteómico	33
4.6. Análisis estadísticos	34
5. Resultados	36
5.1. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1.....	36
5.2. Evaluación del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1	38
Parámetros analíticos del método de cuantificación de la glucosa extracelular. 38	
Bioensayo de glucosa	40
5.3. Efecto de diferentes fármacos sobre el consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1.....	47
Efecto de indinavir	47
Efecto de olanzapina	49
Efecto de peróxido de hidrógeno	50
Efecto de dexametasona.....	52
Efecto de prednisolona.....	54
5.4. Efecto de un sensibilizador a la insulina	57
5.5. Análisis proteómico.....	59
6. Discusión.....	69
Modelo de células adiposas 3T3-L1	69
Evaluación del consumo de glucosa de las células adiposas 3T3-L1.....	70
Efecto de fármacos inductores de resistencia a la insulina sobre el consumo de glucosa	75
Efecto del sensibilizador Rosiglitazona	78
Análisis proteómico	79
7. Conclusiones	87
8. Proyecciones	89
9. Bibliografía.....	90
10. Anexos	107
Anexo 1: Cuantificación de la proteína total de adipocitos 3T3-L1	107
Anexo 2: Espectro de masas para el péptido MGGGFGGK de la proteína XDH	108

Lista de figuras

Figura 1. Representación de las estructuras de la proinsulina e insulina	6
Figura 2. Representación esquemática del receptor de insulina	8
Figura 3. Vías de señalización de la insulina	9
Figura 4. Diferenciación de las células 3T3-L1	37
Figura 5. Tinción de lípidos con <i>Oil Red O</i>	37
Figura 6. Gotas lipídicas intracitoplasmáticas en células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 8 días	38
Figura 7. Curva de calibración para el ensayo de glucosa utilizado en el presente trabajo	39
Figura 8. Consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1 ...	41
Figura 9. Relación lineal entre el consumo de glucosa y el tiempo de incubación de las células adiposas 3T3-L1	44
Figura 10. Curva de saturación del proceso de consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1.....	45
Figura 11. Curva concentración-respuesta para insulina en las células adiposas 3T3-L1	46
Figura 12. Efecto de indinavir sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	48
Figura 13. Efecto de olanzapina sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	49
Figura 14. Efecto de peróxido de hidrógeno sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	51
Figura 15. Efecto de dexametasona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	53

Figura 16. Efecto de prednisolona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1.	55
Figura 17. Efecto de la concentración de prednisolona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	57
Figura 18. Efecto de rosiglitazona sobre el consumo de glucosa en células con insulino resistencia inducida por prednisolona	58
Figura 19. Análisis electroforético de la proteína total obtenida a partir de células adiposas 3T3-L1	59
Figura 20. Distribución de los valores de cambio (<i>fold change</i>) para proteínas cuya expresión aumenta en respuesta al tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con prednisolona 100 μ M por 48 h.....	62
Figura 21. Distribución de los valores de cambio (<i>fold change</i>) para proteínas cuya expresión disminuye en respuesta al tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con prednisolona 100 μ M por 48 h.....	64
Figura 22. Análisis de GO del componente celular de todas las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1	65
Figura 23. Análisis de GO de la función molecular de las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1	66
Figura 24. Análisis de GO del proceso biológico de las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1	67
Figura A1. Curva de calibración de absorbancia (562 nm) vs. concentración de BSA (μ g/mL) para la cuantificación de proteína total extraída de adipocitos 3T3-L1.....	107
Figura A2. Espectro de masas para el péptido MGGGFGGK de la proteína XDH de adipocitos 3T3-L1.....	108

Lista de tablas

Tabla 1. Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de la diabetes tipo 2 y de la resistencia a la insulina	25
Tabla 2. Efecto del tiempo sobre el consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1	42
Tabla 3. Velocidad del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1	45
Tabla 4. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1	45
Tabla 5. Efecto de indinavir (Ind) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina	48
Tabla 6. Efecto de olanzapina (Olz) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina	50
Tabla 7. Efecto de H ₂ O ₂ sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina.	52
Tabla 8. Efecto de dexametasona (Dex) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina	53
Tabla 9. Efecto de prednisolona (Pred) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina	55
Tabla 10. Proteínas con expresión aumentada en el estado de resistencia a la insulina inducida por prednisolona.....	60
Tabla 11. Expresión diferencial de proteínas (disminución) en el estado de insulino resistencia (tratamiento con prednisolona 100 µM durante 48 horas) en adipocitos 3T3-L1	63

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
2-DG	2-deoxiglucosa
2-NBDG	2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
6-NBDG	6-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACL	ATP citrato liasa
Akt/PKB	Proteína quinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	ARN mensajero
AS160	Sustrato de 160 kDa de Akt
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BMI	Índice de masa corporal
BSA	Albúmina de suero bovina
CNIs	Inhibidores de calcineurina
CTLA-4	Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidasa 4
EC ₅₀	Concentración efectiva 50
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
FBS	Suero fetal bovino

Abreviatura	Término
FFA	Ácidos grasos libre
GE	Glucosa extracelular
GI	Glucosa inicial
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar a glucagón 1
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GO	Ontología génica
GS	Glucógeno sintasa
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa-3
HbA1c	Hemoglobina A1c
HLA	Antígeno leucocitario humano
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
HSL	Lipasa sensible a hormonas
HTMC	Células de la malla trabecular humana
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
ICA	Anticuerpos de células de los islotes
IL2RA	Receptor de interleucina-2 cadena α
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas
IRS	Sustratos del receptor de insulina
K	Constante del proceso de consumo
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
nano-	nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tipo
LC/LTQ	trampa iónica lineal segmentada
NC3Rs	Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en la Investigación
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

Abreviatura	Término
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PBS	Buffer fosfato salino
PKD1	Quinasa dependiente de fosfoinositol 1
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC λ	Proteína quinasa C lamda
PPAR γ	Receptor activado por el proliferador del peroxisoma gamma
PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa 22
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SGLT2	Inhibidores de cotransportador sodio-glucosa tipo 2
TCA	Ácido tricarbóxico
TNB	5-tio-2-nitro-benzoato
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
UPCL-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
V _{máx}	Velocidad máxima

1. Planteamiento del problema y justificación

La diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperglicemia debido a la incapacidad del páncreas de producir insulina o a una menor sensibilidad de los tejidos frente a esta hormona, lo que desencadena alteraciones a nivel del metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2015 esta enfermedad afectó a más de 422 millones de personas en el mundo y fue la causa directa de aproximadamente 1.6 millones de muertes, siendo calificada como una epidemia mundial (1). La prevalencia de esta enfermedad en adultos mayores de 18 años ha venido en aumento, pasando del 4.7% en 1980 a un 8.5% en 2014, prevalencia que ha aumentado más significativamente en países de bajos y medianos ingresos. Se proyecta que para el año 2049 cerca de 629 millones de personas sufrirán esta enfermedad (1). En Colombia, la OMS reportó para el año 2016 una prevalencia de diabetes de un 7.6% en hombres y 8.5% en mujeres, y el 3% del total de muertes se debieron a esta enfermedad (1,2).

Del total de casos de diabetes en el mundo, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) corresponde a aproximadamente el 90% y en la actualidad representa un importante problema de salud pública (3). Una de sus características principales es la aparición de resistencia a la insulina, que se define como la pérdida de sensibilidad de los tejidos blanco (principalmente hígado, músculo y tejido adiposo) a las acciones de esta hormona y, clínicamente, hace necesarias mayores concentraciones de ella para mantener la homeostasis de la glucosa en los pacientes (4).

Entre los múltiples factores de riesgo, esta patología ha sido relacionada con obesidad, y se ha demostrado la importancia de los cambios en el estilo de vida (dieta, ejercicio, entre otros) para prevenir o retrasar la aparición de esta enfermedad (3,5). El desarrollo de resistencia a la insulina se da como respuesta a múltiples factores, incluyendo el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (6), calcio citosólico (7), ácidos grasos libres (FFA) (8), estrés

oxidativo (9,10), y la exposición a medicamentos, entre los cuales destacan los glucocorticoides (11–13).

Diferentes modelos experimentales han sido utilizados para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la diabetes y de la resistencia a la insulina, y también para evaluar nuevas moléculas con potencial antidiabético; estos modelos pueden clasificarse en modelos animales (*in vivo*) y celulares (*in vitro*) (14–16). Dentro de los modelos celulares se han empleado diferentes líneas de células adiposas y musculares, en las cuales se evalúa el consumo de glucosa a través de bioensayos basados principalmente en la utilización de glucosa radiomarcada o, más recientemente, análogos fluorescentes (17–19). Sin embargo, el uso de tales bioensayos requiere de equipos costosos, además de instalaciones aisladas exclusivas para el trabajo con radioisótopos, lo que sube el costo y complejidad del bioensayo, y esto sin considerar el entrenamiento apropiado que debe recibir el operador para minimizar el riesgo (20,21).

Frente a las anteriores limitaciones, nuestro grupo de investigación se planteó la posibilidad de aplicar o desarrollar un bioensayo colorimétrico para cuantificar consumo de glucosa en modelos celulares y que sirva de base para el desarrollo de modelos de resistencia a la insulina. En este sentido, aprovechando nuestra experiencia con el modelo de células adiposas 3T3-L1 (22–24) logramos aplicar exitosamente, aunque de manera preliminar, un ensayo colorimétrico sencillo y de bajo costo para cuantificar glucosa extracelular y consumo de glucosa en cultivos de adipocitos 3T3-L1 (25). Estos resultados preliminares abren la puerta a la posibilidad de seguir trabajando con este bioensayo, lo que nos podría permitir descubrir o estudiar nuevas dianas y moléculas de interés farmacológico.

Con base en lo anterior nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuáles son las condiciones óptimas del bioensayo para cuantificar consumo de glucosa en nuestro modelo celular?

¿Cómo se comporta el bioensayo en modelos celulares sensibles y resistentes a la insulina?

¿De qué manera el modelo de resistencia a la insulina evaluado con nuestro bioensayo podría ser útil para profundizar en los mecanismos moleculares de la respuesta a insulina?

Hipótesis de trabajo:

El bioensayo colorimétrico de consumo de glucosa permitiría evaluar los efectos de sensibilidad y de resistencia a la insulina en el modelo planteado, y conducir a la caracterización molecular de los efectos observados.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Estandarizar y caracterizar un modelo celular de resistencia a la insulina.

2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar las condiciones de un bioensayo para medir consumo de glucosa en células adiposas.
2. Establecer las condiciones de inducción de resistencia a la insulina en células adiposas.
3. Evaluar la respuesta del modelo celular frente a un sensibilizador a la insulina.
4. Caracterizar el perfil proteico del modelo celular estandarizado.

3. Marco Teórico

3.1. Insulina

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos formada por dos cadenas, una cadena A de 21 aminoácidos y una cadena B de 30 aminoácidos, que se encuentran unidas de manera covalente por dos puentes disulfuro intercatenarios que conectan los residuos de cisteína A7-B7 y A20-B19; existe también un enlace disulfuro intracatenario en la cadena A entre las cisteínas 6 y 11 (26,27). La hormona se sintetiza en el páncreas a partir de un precursor común denominado preproinsulina que es proteolizado para generar la hormona madura (Figura 1). Entre las insulinas de distintas especies, se presentan pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos, sin que se altere significativamente su actividad biológica (28,29).

La insulina es secretada por las células β pancreáticas y su liberación se da como respuesta a múltiples factores, dentro de los cuales destaca un aumento en la concentración plasmática de glucosa. Una vez sintetizado el precursor inicial (preproinsulina) este es transportado al aparato de Golgi donde se escinde mediante proteólisis a proinsulina y finalmente a insulina. La insulina es almacenada en forma de polímeros y/o complejos con zinc en gránulos de secreción y la exocitosis es el paso final del proceso gatillado por el aumento de la glucosa plasmática (26,30). La secreción de insulina es un proceso continuo, incluso durante el ayuno, y su liberación posterior a la ingesta de alimentos se produce como una respuesta bifásica. En la primera fase se produce un pico de liberación de la hormona almacenada en los gránulos de secreción, mientras que la segunda fase es de mayor duración y corresponde a la síntesis *de novo* de insulina (26,31).

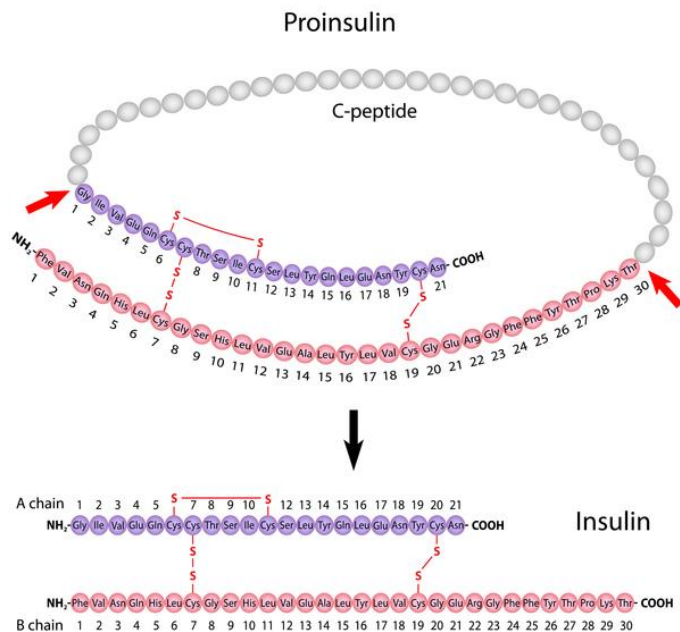


Figura 1. Representación de las estructuras de la proinsulina e insulina. En este el precursor semiprocésado se destaca en color morado el péptido A y en color rojo el péptido B de la insulina. Tomado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/insulin-proinsulin-147789428>

Efectos fisiológicos de la insulina

La insulina es una hormona anabólica y sus efectos se pueden resumir de acuerdo con el metabolismo de los principales sustratos energéticos (32,33):

Metabolismo de carbohidratos

- Aumento del transporte de glucosa a las células y de la glicólisis en tejido adiposo y muscular.
- Estimulación de la síntesis de glicógeno y disminución de la degradación de glicógeno en tejido muscular y hepático.
- Inhibición de la glicogenólisis y de la gluconeogénesis en tejido hepático.

Metabolismo de lípidos

- Disminución de la lipólisis en tejido adiposo y de la oxidación de ácidos grasos en tejido muscular y hepático.
- Aumento de la captura y síntesis de triglicéridos, y de la síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo y muscular.

- Aumento de la síntesis de triglicéridos y de la formación de lipoproteínas de muy baja densidad en tejido hepático.

Metabolismo de proteínas

- Aumento del transporte de aminoácidos y síntesis de proteínas en tejido muscular, adiposo, hepático, y otros tejidos.
- Disminución de la degradación de proteínas en tejido muscular.
- Disminución de la formación de urea.

El principal y más conocido efecto de la insulina está relacionado con la disminución de la concentración de glucosa a nivel plasmático que resulta de lo recientemente dicho en cuanto a que estimula el transporte y almacenaje de esta hexosa a nivel del tejido adiposo y muscular, y este consumo de glucosa es un paso crucial para el metabolismo celular.

Receptor de insulina y vías de señalización

Las acciones de la insulina se producen como consecuencia de la activación del receptor de insulina, un receptor con actividad tirosina kinasa que se expresa ampliamente en diversas células animales pero principalmente en los tejidos sensibles como son el tejido adiposo, muscular y hepático (31).

El receptor de insulina es una proteína transmembrana con estructura cuaternaria heterotetramérica compuesta de dos subunidades α y dos subunidades β ($\alpha_2\beta_2$) (Figura 2); las subunidades α constituyen la mayor parte del ectodominio del receptor y contienen el dominio de unión al ligando, mientras que las subunidades β comprenden parte del ectodominio, además del dominio transmembrana y de un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa intrínseca. La unión de la insulina a las subunidades α del receptor gatilla la actividad tirosina kinasa de las subunidades β produciendo autofosforilación del receptor por un mecanismo de transfosforilación, es decir, fosforilación de residuos de tirosina por parte la subunidad opuesta (34–36).

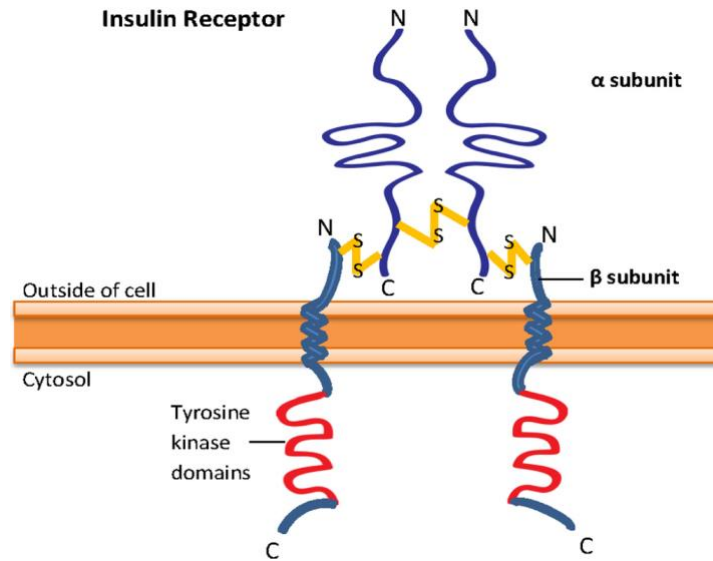


Figura 2. Representación esquemática del receptor de insulina. Tomado de Mangmool y colaboradores, 2017 (34).

La activación del receptor de insulina resulta en la posterior activación de dos principales vías de señalización: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt, relacionada principalmente con los efectos metabólicos y la vía de Ras/proteína quinasa activadas por mitógenos (MAPK), la cual regula tanto la expresión génica como los efectos mitogénicos asociados a la insulina. En la figura 3 se muestra una representación esquemática de las principales vías de señalización de la insulina.

Vía PI3K/Akt

La enzima PI3K juega un papel fundamental en las acciones metabólicas de la insulina; de hecho, inhibidores de la PI3K bloquean gran parte de las acciones metabólicas de la hormona, entre ellas, la estimulación del transporte de glucosa (37,38).

Los residuos de tirosina que se fosforilan en las subunidades β del receptor en respuesta a la activación por insulina, son reconocidos por una familia de proteínas conocida como sustratos del receptor de insulina (IRS), principalmente IRS-1 e IRS-2, los cuales interactúan con la subunidad reguladora de PI3K (p85) produciendo su activación. PI3K cataliza la fosforilación de fosfolípidos de membrana y del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en la posición 3 para producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP₃), que regula diferentes clases de moléculas de señalización, entre ellas la familia de proteínas quinasa serina/treonina AGC a la cual pertenece la quinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK1)

que fosforila y activa a Akt (también conocida como PKB) y a la proteína quinasa C λ y ζ , (PKC λ/ζ), ambas del tipo serina/treonina quinasas. Akt/PKB ha sido sugerida como importante en la señalización de insulina porque fosforila e inhibe la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), factores de transcripción *forkhead* y proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP. La activación de PI3K y Akt/PKB mediada por insulina estimula la síntesis de glucógeno por activación de la glicógeno sintasa (GS).

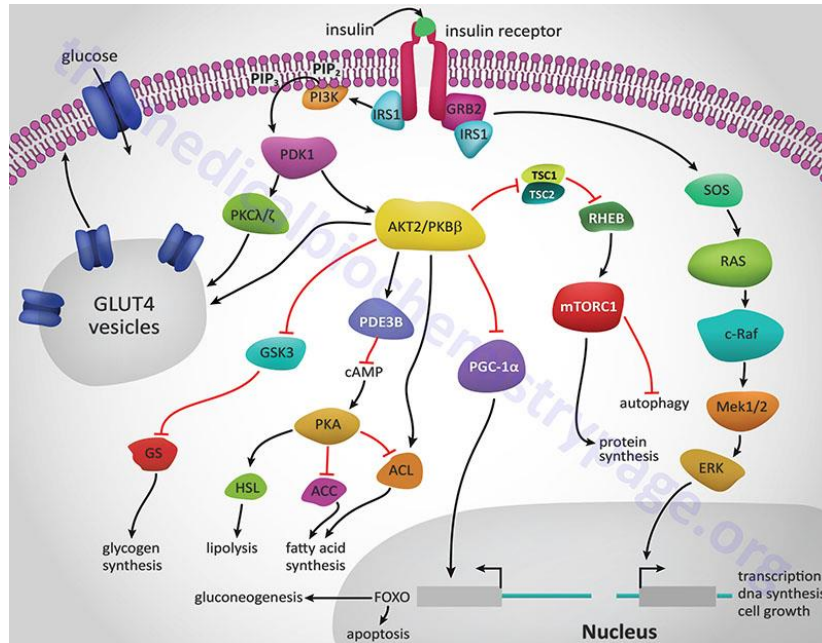


Figura 3. Vías de señalización de la insulina. Tomado de King, 2014 (39).

Por otra parte, la proteína quinasa A (PKA) posee importantes efectos a nivel de la homeostasis de lípidos: media la fosforilación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) produciendo mayor liberación de ácidos grasos libres (FFA) a partir de triglicéridos, además de fosforilar e inhibir la actividad de la ATP citrato liasa (ACL) y la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos. Finalmente, la activación de Akt/PKB estimula también la traslocación de GLUT4, un transportador de glucosa sensible a insulina, desde vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática, permitiendo el ingreso de glucosa a las células; la activación de PKC λ/ζ está también involucrada en la regulación de este proceso (37,39–41).

Así, la regulación de las acciones de la insulina son controladas por el balance entre fosforilación y desfosforilación y la ruta de la PI3K es un componente clave en toda la

cascada de señalización gatillada por esta hormona y necesaria para sus efectos metabólicos, específicamente el transporte de glucosa resultado de la traslocación de GLUT4 (38,40).

Vía Ras/MAPK

La vía de la Ras/MAPK regula numerosos procesos celulares y fisiológicos dentro de los que se encuentra la expresión génica y la concentración de glucosa en sangre así como también el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (42,43).

La unión de la insulina a su receptor y la posterior fosforilación de los residuos de tirosina de éste resulta en la fosforilación de los IRS y en la unión de proteínas adaptadoras, en este caso proteínas con dominio SH2 como GRB2, reclutando la proteína de intercambio *Son of sevenless* (SOS) a la membrana plasmática de las células para la activación de Ras. Ras ha sido descrita como un *switch* molecular ya que una vez activada estimula una cascada de serina/treonina quinasas que resulta en la fosforilación y consecuente activación de Raf, MAP quinasas 1 y 2 (también conocidas como MEK1 y 2) y posteriormente de las MAPK ERK1 y 2. Las ERKs se traslocan al núcleo donde catalizan la fosforilación de varios factores de transcripción lo que lleva a la proliferación y diferenciación celular. El bloqueo de esta vía de señalización, por ejemplo con inhibidores farmacológicos, inhibe o bloquea el crecimiento celular inducido por insulina, pero no afecta las acciones metabólicas asociadas a esta hormona (37,42,43).

3.2. Diabetes

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la diabetes es una patología metabólica crónica caracterizada por un estado de hiperglicemia y que se presenta como consecuencia de la incapacidad del páncreas para producir insulina o de una menor sensibilidad de los tejidos a las acciones de esta hormona (2,44).

La diabetes se diagnostica teniendo en cuenta algunos criterios descritos por la OMS y se considera que un paciente es diabético si cumple alguno de los siguientes criterios (1):

- Glucosa plasmática en ayunas $\geq 7,0$ mmol/L (126 mg/dL).

- Glucosa plasmática postprandial ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL) tomada a las 2 horas después de ingerir una carga oral de 75 g de glucosa.
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) ≥ 6.5 %.

La diabetes se clasifica en diferentes tipos, siendo los dos principales la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)

También llamada diabetes insulino-dependiente, corresponde a aproximadamente el 5% de los casos de diabetes en el mundo. Los pacientes con DMT1 son fundamentalmente menores de 30 o 35 años y se les debe administrar insulina exógena. Este tipo de diabetes es producto de una deficiencia de insulina debida a la destrucción de las células β pancreáticas que la sintetizan, usualmente por mecanismos inflamatorios autoinmunes que involucran, entre otras, células T CD4+ y CD8+ activadas y macrófagos infiltrando los islotes pancreáticos. Todo esto se manifiesta clínicamente con síntomas y signos relacionados con hiperglicemia. Adicionalmente se ha detectado la presencia de anticuerpos de células de los islotes (ICA) en suero de pacientes con DMT1 y también se encontró una asociación fuerte entre esta patología y el antígeno leucocitario humano (HLA) (3,45,46).

Algunos pacientes padecen otra forma menos común de DMT1 altamente heredable y que no involucra mecanismos autoinmunes, conocida como diabetes idiopática, la cual se presenta más en poblaciones asiáticas y africanas. Este tipo de pacientes carece de producción de insulina y tienen tendencia a presentar cetoacidosis en ausencia de los anticuerpos mencionados anteriormente (3,46).

Entre los principales factores que contribuyen al desarrollo de DMT1 se encuentran:

Genéticos

El riesgo de padecer DMT1 si ninguno de los padres la padece es de 1 en 250, entre hermanos es del 6-7%, si la madre o el padre lo padecen este riesgo está entre 2-4% y 6-9%, respectivamente; mientras que si los dos lo padecen, el riesgo se eleva hasta el 30%. Además, como se mencionó antes, existe una asociación fuerte entre DMT1 y HLA, sin embargo, se han reportado al menos 47 factores genéticos no relacionados con HLA que podrían contribuir al desarrollo de la patología, entre ellos la proteína tirosina fosfatasa 22

(PTPN22), el receptor de interleucina-2 cadena α (IL2RA) también llamado CD25 y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) (46–48).

Ambientales

Estudios en personas originarias de países de baja incidencia que migran a regiones de mayor incidencia muestran que adoptan el riesgo de su nuevo país durante una sola generación. También se ha sugerido una potencial contribución de las infecciones virales en la niñez sobre el desarrollo de DMT1, específicamente virus asociados con inflamación de los islotes como enterovirus (46). Otros factores ambientales descritos han sido la deficiencia de vitamina D y exposición a sustancias tóxicas como estreptozotocina o aloxano (46,48).

Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

La DMT2 es un desorden metabólico complejo asociado con resistencia del organismo a la acción de la insulina y que en etapas avanzadas puede presentar alteraciones en la secreción de la insulina producto de la disfunción de las células β . Este tipo de diabetes comprende entre el 90 y 95% de los casos de diabetes en el mundo y ha sido descrito por la OMS como un importante problema de salud pública. Los pacientes que padecen DMT2 generalmente son obesos y suelen desarrollar la enfermedad en la edad adulta (1,3,5).

El desarrollo de la DMT2 se ha asociado con diversos factores de riesgo que se pueden clasificar en dos categorías: 1. Modificables, como obesidad, niveles de colesterol y hábitos de estilo de vida (dieta y actividad física) y 2. No modificables, como antecedentes de hiperglicemia, prediabetes y/o diabetes gestacional, genética, raza/étnia y edad. Aunque los factores relacionados con antecedentes familiares son importantes para el desarrollo de la patología, el estilo de vida y por ende la dieta y actividad física, son componentes de mayor contribución para la prevención de la DMT2 (45,49).

La DMT2 inicia con una larga fase asintomática que puede durar varios años, la cual es probablemente la causa de gran parte de las complicaciones relacionadas con esta enfermedad; es por ello que el diagnóstico temprano, el cual está dirigido a pacientes mayores de 45 años con índice de masa corporal (BMI) >25 Kg/m² con algunos otros factores de riesgo (grupo étnico, antecedentes familiares, hipertensión, etc), es una importante herramienta para retrasar la aparición de dichas complicaciones y mejorar la

calidad de vida de los pacientes. Contrario a lo que se observa en la DMT1, en la DMT2 se presenta un aumento en la concentración plasmática de insulina (hiperinsulinemia) como resultado de la respuesta de las células β pancreáticas a la disminución en la sensibilidad a insulina, y cuando la DMT2 avanza estas células fallan y resultan incapaces de producir cantidades suficientes de la hormona (26,30,31).

Tratamiento farmacológico de la diabetes

El tratamiento farmacológico de la diabetes se basa en 3 objetivos principales (1,26): (i) Mejorar la utilización de glucosa y demás nutrientes a nivel celular; (ii) Controlar los niveles de glicemia y (iii) Prevenir, como consecuencia de las anteriores, las graves complicaciones asociadas tales como ceguera, falla renal, amputaciones, y otras. Sin embargo, esta patología requiere un abordaje múltiple que incluye además del tratamiento farmacológico, una dieta ajustada a las necesidades de cada paciente y la realización de actividad física regular (1,26).

Los agentes farmacológicos comunmente empleados para el tratamiento de la diabetes se detallan a continuación:

Insulina

La administración de insulina es el tratamiento principal en pacientes con DMT1, donde su deficiencia es el eje de la patología. En el caso de la DMT2 con insuficiencia de insulina el tratamiento con esta hormona exógena es complementario al uso de agentes hipoglicemiantes orales. La insulina se obtiene por tecnología de ADN recombinante y su administración se realiza principalmente por vía subcutánea (26,31,45).

Existe también una variedad de agentes análogos a la insulina y sus formulaciones presentan ventajas específicas en comparación con la insulina humana; estos análogos suelen clasificarse de acuerdo a la duración de su acción en análogos de acción corta (aspart, glulisina, lispro), los cuales presentan una absorción más rápida que la insulina regular, y análogos de acción lenta (degludec, glargina, detemir y NPH), cuya absorción es prolongada en el tiempo (50,51).

Metformina

La metformina, un fármaco del grupo de las biguanidas, es el agente de primera elección para el tratamiento de la DMT2, ya sea solo o en terapias de combinación con sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) o inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2). Dentro de sus efectos se encuentra el aumento de la sensibilidad a la insulina y del consumo de glucosa, así como la disminución de la gluconeogénesis hepática; además, puede favorecer la pérdida de peso y la reducción considerable de triglicéridos y colesterol LDL en sangre. Una de las ventajas de la metformina es que es un antihiperlipémico, reduciendo la hiperlipemia sin producir hipoglucemia (45,52,53) .

Sulfonilureas

Las sulfonilureas son secretagogos de insulina, estos favorecen la liberación de la insulina ya sintetizada en las células β pancreáticas y por ende la disminución de la glucosa plasmática. Los primeros agentes de este tipo utilizados fueron tolbutamida y clorpropamida, sin embargo éstos ya fueron reemplazados por las sulfonamidas de segunda generación, las cuales son más potentes sin aumentar su efecto hipoglucémico, estas últimas incluyen glibenclamida, glipizida, glimepirida y gliclazida, siendo esta última muy utilizada. Dentro de sus reacciones adversas se encuentran el riesgo de hipoglucemia que en algunos casos pueden resultar severos o incluso mortales, y también falla de las células β debido a la ausencia de efectos protectores a largo plazo sobre éstas (28,45,52).

Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas también conocidas como glitazonas son un grupo de fármacos que estimulan el receptor activado por el proliferador del peroxisoma γ (PPAR- γ), un receptor nuclear que regula la transcripción de diversos genes involucrados en el metabolismo de glucosa y lípidos, favoreciendo así la sensibilidad a la insulina en tejido muscular, hepático y adiposo, y reduciendo la síntesis de glucosa hepática. El efecto de estos fármacos sobre el control de la glicemia es lento, alcanzando su máximo solo hasta después de 1 ó 2 meses de tratamiento. En la actualidad en nuestro país se comercializa pioglitazona, las anteriores glitazonas fueron retiradas del mercado debido al riesgo de toxicidad hepática asociado. Dentro de sus efectos adversos se encuentra el incremento del peso (28,45,53).

Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4)

Este grupo de agentes, también llamados gliptinas, inhiben la enzima DPP4 y por ende retrasan la degradación enzimática de las incretinas péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) y polipéptido inhibidor gástrico (GIP), implicadas en la regulación de la homeostasis de la glucosa. GLP-1 y GIP estimulan la síntesis de insulina en las células β pancreáticas y GIP además disminuye la secreción de glucagón de las células α pancreáticas en una forma dependiente de la concentración de glucosa. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina y alogliptina, los cuales presentan bajo riesgo de hipoglicemia y no afectan el peso de los pacientes. Algunos de estos inhibidores han sido aprobados para el uso como monoterapia en pacientes contraindicados o con poca tolerancia a metformina (45,52,53).

Inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)

Los inhibidores de SGLT2, también conocidos como gliflozinas, suprimen el transporte de sodio e incrementan la eliminación de glucosa a través de los riñones gracias a que disminuyen la reabsorción renal de ésta produciendo glucosuria (altos niveles de glucosa en orina) y reduciendo así su concentración en plasma. Este grupo de agentes pueden ser administrados en cualquier etapa de la diabetes ya que sus efectos son independientes de la insulina; dentro de los más comúnmente utilizados se encuentran canagliflozina, dapagliflozina y empagliflozina. Dentro de sus ventajas se encuentra que disminuyen los niveles de HbA1c, disminuyen el peso y la presión arterial y no presentan riesgo de hipoglicemia si se combinan con metformina; sin embargo han sido asociados con infecciones urinarias y genitales, estas últimas principalmente en mujeres (45,52,53).

3.3. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de esta hormona para producir sus efectos fisiológicos a las concentraciones efectivas en individuos sanos. Esta condición implica clínicamente la necesidad de mayores concentraciones de la hormona para mantener el estado de normoglicemia; a nivel celular implica alteraciones en las vías de señalización de la insulina desde su receptor hasta los efectores finales implicados en sus efectos metabólicos y mitogénicos (4,46)

Existe una asociación ampliamente descrita entre los lípidos y la resistencia a la insulina, observándose que los ácidos grasos libres (FFA) y las citoquinas del tejido adiposo (adipoquinas) contribuyen al desarrollo de esta condición (54,55). En cuanto a estas últimas se tiene lo siguiente:

(i) El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria que se ha visto aumentado en roedores y humanos obesos sugiriendo una contribución al desarrollo de resistencia a la insulina. En humanos, la expresión de este factor en tejido adiposo ha sido correlacionada con el índice de masa corporal (BMI), porcentaje de grasa corporal e hiperinsulinemia. A nivel molecular, se ha reportado que TNF- α estimula la fosforilación de IRS en residuos de serina alterando el patrón de fosforilación normal en respuesta a insulina que es en residuos de tirosina, lo que interfiere finalmente con la vía de señalización (56,57).

(ii) La adiponectina es considerada una adipoquina positiva para el metabolismo, y sus concentraciones en plasma están inversamente correlacionadas con el peso, obesidad central, riesgo de DM2 y resistencia a la insulina en humanos. Estudios funcionales sugieren una potencial relación con la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético; además se ha observado que el tratamiento con adiponectina resulta en un aumento en la oxidación de ácidos grasos en células C2C12, una estimulación de la traslocación de GLUT4 respecto al control y un aumento del consumo de glucosa en miotubos L6 (56,58).

(iii) La resistina es una adipoquina identificada inicialmente en roedores y que induce la secreción de TNF- α e interleuquina 6 (IL-6) en varios tipos de células; se ha demostrado no solo una expresión aumentada de resistina en animales obesos sino también una relación con la inducción de resistencia a la insulina. A nivel molecular, se ha observado que la resistina reduce la fosforilación de Akt/PKB y el consumo de glucosa en células C2C12 y miotubos L6. La función de resistina en humanos no es totalmente clara (57,58).

(iv) Leptina, una adipokina proinflamatoria, en la línea celular muscular L6 disminuye la fosforilación de IRS-1 e inhibe el consumo de glucosa estimulado por insulina sugiriendo un efecto sobre el desarrollo de resistencia a la insulina; sin embargo, en miotubos C2C12 se encontró que favorece el consumo de glucosa. Además, la concentración plasmática de leptina y los niveles de expresión del ARNm en adipocitos están directamente relacionados

con obesidad. Se ha reportado que esta adipoquina controla la producción de TNF- α y que este último junto con IL-6 estimulan la producción de leptina en adipocitos (58,59) .

Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina

Las alteraciones en las acciones de la insulina involucran defectos moleculares tanto a nivel de su receptor como de los sustratos corriente abajo en la vía de señalización, y se han descrito múltiples mecanismos que estarían contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina.

A nivel del receptor de insulina se han identificado más de 60 mutaciones, algunas de las cuales afectan la unión de la hormona al receptor, y otras se relacionan con el aumento de su degradación y la disminución de su actividad catalítica tirosina quinasa. Además, se ha observado que el receptor de insulina es desfosforilado e inactivado por proteínas tirosina fosfatasas (PTP), una familia de proteínas que producen efectos negativos sobre el metabolismo de glucosa y los efectos fisiológicos de la insulina (54).

A nivel post-receptor se ha descrito un incremento de la fosforilación en residuos de serina/treonina en IRS-1, que sería seguido por un aumento de la degradación proteosomal del mismo; se ha reportado también una disminución de los niveles de proteína de IRS-1 en humanos, animales y cultivos celulares que exhiben resistencia a la insulina. Además, se ha observado que la adipoquina TNF- α está relacionada con la disminución en la expresión de GLUT4 y que la actividad de Akt/PKB se ve reducida como consecuencia de la hiperglicemia, aunque la actividad de otros sustratos de la vía de señalización se ha visto aumentada (receptor de insulina, IRS-1, IRS-2 y PI3K). También se han descrito mutaciones en el dominio quinasa de Akt/PKB en humanos resistentes a la insulina, dichas mutaciones estarían interfiriendo con la fosforilación de sustratos corriente abajo en la vía de señalización. Con respecto a los FFA se ha reportado que incrementan la fosforilación en residuos de serina de IRS-1 en ratas, y disminuyen la actividad de IRS-1, IRS-2 y PI3K en el músculo esquelético de estos animales; en ratones transgénicos incrementan la actividad de la proteína Munc18c, regulador negativo de la traslocación de GLUT4 (4,54).

Por otro lado, existen varios ejemplos de resistencia a la insulina inducida por fármacos o sustancias exógenas, algunos de los cuales se indican a continuación.

Fármacos inductores de diabetes y resistencia a la insulina

Una variedad de fármacos, muchos de los cuales son administrados por largos periodos de tiempo, alteran la homeostasis de la glucosa llevando a estados de hiperglicemia, diabetes y/o resistencia a la insulina. Los distintos fármacos alteran este equilibrio homeostático actuando a distintos niveles: afectando la secreción de insulina o alterando la sensibilidad a esta hormona (60).

Inhibidores de calcineurina (CNIs)

La calcineurina es una proteína fosfatasa que activa las células T del sistema inmune. Los inhibidores de esta enzima (CNIs) como ciclosporina, tacrolimus y sirolimus son utilizados como inmunosupresores en terapias farmacológicas post-trasplante. Un estudio sobre más de 11000 pacientes a los cuales se les realizó trasplante renal en Estados Unidos entre 1996 y 2000 y que posteriormente fueron sometidos a una terapia inmunosupresora que incluía CNIs, entre otros agentes, mostró una incidencia de diabetes de 9.1, 16 y 24% a 3, 12 y 36 meses post-trasplante, respectivamente (61). En el caso particular de la administración de tacrolimus, los pacientes presentaron una incidencia de diabetes de 13.5, 22.1 y 31.8% después de 3, 12 y 36 meses, respectivamente (61). Otros estudios plantean que tacrolimus reduce la secreción de insulina sin cambios en la sensibilidad del organismo a esta hormona (62).

Diuréticos tiazídicos o tipo tiazida

Los diuréticos tiazídicos son unos de los antihipertensivos más comunmente usados, sin embargo sus efectos sobre la alteración de la homeostasis de la glucosa, específicamente aumento en la glucosa plasmática, incluso a dosis bajas, han sido reportados por más de 50 años (62). El mecanismo exacto por el cual se desencadenan estos efectos no ha sido completamente elucidado, sin embargo ha sido atribuído a una disminución de los niveles de calcio en el organismo (hipocalcemia) relacionada con una reducción en la secreción de insulina, efectos negativos sobre el metabolismo de lípidos (incremento de FFA) y activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona por regulación negativa del receptor activado por el proliferador del peroxisoma γ (PPAR- γ). Un estudio realizado en 1000 individuos en Taiwan reportó un riesgo de desarrollar diabetes del 10% en pacientes sometidos a tratamiento con estos agentes (62–64).

β-bloqueadores

Estos agentes empleados principalmente para tratar afecciones cardiovasculares han presentado dentro de sus efectos adversos alteraciones del metabolismo de la glucosa; diversos estudios reportan riesgo de desarrollo de diabetes especialmente cuando se utilizan en combinación con otros agentes antihipertensivos como los diuréticos tiazídicos o tipo tiazida. Se ha reportado que en pacientes con diabetes, el uso de β-bloqueadores como propranolol, metoprolol y atenolol puede resultar en un incremento de los niveles de glucosa en sangre. El mecanismo implicado en estos casos ha sido descrito como alteraciones en la secreción de la hormona vía efectos en los receptores β adrenérgicos pancreáticos, aunque se ha reportado que también pueden disminuir la sensibilidad a la insulina. Un ensayo clínico para evaluar los efectos a largo plazo de las terapias basadas en diuréticos para el tratamiento de la hipertensión determinó que los pacientes que reciben atenolol (β-bloqueador) en combinación con clortalidona (diurético) fueron más propensos a desarrollar diabetes (16.4%) versus aquellos que recibieron solamente el diurético tiazídico (11.8%) (62,65,66).

Estatinas

Las estatinas son unos de los fármacos con efectos más potentes sobre la reducción del colesterol y son utilizadas para la prevención de enfermedad cardiovascular; sin embargo, también han sido asociadas con el desarrollo de diabetes y se cree que el riesgo está asociado con la dosis y tiempo de duración del tratamiento, además de otros factores relacionados con obesidad. Varios mecanismos han sido descritos para relacionar estos agentes con el desarrollo de diabetes, entre ellos: disfunción de las células β y por ende en la secreción de insulina, reducción en el consumo de glucosa vía alteraciones en la expresión y traslocación de GLUT4 y finalmente, disminución de los niveles de adiponectina inducida por esta estatina. Un meta-análisis publicado en el año 2013 mostró que entre diferentes estatinas, pravastatina presentó el menor riesgo de desarrollo de diabetes, seguido por atorvastatina; mientras que rosuvastatina se asoció con un incremento del 25% del riesgo comparado con el placebo (62,67,68).

Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son agentes farmacológicos fundamentales en la terapia antiretroviral de pacientes VIH positivos, aunque también han sido asociados con

complicaciones metabólicas que incluyen lipodistrofia, hiperlipidemia, hiperglicemia y resistencia a la insulina. Antiretrovirales específicos pueden incrementar la resistencia a la insulina principalmente por dos mecanismos: interfiriendo con la señalización celular de la insulina o como consecuencia de alteraciones en el metabolismo de lípidos. La exposición de los pacientes a inhibidores de proteasa de primera generación, entre los que se encuentran indinavir y ritonavir, se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina en voluntarios sanos aún durante tratamientos cortos o dosis únicas altas (63,67,69).

Se ha reportado que los transportadores de glucosa, principalmente GLUT4, son blanco de los inhibidores de proteasas y estarían asociados con la disminución de la sensibilidad a la insulina (70). A concentraciones terapéuticas, en adipocitos 3T3-L1 no se observó selectividad de ritonavir sobre GLUT1 o GLUT4, sin embargo, se encontró que indinavir actúa como un inhibidor competitivo del sitio de unión de la glucosa en GLUT4 (70). Se ha reportado que estos fármacos también bloquean el transporte de glucosa en cultivos primarios de adipocitos así como también en adipocitos 3T-L1 (70,71). Si bien la inhibición de este transporte corresponde a un mecanismo primario para la inducción de resistencia a la insulina a corto plazo, la administración de estos agentes por tiempos mayores puede alterar la señalización de la insulina. En el caso de adipocitos 3T3-L1 tratados con nelfinavir por 18 horas, se observan alteraciones en la activación de Akt/PKB (70,71) .

Antipsicóticos de segunda generación

El uso de este grupo de agentes farmacológicos también conocidos como antipsicóticos atípicos, se asocia con efectos metabólicos negativos como aumento de peso y desarrollo de hiperglicemia o diabetes; se ha reportado que la incidencia de diabetes es 10% mayor en pacientes esquizofrénicos tratados con estos fármacos. Estas complicaciones son comunmente asociadas con aumento de peso y obesidad y se ha observado que clozapina y olanzapina son especialmente diabetogénicas (62,63).

En estudios realizados en cultivos de adipocitos 3T3-L1 se observó que clozapina y olanzapina en concentraciones de 5 mM, disminuyeron significativamente el transporte de glucosa estimulado por insulina en aproximadamente 40%; olanzapina también incrementó la tasa de oxidación de glucosa basal y estimulada por insulina y la lipogénesis. El mecanismo por el cuál los antipsicóticos atípicos inducen diabetes y resistencia a la insulina no es conocido en su totalidad; sin embargo existen ciertas hipótesis que

involucran antagonismo de los receptores 5-HT (receptores de serotonina), principalmente 5-HT_{2a/c}, los cuales estarían implicados en una disminución de la secreción de insulina y alteraciones en los niveles de adipoquinas, específicamente disminución de adiponectina. Finalmente, se han reportado un aumento de la fosforilación en serina de IRS-1 e IRS-2, además de alteraciones en la fosforilación de PI3K y Akt/PKB, sugiriendo así un importante papel de esta vía de señalización en la inducción de resistencia a la insulina mediada por olanzapina a nivel hepático en ratas macho (72,73) .

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son fármacos ampliamente utilizados en condiciones clínicas relacionadas con inflamación y enfermedades autoinmunes, y dentro de sus efectos adversos se encuentran la hiperglicemia y diabetes, los cuales han sido reportados como dependientes de la dosis y del tiempo de duración del tratamiento. La hiperglicemia puede desarrollarse tanto en individuos no diabéticos como diabéticos, en este último caso empeorando la situación, dificultando el control de la glicemia y favoreciendo el desarrollo de complicaciones. Un meta-análisis publicado en 2014 reportó que la tasa de pacientes bajo tratamiento con glucocorticoides que desarrollaron hiperglicemia y diabetes fue del 32.3 y 18.6%, respectivamente (60,62,74).

Diversos estudios han propuesto potenciales mecanismos para el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por glucocorticoides. En adipocitos aislados de rata, dexametasona disminuyó significativamente el consumo de glucosa basal y estimulado por insulina, además de alterar la unión de la insulina a la superficie celular y la expresión de IRS-1 y 2; adicionalmente disminuyó los niveles de PI3K y PKB y la fosforilación de PKB estimulada por la hormona (12); sin embargo, en el músculo esquelético de rata se ha reportado disminución en la fosforilación de GSK-3 estimulada por insulina y aumento en la expresión de PI3K inducida por dexametasona (13). Finalmente, en adipocitos 3T3-L1 tratados con el mismo glucocorticoide se ha observado disminución tanto en la expresión de GLUT1, que podría estar afectando el consumo basal, como en la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática, lo cual estaría relacionado con una reducción del consumo de glucosa estimulado por insulina (11).

3.4. Modelos de diabetes y de resistencia a la insulina

Existe una gran variedad de modelos que permiten el estudio tanto de las bases fisiopatológicas de la DMT2 y de la resistencia a la insulina como de los mecanismos de acción de los potenciales agentes para el tratamiento de estas enfermedades. Estos modelos se pueden dividir en modelos *in vivo* y modelos *in vitro*.

Modelos *in vivo*

En la actualidad se cuenta con una amplia variedad de modelos animales para el estudio de la DMT2 y de la resistencia a la insulina, en los cuales la patología es inducida a través de la dieta, cirugía, agentes químicos o alteraciones genéticas.

Los modelos animales con diabetes inducida por dieta son el resultado de una ingesta calórica excesiva representada en dietas ricas en grasas y/o carbohidratos. Por ejemplo, el consumo excesivo de grasas propicia el aumento de FFA y el desarrollo de resistencia a la insulina en músculo esquelético vía alteración en la fosforilación en tirosina de IRS; también se ha observado activación de vías inflamatorias, las cuales inhiben la señalización de insulina por inhibición de IRS-1 en adipocitos y tejido hepático (16,75). Por otro lado, hámsteres dorados machos alimentados con una dieta alta en fructosa presentaron aumento de la insulina plasmática, FFA y triglicéridos y una disminución de la señalización hepática de insulina (16). Dentro de las ventajas de estos modelos se encuentra que el desarrollo de la patología está asociado con obesidad, un factor determinante y de vital importancia en humanos. Sin embargo, una desventaja de estos modelos es que los tratamientos requieren de largos periodos de tiempo (14,75).

La inducción de diabetes se realiza también por medio de pancreatometomía parcial o completa de animales y se considera que fue el primer modelo de diabetes aunque en la actualidad no es muy utilizado. La realización de este procedimiento en forma parcial implica la resección de entre el 70 y 90% del páncreas y ha sido reportada en diferentes especies de animales como perros, cerdos, conejos y ratas. Dentro de sus principales desventajas se encuentra el alto nivel de experticia que demanda la técnica, además de la necesidad de instalaciones físicas apropiadas y el alto riesgo de infección al que están expuestos los animales, además de los cuidados postoperatorios necesarios (15,75).

Diferentes sustancias químicas han sido utilizadas como inductores de diabetes y/o resistencia a la insulina, entre ellos aloxano o algunos agentes farmacológicos como estreptozotocina o dexametasona. El aloxano, normalmente administrado por vía intravenosa debido a su baja estabilidad y corto tiempo de vida media, produce destrucción de las células β pancreáticas mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) llevando a un estado de deficiencia de insulina, hiperglicemia y cetosis, y ha sido ampliamente utilizado en modelos de roedores y no roedores (75). Estreptozotocina, un antibiótico derivado del hongo *Streptomyces achromogenes*, ha sido utilizado como inductor de diabetes en perros, ratas y ratones debido a su citotoxicidad sobre las células β pancreáticas igualmente mediada por ROS (16). Conejos y cerdos también han sido utilizados para este fin, sin embargo, son más resistentes a este agente (15). Estreptozotocina es preferida sobre el aloxano debido a su mayor tiempo de vida media, hiperglicemia sostenida por mayor tiempo y desarrollo de complicaciones diabéticas (75). Aloxano y estreptozotocina son los dos agentes principalmente usados para la inducción de diabetes mediada por agentes químicos. Se ha reportado su administración por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea y la dosis utilizada está relacionada con el trastorno metabólico desarrollado (DMT1, DMT2 o intolerancia a la glucosa) (15,75).

Dexametasona, un glucocorticoide, ha sido ampliamente descrito como inductor de DMT2 y de resistencia a la insulina en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (11,16,76). Se ha reportado que inyecciones intraperitoneales de este fármaco (1.0 mg/kg) durante 12 días resulta en resistencia a la insulina en ratas Wistar (16).

Con respecto a las alteraciones genéticas como alternativa para inducir diabetes y resistencia a la insulina en modelos *in vivo*, se ha reportado el uso de animales de laboratorio que desarrollan espontáneamente la patología, así como también algunos que son producto de la manipulación genética. Respecto a estos últimos, los ratones *knock-out* y transgénicos han sido una importante herramienta para estudiar el efecto de algunos genes en el metabolismo de la glucosa y el desarrollo de estas patologías.

Para el caso de la DMT1 se han descrito como modelos espontáneos el ratón diabético no obeso (NOD), la rata BioBreeding (BB) y la rata LEW.1AR1, entre otros (77,78); mientras que el ratón AKITA se ha descrito como modelo inducido genéticamente. Por otra parte, como modelos experimentales espontáneos de DMT2 y resistencia a la insulina se han utilizado el ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO) y los ratones ob/ob y db/db; modelos

manipulados genéticamente como los ratones *knock-out* para los genes de IRS-1, IRS-2, GLUT4 y otros genes involucrados en la señalización de la insulina (77–79).

Modelos *in vitro*

Actualmente existe actualmente una tendencia creciente a acoger los principios propuestos por el Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en la Investigación (NC3Rs) para sus investigaciones, que plantea utilizar métodos que eviten o sustituyan el uso de animales, reducir el número de animales empleados en cada experimento y finalmente refinar los métodos a utilizar con el fin de minimizar el sufrimiento y mejorar el bienestar animal. Así, los modelos *in vitro* se constituyen como una buena alternativa a la experimentación *in vivo* (80).

El uso de modelos *in vitro* que normalmente involucran cultivos de células o tejidos, se da principalmente en etapas iniciales de la investigación a manera de *screening* de moléculas con potencial actividad farmacológica, o también con el fin de conocer aspectos celulares y/o moleculares involucrados en el desarrollo de diabetes y de resistencia a la insulina. Los modelos *in vitro* normalmente utilizan líneas celulares que provienen de los tejidos principales involucrados en la secreción de insulina o en la respuesta a esta hormona: pancreático, hepático, muscular y adiposo.

Con respecto al tejido pancreático se ha reportado el uso de células β aisladas, preparaciones de islotes pancreáticos y líneas celulares secretoras de insulina (RIN, HIT, beta-TC, etc) provenientes de ratones y ratas (14,81,82). También se han utilizado cultivos primarios de hepatocitos humanos y de rata, y líneas celulares musculares como L6 y C2C12 (14,82,83). Finalmente, se han usado también diferentes tipos de células asociadas al tejido adiposo: adipocitos humanos, de rata o ratón, cultivos primarios de células adiposas y adipocitos y preadipocitos 3T3-L1, entre otros (14,84). En la tabla 1 se describen algunos de los modelos *in vitro* más frecuentemente empleados para el estudio de la DMT2 y de la resistencia a la insulina (14,15,81–84).

Tabla 1. Modelos *in vitro* para el estudio de la diabetes tipo 2 y de la resistencia a la insulina.
Tomado de Reed y Scribner, 1999 (14).

Tipo de terapia	Modelo <i>in vitro</i>
Agentes hipoglicemiantes	Hepatocitos humanos o de rata
	Homogenizados de hígado de rata
	Músculo sóleo de rata
	Diafragma de rata
Sensibilizadores a la insulina	Células musculares L6
	Miotubos murinos C2C12
	Adipocitos de rata
	Adipocitos y preadipocitos 3T3-L1
	Adipocitos C3H10T1/2
	Adipocitos humanos, de rata o de ratón
Secretagogos de insulina	Adipocitos
	Islotes de rata o ratón
	Células β de rata o ratón
	Insulinoma β TC3
	Células HIT-T15 (células β -pancreáticas de hámster)
	Diafragma de rata
	Miocitos ventriculares de rata
Adipocitos de rata y 3T3-L1	
Agentes antiobesidad	Adipocitos de rata
	Adipocitos C3H10T1/2

4. Materiales y Métodos

4.1. Materiales

La línea celular 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) fue gentilmente donada por el Dr. Alejandro Ondo de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario.

De Gibco (Grand Island, New York, USA) se adquirieron los siguientes reactivos: DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) alto en glucosa (catálogo 12800017), Suero Fetal Bovino (FBS) (catálogo 16000044), penicilina y estreptomina (catálogo 15140122) y DMEM sin glucosa (catálogo 11966025).

De Merck (Darmstadt, Germany): bicarbonato de sodio (catálogo: 1.06329.1000), 2-propanol (catálogo 1.09634.5000), metanol (catálogo 1.13351.4000) y cloroformo (catálogo 1.02445.4000).

De Biowest (Nuaille, Francia): buffer fosfato salino (PBS) (catálogo L0615-500), y tripsina-EDTA (catálogo L0930-100).

De Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA): gelatina de piel bovina (catálogo G9391-100G), insulina (catálogo I0516-5ML), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (catálogo I5879-100MG), dexametasona (catálogo D4902-100MG), *Oil Red O* (catálogo O0625-25G), indinavir (catálogo Y0000788), olanzapina (catálogo PHR1825-1G), prednisolona (catálogo P6004-100MG) e de inhibidores de proteasas (catálogo P8340-1ML).

La rosilitazona (Catálogo 1605817) fue adquirida de *United States Pharmacopeia* (USP) (Rockville, USA), la glucosa (catálogo 141341.1210) fue adquirida de PanReac (Barcelona, España), el kit Glucosa (catálogo 11504) fue adquirido de BioSystems (Barcelona, España), el kit *BCA Protein Assay* (catálogo 23225) fue adquirido de Pierce (Rockford, USA), la albúmina de suero bovino (BSA) (catálogo sc-2323) fue adquirida de ChemCruz

(Dallas, USA) y el dodecil sulfato de sodio (SDS) (catálogo 161-0301) fue adquirido de BioRad (Hercules, California, USA).

4.2. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1

Cultivo de células 3T3-L1

Se trabajó con la línea celular 3T3-L1 que corresponde a una sub-cepa de tipo fibroblasto derivada de embrión de ratón Swiss 3T3, una línea comprometida a diferenciarse en adipocitos maduros (85,86) la cual se cultivó y diferenció a adipocitos según lo descrito más adelante, y basados en trabajos previos de nuestro grupo (22–25).

Las células 3T3-L1 se sembraron en frascos de cultivo T75 y se mantuvieron en medio completo DMEM que consistió en: DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) alto en glucosa (4.5 g/L) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL y bicarbonato de sodio 1.5 g/L. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% con cambios de medio cada dos días.

Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de aproximadamente un 60-80%, las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y se levantaron con una solución de tripsina (0.5 g/L)-EDTA 1X para luego ser sembradas nuevamente en frascos T75 a una densidad de 7000 células/frasco (para mantenimiento del cultivo) o en placas de 24 o 48 pozos a una densidad de 8000 células/cm² (para los experimentos descritos en este trabajo).

Con el fin de evitar el desprendimiento de la monocapa celular, antes de sembrar las células los pozos fueron pretratados durante toda la noche a 4°C con una solución de gelatina de piel bovina 20 mg/mL, la cual se filtró utilizando una membrana de 0.22 micras.

Diferenciación de células 3T3-L1

Las condiciones de diferenciación a adipocitos fueron establecidas anteriormente en nuestro grupo de investigación (22–25).

Para los diferentes ensayos reportados en este trabajo, las células fueron sembradas a una densidad de 8000 células/cm² en placas de 24 o 48 pozos pretratadas con gelatina 20 mg/mL y el cultivo se mantuvo en medio completo DMEM hasta alcanzar confluencia; dos días después (tiempo cero de diferenciación) las células fueron expuestas a medio de diferenciación que consistió en medio completo DMEM alto en glucosa, indicado previamente, suplementado con insulina 10 µg/mL, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.5 mM, dexametasona 0.1 µM y rosiglitazona 2 µM durante 48 horas y luego mantenidas en medio completo DMEM alto en glucosa por 7 días hasta completar el proceso de diferenciación, con cambios de medio cada dos días.

La verificación del estado diferenciado se realizó por observación de la acumulación de lípidos mediante tinción de grasas neutras y ésteres de colesterol con *Oil Red O* como ha sido realizado previamente en nuestro grupo de investigación (22–24). Para esto se preparó una solución *stock* de *Oil Red O* disolviendo 0.7 g de reactivo en 200 mL de 2-propanol, la cual posteriormente se filtró utilizando una membrana de 0.22 micras y fue almacenada en refrigeración. La solución de trabajo se preparó justo antes de utilizarla, por dilución 3 en 5 de la solución *stock* en agua destilada, dilución que fue nuevamente filtrada.

La tinción se realizó retirando primero el medio de cultivo de cada pozo y fijando los adipocitos por medio de un lavado inicial con formaldehído 10% en PBS seguido de tratamiento con esta misma solución de formaldehído durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados con isopropanol 60% y se dejaron secar los pozos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron teñidas por 15 minutos utilizando la solución de trabajo de *Oil Red O* a temperatura ambiente y después se realizaron 3 o 4 lavados con agua destilada. Finalmente se dejaron secar los pozos y las células teñidas fueron fotografiadas utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 en el Laboratorio de Microscopía Óptica de la Universidad Nacional de Colombia.

4.3. Evaluación del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1

Bioensayo de consumo de glucosa

Con el fin de valorar el consumo de glucosa en los diferentes experimentos se trabajó con adipocitos 3T3-L1 diferenciados por 7 días en placas de 48 pozos de acuerdo a lo descrito previamente (sección 4.2). A continuación las células fueron ayunadas de glucosa por una hora en medio DMEM sin glucosa y se procedió a evaluar el consumo basal y estimulado por insulina. El consumo basal se midió en ausencia de insulina y el consumo estimulado se midió en presencia de insulina a las condiciones descritas en cada tabla o figura.

El bioensayo se basó en la medición de la glucosa extracelular, la que fue cuantificada con el kit comercial Glucosa, que se basa en el método descrito por Trinder (87). Este método consiste en dos reacciones enzimáticas acopladas catalizadas por las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, respectivamente, que convierten la glucosa en quinoneimina, un compuesto que absorbe a 500 nm. El ensayo se adaptó a un formato en microplacas de ELISA de 96 pozos, donde se mezclaron 2 μL de muestra con 200 μL de reactivo y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente (16-25°C) por 10 minutos según lo descrito previamente por nuestro grupo (25). La absorbancia a 500 nm fue leída en un lector de microplacas BioRad modelo Microplate Manager® 6, gentilmente facilitado por el Dr. Giovanni Garavito de nuestro Departamento de Farmacia. La concentración de glucosa extracelular en el medio de cultivo fue calculada comparando la absorbancia de la muestra con la de un patrón de glucosa (100 mg/dL), de acuerdo a lo indicado por el proveedor del reactivo usando la ecuación:

$$C_M = \left(\frac{A_M}{A_P} \right) C_P$$

donde C_M es la concentración de glucosa en la muestra (glucosa extracelular), A_M la absorbancia de la muestra, A_P la absorbancia del patrón y C_P la concentración del patrón (100 mg/dL).

El consumo de glucosa se calculó como la diferencia entre la glucosa inicial (GI) y la glucosa extracelular (GE) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo} = GI - GE$$

Optimización de las condiciones del bioensayo de consumo de glucosa

Para optimizar las condiciones del bioensayo de consumo de glucosa se evaluaron diferentes tiempos (0 a 480 min) y diferentes concentraciones de glucosa inicial (1.4, 2.8 y 5.5 mM que corresponden a 25, 50 y 100 mg/dL, respectivamente) en ausencia y presencia de insulina según se indica en las respectivas figuras. En cada condición se evaluó el consumo de glucosa basal y estimulado por insulina de acuerdo a lo descrito previamente. Para estos ensayos se realizaron 5 experimentos independientes, cada uno de ellos por triplicado.

Para los experimentos concentración-respuesta de insulina las células fueron colocadas en medio DMEM con glucosa 1.4 mM y diferentes concentraciones de insulina (0, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100 y 200 nM) durante 240 minutos. Los datos de consumo de glucosa en función de la concentración de insulina se graficaron y ajustaron mediante una regresión logística de cuatro parámetros de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \left(1 + 10^{\left((\text{Log } EC50 - x) * \text{Pendiente de Hill} \right)} \right)$$

Donde y_{\min} corresponde al menor valor de consumo, y_{\max} al mayor valor de consumo, EC50 a la concentración efectiva 50 y la pendiente de Hill al valor de la pendiente en la zona donde se presenta entre el 10 y el 90% de la respuesta.

Se realizaron 5 experimentos independientes, cada uno de ellos por cuadruplicado (4 réplicas).

Determinación de los parámetros cinéticos del consumo de glucosa

Para determinar los parámetros cinéticos del consumo de glucosa, los datos de consumo de glucosa en función del tiempo se ajustaron mediante una regresión lineal a la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde m corresponde a la pendiente de la curva y b corresponde a la ordenada al origen.

A continuación los valores de velocidad de consumo (pendientes de las curvas de consumo en el tiempo) en función de la concentración inicial de glucosa se ajustaron mediante una curva de saturación a la siguiente ecuación:

$$y = V_{m\acute{a}x} * x / (K + x)$$

Donde $V_{m\acute{a}x}$ y K corresponden a la velocidad máxima y constante del proceso de consumo, respectivamente.

Límite de detección (LOD)

El LOD se define como la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo determinadas condiciones experimentales. Para determinar el LOD se construyeron curvas de calibración de absorbancia versus concentración de glucosa, a partir de las cuales se obtuvieron los parámetros m y S_b donde m corresponde a la sensibilidad de calibración (la pendiente de la curva de calibración) y S_b a la desviación estándar de la lectura del blanco (medio DMEM sin glucosa), y se aplicó la siguiente fórmula (88,89):

$$LOD = \frac{3.3S_b}{m}$$

Las concentraciones de glucosa evaluadas fueron (en nmol/mL): 0, 2.7, 5.4, 10.8, 21.7, 43.4, 86.7, 173.4, 346.8, 693.7, 1387.3, 2774.7 y 5549.4 nmol/mL (entre 0 y 100 mg/dL). Estos experimentos se realizaron 3 veces, cada una de ellas por triplicado.

Límite de cuantificación (LOQ)

El LOQ se define como la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con suficiente precisión y exactitud. El cálculo del LOQ se realizó a partir de las mismas curvas de calibración y aplicando la siguiente fórmula (88,89) :

$$LOQ = \frac{10S_b}{m}$$

donde m y S_b corresponden a los mismos parámetros recién descritos para el cálculo del LOD.

4.4. Tratamientos farmacológicos

Evaluación de inductores de resistencia a la insulina

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes inductores de resistencia a la insulina sobre el consumo de glucosa se trabajó con adipocitos 3T3-L1 diferenciados por 7 días en placas de 48 pozos de acuerdo a lo descrito previamente (sección 4.2).

Los adipocitos 3T3-L1 fueron sometidos por diferentes periodos de tiempo (0 a 48 horas) a tratamiento con diferentes agentes farmacológicos que han sido descritos como potenciales inductores de resistencia a la insulina: indinavir 100 μM , olanzapina 100 μM , peróxido de hidrógeno 100 μM , dexametasona 10 μM y prednisolona 10 μM . Estas condiciones se tomaron de acuerdo a lo descrito por otros autores en la literatura (90–94). Una vez cumplido el respectivo tiempo de tratamiento con los diferentes agentes farmacológicos, las células fueron ayunadas de glucosa por 1 hora en medio DMEM sin glucosa y se procedió a determinar el consumo de glucosa tanto basal como estimulado por insulina de acuerdo a lo descrito antes.

En el caso de la prednisolona se realizaron curvas concentración-respuesta, en donde se evaluaron diferentes concentraciones de prednisolona (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 μM) por un periodo de 48 h. En todos los casos el consumo se determinó en ausencia de insulina (consumo basal) y también en presencia de insulina (consumo estimulado) como se describió previamente (sección 4.3).

Para todas estas evaluaciones se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno de ellos por cuadruplicado (4 réplicas).

Evaluación del modelo frente a un sensibilizador a la insulina

Para evaluar el modelo de resistencia a la insulina frente a un sensibilizador a esta hormona se trabajó con adipocitos 3T3-L1 diferenciados por 7 días en placas de 48 pozos de acuerdo a lo descrito previamente (sección 4.2).

Los adipocitos diferenciados fueron expuestos durante 48 h a las siguientes condiciones experimentales: (i) control (vehículo), (ii) prednisolona 100 μM , y (iii) prednisolona 100 μM y rosiglitazona 100 μM . Finalmente se determinó el consumo de glucosa basal y estimulado

por insulina según se describió anteriormente. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno de ellos por cuadruplicado (4 réplicas).

4.5. Extracción de proteína total de adipocitos 3T3-L1 y análisis proteómico

Para los procedimientos de extracción de proteína, las células 3T3-L1 fueron sembradas a una densidad de 8000 células/cm² en placas de 6 pozos pretratadas con gelatina y diferenciadas por 7 días según se indicó previamente. A continuación se dividieron en dos grupos experimentales: (1) control (vehículo) y (2) prednisolona 100 µM ambos grupos fueron incubados por 48 h de acuerdo a las condiciones establecidas anteriormente (sección 4.4). Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se realizó la extracción de proteínas totales utilizando el método de metanol/agua/cloroformo de acuerdo a lo descrito por Sapcariu y colaboradores (2014) (95). Para ello, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente se adicionaron 400 µL de metanol frío (-20°C) y 400 µL de agua fría conteniendo un coctel de inhibidores de proteasas. Las placas fueron mantenidas en hielo durante todo el procedimiento. Las células se levantaron con un *scraper* y el extracto celular fue transferido a un tubo eppendorf que contenía 400 µL de cloroformo (-20°C). La mezcla fue agitada manualmente y mantenida en hielo por alrededor de 20 minutos y luego centrifugadas durante 5 minutos a 16000 g y 4°C. La interfase proteica se separó y fue resuspendida en SDS 4% en PBS.

Las proteínas fueron visualizadas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (12.5%). La concentración de proteína total fue cuantificada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit comercial *BCA Protein Assay*. Para ello se construyó una curva de calibración de absorbancia (562 nm) vs. concentración de proteína usando como estandar albúmina de suero bovina (BSA). La reacción se llevó a cabo en un formato de placas de ELISA de 96 pozos utilizando 25 µL de muestra y 200 µL de reactivo e incubando a 37°C por 30 minutos. El anexo 1 muestra la curva de calibración obtenida.

Finalmente, el extracto de proteína total fue liofilizado toda la noche, en un liofilizador Labconco® modelo LyphLock 6, disponible en el Laboratorio de Ensayos Farmacológicos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

La caracterización del perfil proteico del modelo celular estudiado se realizó a través de un análisis proteómico cuantitativo *label free* (96) contratado con la empresa Bioproximity (Manassas, Virginia, USA). Se analizaron 3 réplicas de cada condición experimental, para lo cual se envió entre 460 y 500 µg de proteína liofilizada por cada muestra.

El servicio contratado incluyó la limpieza y digestión trípica de las muestras, seguido de la extracción en fase sólida (SPE) de los digeridos resultantes. Posteriormente, las muestras tratadas fueron analizadas por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (UPLC-MS/MS) y finalmente los péptidos fueron identificados empleando las herramientas Comet y Tandem (97,98), además de la búsqueda en librerías espectrales, análisis de la coincidencia entre las diferentes corridas realizadas (valores precisos de masas y tiempos de retención) y cuantificación basada en las medidas de área de los picos de la primera etapa del análisis de masas (MS1).

El análisis final de los perfiles proteicos se realizó teniendo en cuenta la significancia estadística ($p \leq 0.05$) de la comparación, así como también las tasas de cambio (iguales o mayores al 25%) de cada una de las proteínas cuantificadas. Los análisis de ontología génica (GO) se realizaron utilizando el sistema PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (99,100) y se clasificaron las proteínas diferencialmente expresadas (y sus genes) de acuerdo con los diferentes recursos de GO (componente celular, el proceso biológico y la función molecular).

4.6. Análisis estadísticos

Se determinó la parametricidad de los datos a analizar utilizando la prueba $F_{máx}$ de Hartley (101) para evaluar homocedasticidad, y el test de Kolmogorov-Smirnov (102) para normalidad. Las comparaciones entre consumo basal y estimulado por insulina para los distintos tratamientos fueron realizadas por medio de una prueba t (103), en el caso de datos paramétricos, o del test de Mann-Whitney (104) para no paramétricos. Comparaciones entre consumo basal para diferentes tiempos de tratamiento se realizaron

mediante un ANOVA (105) y posteriormente comparaciones múltiples con el test de Tukey (106) en el caso de datos paramétricos, y prueba de Kruskal-Wallis (107) seguida de comparaciones múltiples con el test de Dunn (108) en el caso de los no paramétricos. Para las comparaciones entre datos de consumo estimulado por insulina a distintos tiempos de tratamiento se utilizaron los mismos tests. Todos los análisis estadísticos y las gráficas presentadas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0c para Mac (109).

5. Resultados

5.1. Cultivo y diferenciación de células 3T3-L1

La línea celular 3T3-L1 se cultivó y diferenció de acuerdo a lo descrito previamente en la sección Materiales y métodos.

La figura 4 muestra imágenes del cultivo celular durante el progreso del proceso de diferenciación (0, 4 y 8 días). Las células control mantienen el fenotipo tipo fibroblasto, sin presentar mayores cambios morfológicos entre 0 y 8 días, con la excepción de un leve levantamiento de algunas células lo cual se evidencia por la aparición de espacios vacíos en el plato de cultivo, y que se asocia con el estado de hiperconfluencia del cultivo. Por el contrario, en las células diferenciadas se observan notables cambios morfológicos a partir del día 4 de diferenciación que incluyen aumento del tamaño celular, morfología más redondeada, y acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma celular, lo cual es más evidente al día 8 de diferenciadas. Todos estos cambios celulares son característicos del proceso de diferenciación a células adiposas maduras.

Con el fin de confirmar aún más el estado diferenciado, el cultivo celular fue tratado con el agente de tinción *Oil Red O*, específico para lípidos neutros. Los resultados de la tinción se muestran en la figura 5. En esta figura se observa que las células diferenciadas, además de los cambios descritos previamente, se tiñen con *Oil Red O*, en menor medida en el día 4 y más ampliamente en el día 8 de diferenciación, evidenciando acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas y contrastando con las células control no diferenciadas en las cuales no se observó tinción. Estos resultados evidencian que las células 3T3-L1 fueron efectivamente diferenciadas en adipocitos.

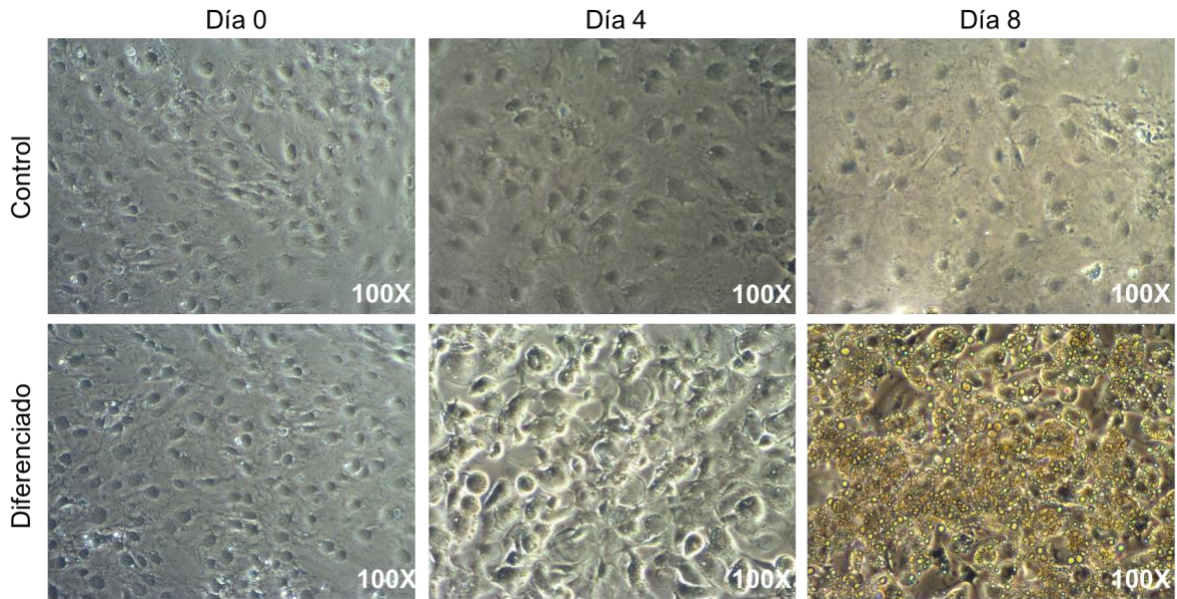


Figura 4. Diferenciación de las células 3T3-L1. Células 3T3-L1 fueron sembradas en placas de 24 pozos y crecidas hasta confluencia; dos días después las células fueron colocadas en medio control (panel superior) o en medio de diferenciación (panel inferior) durante 0, 4 y 8 días (Aumento 100X).

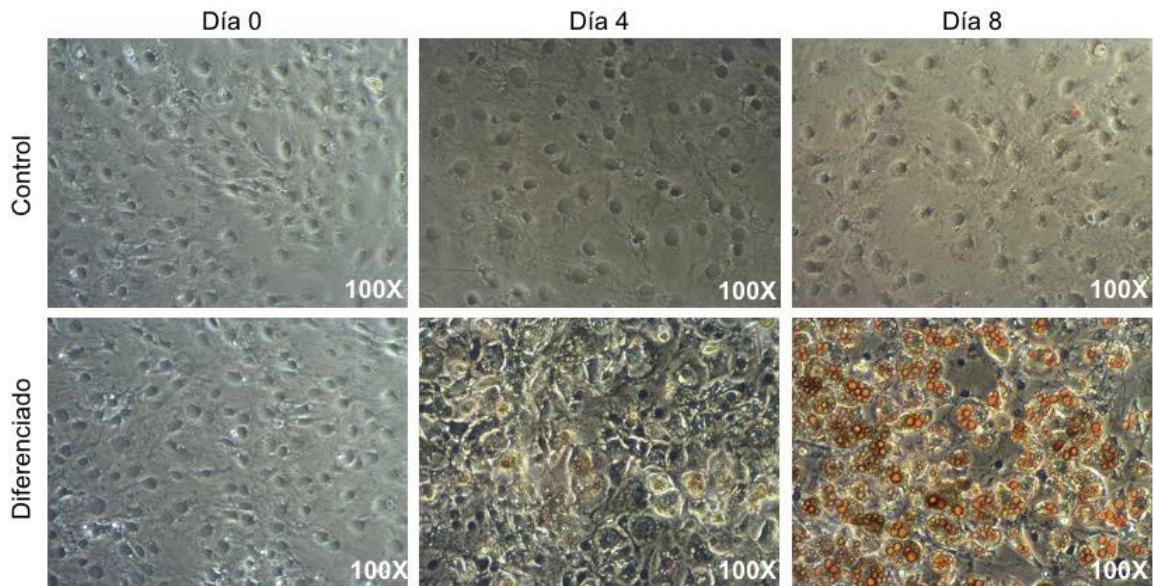


Figura 5. Tinción de lípidos con *Oil Red O*. Células 3T3-L1 fueron sembradas en placas de 24 pozos y dos días después de alcanzar confluencia fueron colocadas en medio control (panel superior) o en medio de diferenciación (panel inferior) durante 0, 4 y 8 días, y posteriormente teñidas utilizando *Oil Red O* según se describe en metodología (Aumento 100X).

En la figura 6 se muestran con mayor aumento (400X) las células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 8 días, donde pueden observarse más claramente las gotas lipídicas intracitoplasmáticas características de los adipocitos maduros y teñidos con *Oil Red Oil*.

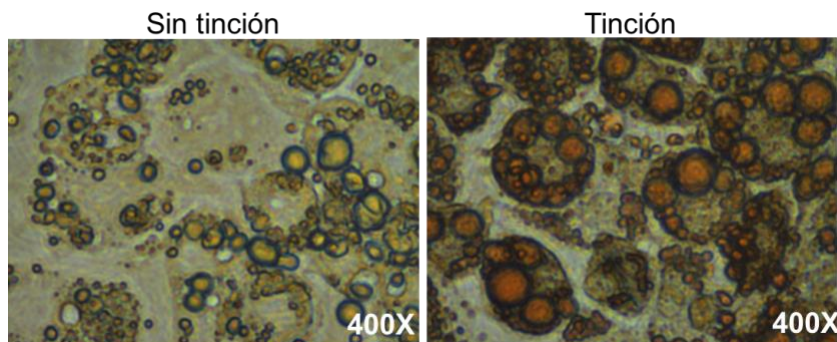


Figura 6. Gotas lipídicas intracitoplasmáticas en células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 8 días. Cultivo sin tinción (izquierda) y cultivo teñido con *Oil Red O* (derecha) (Aumento 400X) .

5.2. Evaluación del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1

Parámetros analíticos del método de cuantificación de la glucosa extracelular

A continuación se procedió a implementar un bioensayo colorimétrico para cuantificar el consumo de glucosa, el cual se basó en la medición o valoración de la glucosa extracelular. En primer lugar se procedió a determinar los parámetros analíticos límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método colorimétrico empleado para cuantificar glucosa extracelular. Estos parámetros corresponden a parámetros de calidad que nos permiten garantizar la confiabilidad de los resultados. Para ello, a partir de una solución *stock* de glucosa (1.4 M) se prepararon diluciones seriadas de glucosa (entre 0 y 5549.4 nmol/mL) y se construyeron curvas de calibración de absorbancia (492 nm) versus concentración de glucosa.

La figura 7 muestra la curva de calibración obtenida experimentalmente a partir de tres experimentos independientes. La figura 7A presenta los resultados para todo el rango de concentraciones evaluado (0-5549.4 nmol/mL) mientras que la figura 7B muestra solo la zona de bajas concentraciones (0-693.7 nmol/mL). Se observó linealidad de la respuesta en prácticamente todo el rango de concentraciones evaluadas y los valores se ajustaron a

una regresión lineal con un coeficiente de correlación (r_2) de 0.9959. Sin embargo, cabe aclarar que en la zona de bajas concentraciones (<100 nmol/mL) se observan variaciones de la linealidad. Con base en esta curva se calculó un LOD de 132.5 nmol/mL y un LOQ de 401.5 nmol/mL.

Es importante destacar que todos los datos de consumo de glucosa reportados en este trabajo fueron obtenidos trabajando dentro del rango de linealidad del ensayo y por encima del valor LOQ encontrado.

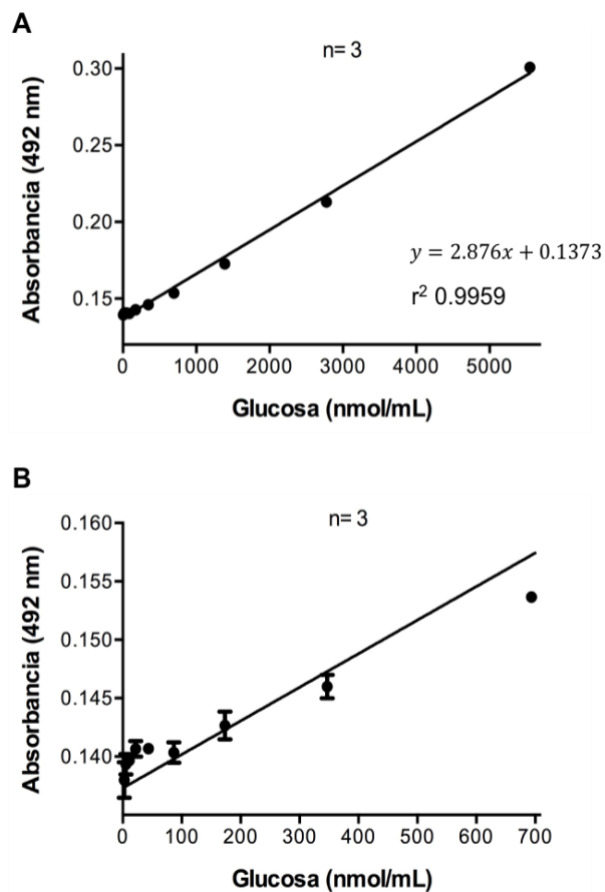


Figura 7. Curva de calibración para el ensayo de glucosa utilizado en el presente trabajo. (A) Todo el rango de concentraciones de glucosa evaluado (0-5549.4 nmol/mL) (B) Zona de bajas concentraciones de glucosa (0-693.7 nmol/mL). Ambas gráficas presentan el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado.

Bioensayo de glucosa

A continuación se evaluó el consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1 sembradas sobre placas de 48 pozos y diferenciadas por 7 días de acuerdo a lo descrito en metodología. Con el fin de estandarizar las condiciones del bioensayo, las células adiposas fueron colocadas en un medio conteniendo diferentes concentraciones de glucosa extracelular inicial (1.4, 2.8 y 5.5 mM) y el consumo de glucosa fue evaluado a distintos tiempos (0, 120, 240, 360 y 480 minutos), ya sea en ausencia o presencia de insulina 100 nM.

Los resultados se presentan en la figura 8. Para las tres concentraciones de glucosa evaluadas se observó una respuesta dependiente del tiempo, con un mayor consumo de glucosa a mayores tiempos, tanto en condiciones basales como bajo estímulo con insulina. Además, se observa que el consumo estimulado con insulina fue mayor que el consumo basal en todos los casos, sin embargo las diferencias entre el estimulado y el basal fueron estadísticamente significativas solo en cuatro de las quince condiciones evaluadas. Estas condiciones de diferencias significativas fueron: glucosa inicial 5.5 mM a tiempos de 120, 360 y 480 min (Figura 8A), y glucosa inicial 1.4 mM a 240 min (Figura 8C). Sorprendentemente, al evaluar glucosa inicial 2.8 mM no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el basal y el estimulado a pesar de que si es clara la diferencia entre ambos consumos; esto podría deberse a la sensibilidad del método de cuantificación.

Bajo las condiciones donde se observaron diferencias estadísticamente significativas, el consumo estimulado por insulina fue de 1.5 a 2.5 veces superior al consumo basal, lo que se aprecia más claramente en los valores de consumo presentados en la tabla 2.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el consumo máximo de glucosa fue de un 37% en condiciones basales y de un 56% en condiciones estimuladas. Este máximo consumo se observó trabajando a 1.4 mM de glucosa inicial y 240 min de incubación.

En cuanto al efecto del tiempo, si se compara con el tiempo cero el consumo basal fue significativamente diferente a partir de 240 min en glucosa inicial 5.5 mM y a partir de 120 min en glucosa inicial 1.4 mM. Por su parte, en el consumo estimulado las diferencias fueron significativas a partir de 120 min en glucosa inicial 5.5 mM y a partir de 120 min en glucosa inicial 1.4 mM.

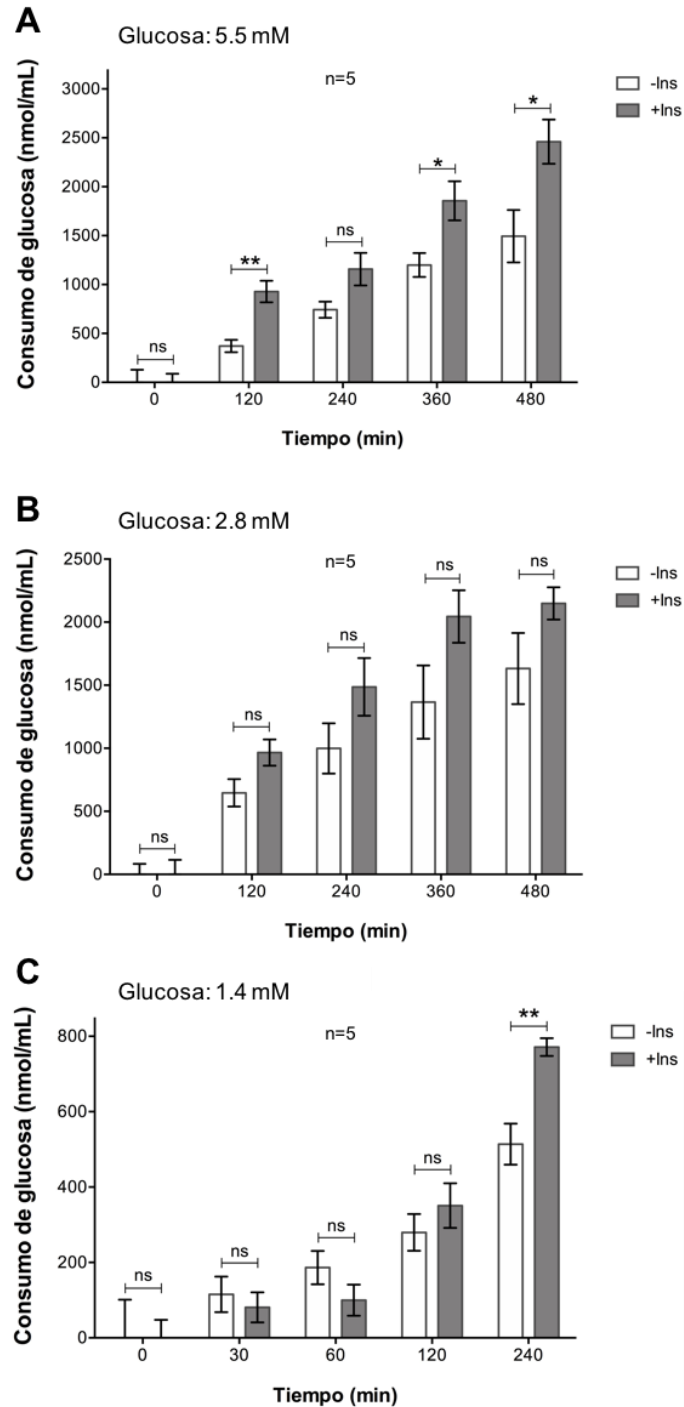


Figura 8. Consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1. Se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa extracelular inicial: A. 5.5 mM, B. 2.8 mM y C. 1.4 mM. A los tiempos indicados, el consumo basal se evaluó en ausencia de insulina mientras que el consumo estimulado fue evaluado en presencia de insulina 100 nM en el medio de cultivo. Para 1.4 mM de glucosa inicial se presentan datos hasta 240 min ya que a tiempos mayores los valores se encuentran por debajo del LOQ del método. Se representa el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Tabla 2. Consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1.

Tiempo (min)	Consumo basal (nmol/mL)	Consumo estimulado (nmol/mL)	<i>p</i>
Glucosa inicial 5.5 mM			
0	0±290	0±197	>0.9999
120	372±141	928±246§	0.0040
240	743±186§	1157±372§	0.0680
360	1199±274§	1856±447§	0.0278
480	1494±600§	2460±505§	0.0256
Glucosa inicial 2.8 mM			
0	0±187	0±257	0.9996
120	646±244	966±233§	0.0556
240	999±445	1486±511§	0.1477
360	1366±650§	2045±465§	0.0981
480	1632±630§	2149±286§	0.1500
Glucosa inicial 1.4 mM			
0	0±227	0±107	>0.9999
30	115±106	81±89	0.5937
60	187±99	100±92	0.1892
120	280±109§	351±132§	0.3833
240	514±122§	771±52§	0.0061

p, comparación basal vs estimulado

§ *p* < 0.05 (vs tiempo 0).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba *t* (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos).

Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en un medio conteniendo glucosa a la concentración inicial indicada, tanto en ausencia (consumo basal) o presencia (consumo estimulado) de insulina 100 nM. El consumo de glucosa se evaluó con el bioensayo descrito previamente en materiales y métodos.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

Los resultados anteriores nos permiten concluir que las condiciones óptimas para cuantificar consumo de glucosa basal y estimulado por insulina con nuestro bioensayo colorimétrico son las siguientes: concentración inicial de glucosa 5.5 mM por 120, 360 o 480 min o concentración de glucosa inicial 1.4 mM por 240 min. En ambos casos el

estimulo se realizó con insulina 100 nM. Estas condiciones nos garantizan que el consumo de glucosa estimulado por insulina será significativamente mayor que el consumo basal (entre 1.5 y 2.5 veces). Todos los resultados posteriores de este trabajo fueron obtenidos trabajando con la condición de glucosa inicial de 1.4 mM y evaluando el consumo de glucosa a 240 min.

Dado que los datos anteriores parecían reflejar una tendencia lineal entre el consumo de glucosa y el tiempo, se decidió aplicar un análisis de regresión lineal a nuestros datos experimentales, y estos resultados se muestran en la figura 9. Los ajustes lineales tanto bajo condiciones de consumo basal como estimulado por insulina resultaron ser bastante buenos, con valores de r_2 entre 0.9303 y 0.9969, lo que confirma una relación lineal entre el consumo de glucosa y el tiempo de incubación en todo el rango de tiempos evaluados.

A partir de este resultado fue posible calcular la velocidad de consumo de glucosa, lo que nos permitiría obtener los parámetros cinéticos para este proceso. La tabla 3 presenta los datos de velocidad de consumo a las distintas concentraciones de glucosa inicial, obtenidos a partir de los ajustes lineales. La figura 10 muestra un gráfico de estos datos de velocidad en función de la concentración de glucosa, evidenciando un comportamiento saturable. De hecho, el ajuste de nuestros datos a una ecuación de saturación permitió observar un coeficiente de correlación de Pearson (r_2) de 0.9624 para el estado basal y de 0.9967 para el estimulado. A partir de esta curva, se determinaron los parámetros cinéticos velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de consumo (K) para el proceso de consumo de glucosa tanto basal como estimulado por insulina, los cuales se presentan en la tabla 4. Se observa que la $V_{m\acute{a}x}$ del consumo estimulado es aproximadamente 1.5 veces superior a la $V_{m\acute{a}x}$ del basal, mientras que la constante de consumo K prácticamente no cambió entre el basal y el estimulado.

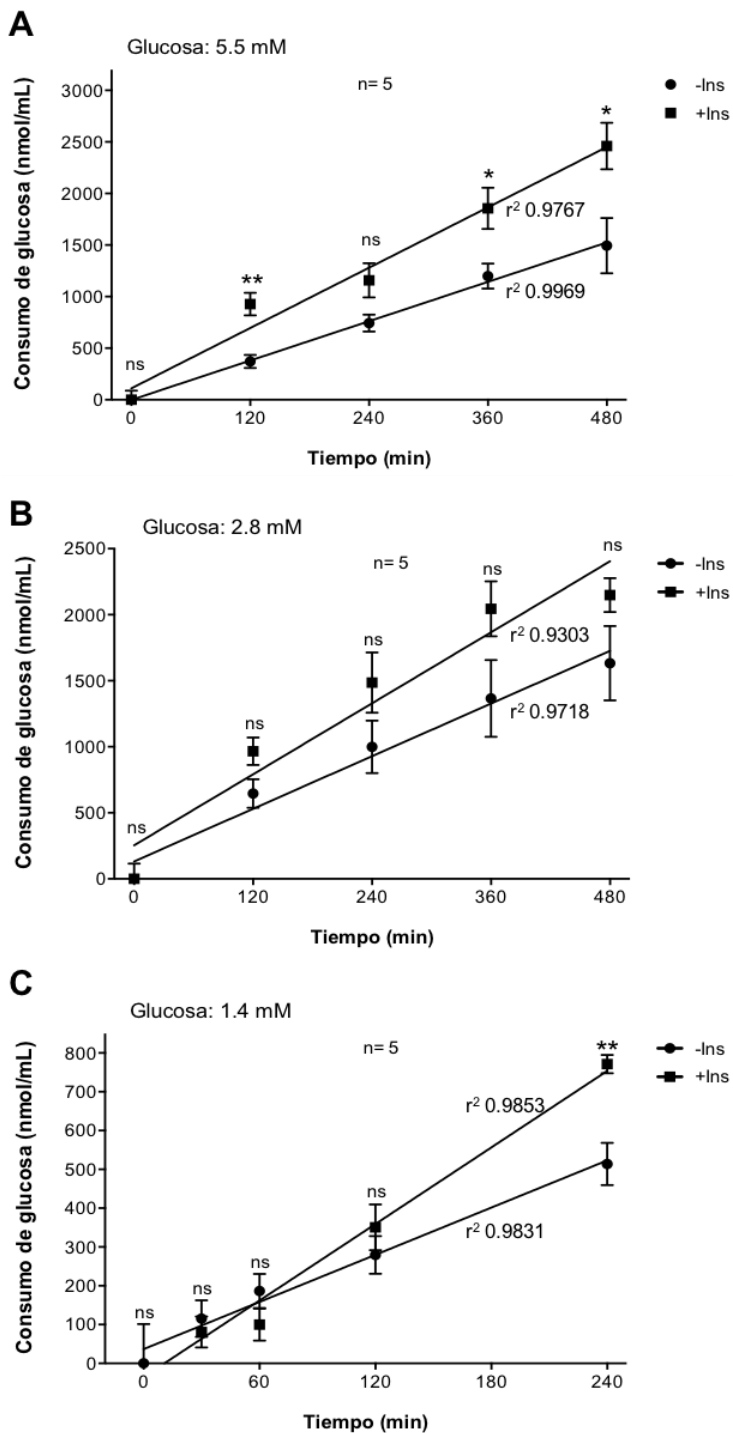


Figura 9. Relación lineal entre el consumo de glucosa y el tiempo de incubación de las células adiposas 3T3-L1. Los datos de consumo de glucosa (basal y estimulado por insulina) para diferentes concentraciones de glucosa inicial (A. 5.5 mM, B. 2.8 mM y C. 1.4 mM) fueron analizados mediante una regresión lineal. Se representa el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Se realizaron comparaciones del consumo basal y estimulado por insulina para cada uno de los tiempos evaluados, ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Tabla 3. Velocidad del consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1.

Glucosa inicial (mM)	Velocidad de consumo basal (nmol/mL/min)	Velocidad de consumo estimulado (nmol/mL/min)
0	0	0
1.4	2.03 ± 0.15	3.29 ± 0.23
2.8	3.18 ± 0.10	4.88 ± 0.44
5.5	3.32 ± 0.33	4.48 ± 0.71

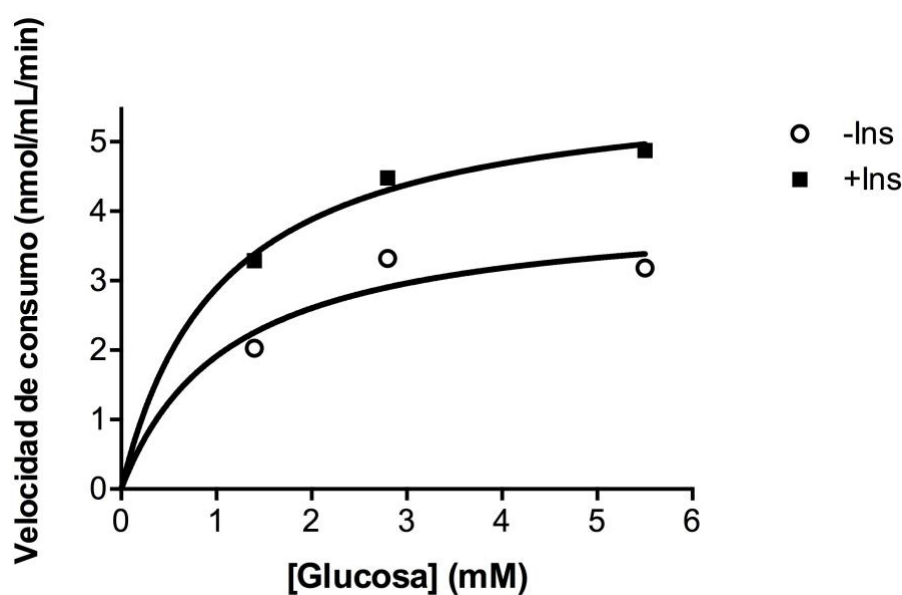


Figura 10. Curva de saturación del proceso de consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1. Los símbolos representan los datos experimentales y las curvas corresponden al mejor ajuste de los datos a la ecuación de saturación descrita en Materiales y Métodos.

Tabla 4. Parámetros cinéticos del consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1.

Consumo	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol/mL/min)	K (mM)
Basal	4.09	1.14
Estimulado	5.91	1.05

Los datos anteriores fueron obtenidos utilizando insulina 100 nM. Para saber si a esta concentración de insulina el efecto generado es máximo o parcial, se decidió realizar experimentos de tipo concentración-respuesta y los resultados se presentan en la figura 11. Se observa una clara dependencia entre el consumo de glucosa y la concentración de insulina utilizada: a mayor concentración de la hormona, mayor es el consumo de glucosa observado, encontrando un máximo a concentraciones iguales o superiores a 50 nM de insulina. A partir de esta curva se calculó una concentración efectiva 50 (EC_{50}) de 18.4 ± 1.1 nM de insulina. Esto indica que a las condiciones de estimulación utilizadas previamente (insulina 100 nM por 240 min) estamos trabajando bajo condiciones de efecto máximo del sistema.

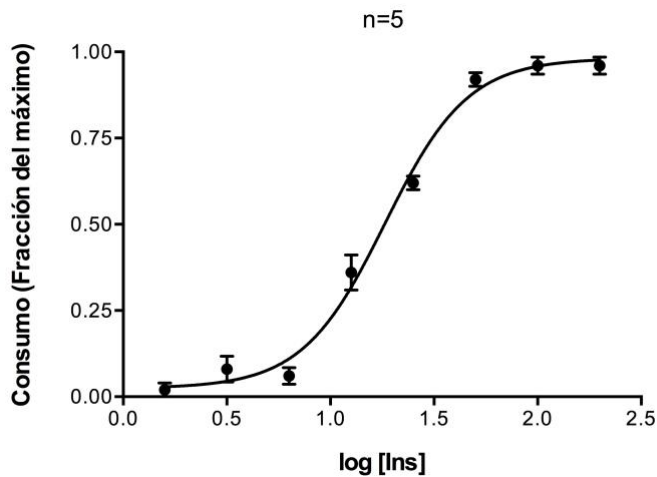


Figura 11. Curva concentración-respuesta para insulina en las células adiposas 3T3-L1. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de insulina (0-200 nM) sobre el consumo de glucosa utilizando una concentración de glucosa inicial de 1.4 mM y una estimulación con insulina (a las concentraciones indicadas) durante 240 minutos. Se representa el promedio \pm SEM de cinco experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado. Los símbolos representan los datos experimentales y la curva corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación de regresión logística de cuatro parámetros descrita en Materiales y Métodos.

5.3. Efecto de diferentes fármacos sobre el consumo de glucosa en células adiposas 3T3-L1

Con el fin de inducir resistencia a la insulina en nuestro modelo, las células adiposas 3T3-L1 fueron expuestas a diferentes agentes farmacológicos reconocidos inductores de resistencia a la insulina, evaluando luego el efecto de ellos sobre el consumo de glucosa tanto basal como en respuesta a la insulina.

Efecto de indinavir

Primero se evaluó el efecto de indinavir, un inhibidor de proteasas usado para el tratamiento del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La figura 12 muestra el consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en células tratadas con indinavir 100 μ M durante 0, 24 y 48 horas. En primer lugar, se observa que el consumo estimulado por insulina fue de 1.6 a 2 veces superior al consumo basal a los distintos tiempos evaluados, y esto es válido tanto para células control como para células tratadas con indinavir 100 μ M. Esto se corresponde con el efecto esperado de la insulina y además concuerda con lo observado en nuestros resultados anteriores (Figuras 8C y 9C).

Si se compara el efecto de indinavir con el control sin indinavir a un determinado tiempo de tratamiento, se observa que no existen diferencias significativas a nivel del consumo basal (Tabla 5). Igual resultado se observa en relación con el efecto de indinavir sobre el consumo estimulado (Tabla 5).

Por otro lado, si se analiza el efecto del tiempo de tratamiento se observa que indinavir aumentó significativamente el consumo de glucosa basal a 48 h, comparado con el tiempo cero. Indinavir aumentó también significativamente el consumo de glucosa estimulado a 48 h comparado con el tiempo cero. A 24 h no se observaron tales efectos (Tabla 5).

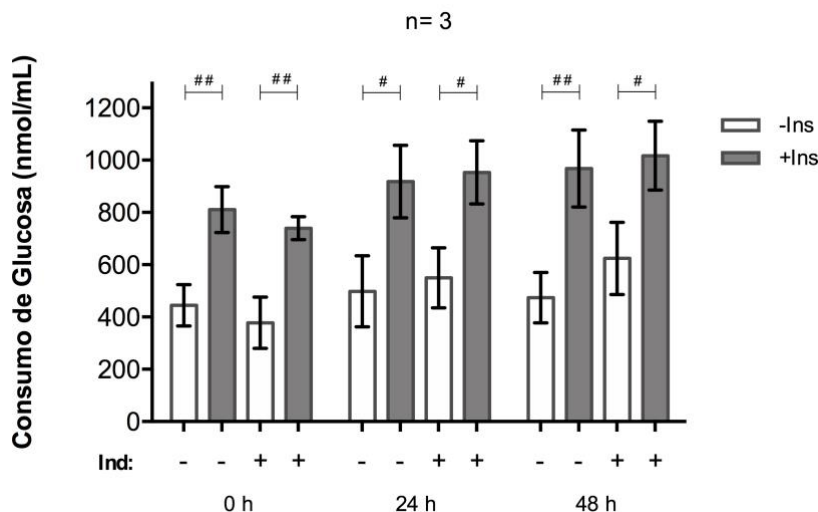


Figura 12. Efecto de indinavir sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con indinavir (Ind) 100 μ M por distintos tiempos; una vez cumplido el tiempo de tratamiento se valoró el consumo de glucosa tanto basal (-Ins) como estimulado por insulina 100 nM (+Ins). El estímulo con insulina fue por 240 min. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado. # $p \leq 0.001$; ## $p \leq 0.0001$.

Tabla 5. Efecto de indinavir (Ind) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina

t (h)	Consumo basal (nmol/mL)			Consumo estimulado (nmol/mL)			p_b	p_c
	Control	Ind	p_a	Control	Ind	p_a		
0	444 \pm 166	378 \pm 202	0.3903	810 \pm 139	740 \pm 115	0.1623	<0.0001	<0.0001
24	498 \pm 211	550 \pm 213	0.5541	918 \pm 242	895 \pm 337	0.6593	0.0002	0.0005
48	473 \pm 156	624 \pm 216 \S	0.0653	968 \pm 229	1017 \pm 213 \S	0.5927	<0.0001	0.0002

a , comparación control vs indinavir (tanto para consumo basal o consumo estimulado)

b , comparación control (basal) vs control (estimulado).

c , comparación indinavir (basal) vs indinavir (estimulado).

\S $p \leq 0.05$ (vs tiempo 0).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba t (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos). Sólo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempos de tratamiento; todas las otras diferencias resultaron ser no significativas ($p > 0.05$).

Las células fueron incubadas por el tiempo indicado ya sea con el vehículo del fármaco (Control) o con indinavir 100 μ M (Ind) por los tiempos indicados. El consumo basal y estimulado se evaluó 240 min después de incubar las células sin (consumo basal) o con insulina 100 nM (consumo estimulado), de acuerdo a lo indicado antes en el texto.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

Efecto de olanzapina

A continuación se evaluó el efecto de olanzapina, un agente de tipo antipsicótico de segunda generación, sobre el consumo de glucosa. La figura 13 presenta el consumo de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1 tratados con olanzapina 100 μM entre 0 y 48 horas. Se observa que para todos los tiempos evaluados, el consumo estimulado por insulina fue significativamente mayor, fluctuando entre 1.8 y 2.8 veces el consumo basal, tanto para células control como para células tratadas con olanzapina 100 μM .

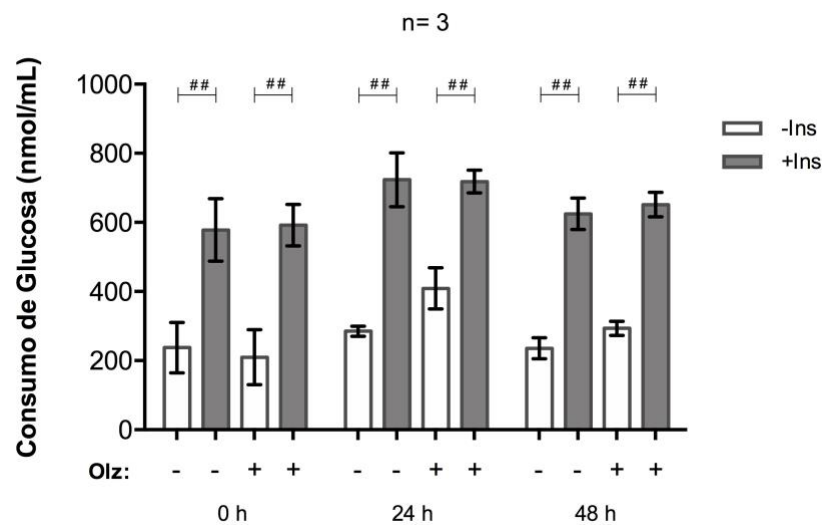


Figura 13. Efecto de olanzapina sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con olanzapina (Olz) 100 μM por distintos tiempos (0-48 h) y el consumo de glucosa basal (-Ins) y estimulado con insulina 100 nM (+Ins) fue medido a los tiempos indicados mediante el bioensayo colorimétrico descrito en metodología. El estímulo con insulina fue por 240 min. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado. ## $p \leq 0.0001$.

Al comparar el efecto de olanzapina con el control sin olanzapina a un determinado tiempo de tratamiento, se observa que este fármaco aumentó significativamente el consumo basal un 43.5 y 24.6% a 24 y 48 h, respectivamente (Tabla 6). Es decir, olanzapina favoreció el consumo de glucosa basal en adipocitos 3T3-L1. Este resultado fue sorprendente e inesperado. Se observa también que olanzapina no tuvo efectos significativos sobre el consumo de glucosa inducido por insulina a ninguno de los tiempos evaluados (Tabla 6).

Adicionalmente, se observa que olanzapina aumentó significativamente el consumo de glucosa basal a 24 h respecto al tiempo cero. Este mismo efecto se observó para el consumo estimulado por insulina a 24 h comparado con el tiempo cero. A 48 h no se observó ningún efecto (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de olanzapina (Olz) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina

t (h)	Consumo basal (nmol/mL)			Consumo estimulado (nmol/mL)				
	Control	Olz	p_a	Control	Olz	p_a	p_b	p_c
0	238±183	210±204	0.7655	578±171	592±123	0.8221	<0.0001	<0.0001
24	285±86	409±120 _§	0.0087	723±133	718±105 _§	0.9163	<0.0001	<0.0001
48	236±107	294±53	0.0203	625±119	652±112	0.5807	<0.0001	<0.0001

a, valores de *p* de la comparación control vs olanzapina (tanto para consumo basal o consumo estimulado)

b, valores de *p* de la comparación control (basal) vs control (estimulado).

c, valores de *p* para la comparación olanzapina (basal) vs olanzapina (estimulado).

_§ $p \leq 0.05$ (vs tiempo 0).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba t (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos). Sólo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempos de tratamiento; todas las otras diferencias resultaron ser no significativas ($p > 0.05$).

Las células fueron incubadas por el tiempo indicado ya sea con el vehículo del fármaco (Control) o con olanzapina 100 μM (Olz) por los tiempos indicados. El consumo basal y estimulado se evaluó 240 min después de incubar las células sin (consumo basal) o con insulina 100 nM (consumo estimulado), de acuerdo a lo indicado antes en el texto.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

Efecto de peróxido de hidrógeno

A continuación se evaluó el efecto de otro agente que se ha descrito como inductor de resistencia a la insulina, el peróxido de hidrógeno. Estos resultados se muestran en la figura 14.

En primer término y análogo a lo descrito en las figuras previas, se confirma que el consumo estimulado por insulina es significativamente mayor que el consumo basal, fluctuando entre 1.5 y 2.5 veces el basal, a todas las condiciones evaluadas.

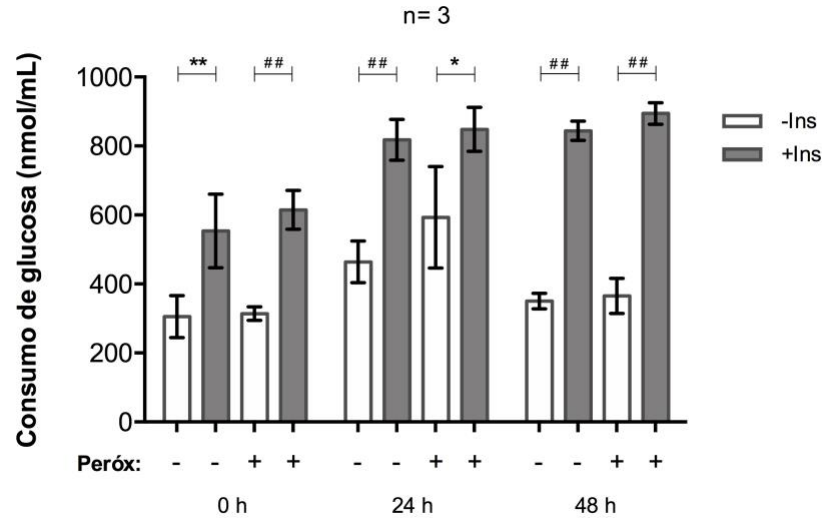


Figura 14. Efecto de peróxido de hidrógeno sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con peróxido de hidrógeno (Peróx) 100 μ M por distintos tiempos (0-48 h) y el consumo de glucosa basal (-Ins) y estimulado con insulina 100 nM (+Ins) fue evaluado mediante el bioensayo colorimétrico implementado y descrito en metodología. El estímulo con insulina fue por 240 min. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.0001$.

Al comparar el efecto del peróxido de hidrógeno con el control sin tratar a un determinado tiempo de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo basal (Tabla 7). Así mismo, tampoco se observaron diferencias significativas a nivel del consumo estimulado por insulina.

Por otra parte, si se analiza el efecto del tiempo de tratamiento se observa un aumento significativo del consumo de glucosa basal a 24 h tanto para células control como para células tratadas con peróxido de hidrógeno, comparado con el tiempo cero; además el peróxido de hidrógeno aumentó significativamente el consumo basal a 48 h comparado con el tiempo 24 h. De igual forma, el consumo estimulado por insulina aumentó significativamente a 24 y 48 h tanto para células control como para células tratadas con peróxido de hidrógeno comparado con el tiempo cero (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de H₂O₂ sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina

t (h)	Consumo basal (nmol/mL)			Consumo estimulado (nmol/mL)				
	Control	H ₂ O ₂	<i>p_a</i>	Control	H ₂ O ₂	<i>p_a</i>	<i>p_b</i>	<i>p_c</i>
0	272±109	301±78	0.8273	544±215	586±105	0.4336	0.0017	<0.0001
24	477±127 _§	591±287 _§	0.1301	840±120 _§	863±135 _§	0.5122	<0.0001	0.0104
48	336±67	354±103 _†	0.6518	838±67 _§	881±78 _§	0.0700	<0.0001	<0.0001

a, valores de *p* de la comparación control vs H₂O₂ (tanto para consumo basal o consumo estimulado)

b, valores de *p* de la comparación control (basal) vs control (estimulado).

c, valores de *p* para la comparación H₂O₂ (basal) vs H₂O₂ (estimulado).

§ *p*≤0.05 (vs tiempo 0).

† *p*≤0.05 (vs tiempo 24).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba t (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos). Sólo se indican las diferencias estadísticamente significativas (*p*≤0.05) entre los tiempos de tratamiento; todas las otras diferencias resultaron ser no significativas (*p*>0.05).

Las células fueron incubadas por el tiempo indicado ya sea con el vehículo del fármaco (Control) o con H₂O₂ 100 μM (H₂O₂) por los tiempos indicados. El consumo basal y estimulado se evaluó 240 min después de incubar las células sin (consumo basal) o con insulina 100 nM (consumo estimulado), de acuerdo a lo indicado antes en el texto.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

Efecto de dexametasona

A continuación se estudió el efecto del glucocorticoide dexametasona sobre el consumo de glucosa. La figura 15 muestra el consumo de glucosa basal y en respuesta al estímulo con insulina al tratar células adiposas 3T3-L1 con dexametasona 10 μM por 0 a 48 horas.

Nuevamente se observa que el consumo de glucosa estimulado por insulina resultó ser significativamente mayor que el basal entre 2.5 y 4.8 veces tanto en células control (sin exposición al glucocorticoide) como tratadas con en células tratadas con dexametasona por 24 y 48 horas.

Si se compara el efecto de dexametasona con el control sin dexametasona a un determinado tiempo de tratamiento, se observa que este fármaco tuvo un efecto negativo sobre el consumo de glucosa basal. Así pues, el tratamiento con dexametasona disminuyó significativamente el consumo basal en un 42.9% a 24 h, y a 48 h el efecto fue incluso mayor reduciendo el consumo basal en un 53.7% (Tabla 8).

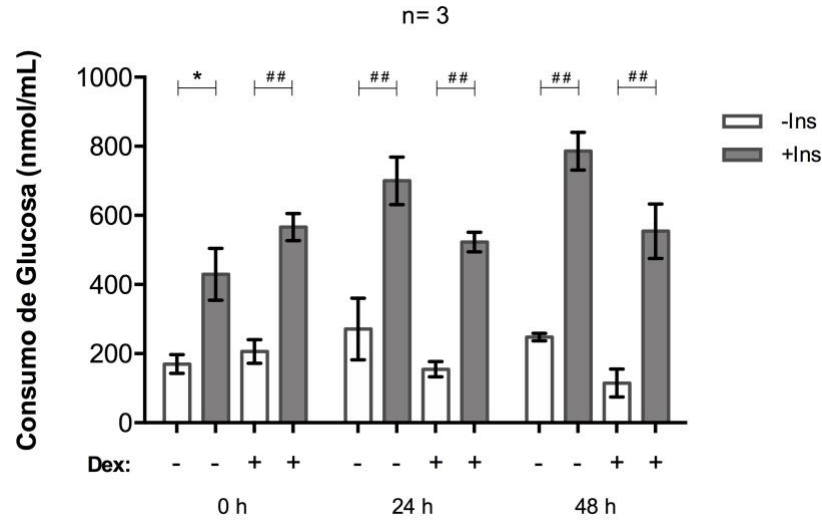


Figura 15. Efecto de dexametasona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con dexametasona (Dex) 10 μ M por distintos tiempos (0-48 h) y el consumo de glucosa basal (-Ins) y estimulado con insulina 100 nM (+Ins) fue evaluado. El estímulo con insulina fue por 240 min. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado.

* $p < 0.05$; ## $p < 0.0001$.

Tabla 8. Efecto de dexametasona (Dex) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina

t (h)	Consumo basal (nmol/L)				Consumo estimulado (nmol/L)					
	Control	Dex	Δ_{basal}	p_a	Control	Dex	Δ_{estim}	p_a	p_b	p_c
0	170 \pm 93	206 \pm 118	36	0.4103	429 \pm 126	566 \pm 93	137	0.0039	<0.0001	<0.0001
24	271 \pm 144	155 \pm 80	-116	0.0253	700 \pm 141 \S	523 \pm 95	-177	0.0018	<0.0001	<0.0001
48	248 \pm 63	115 \pm 90	-133	0.0011	786 \pm 108 \S	554 \pm 135	-232	0.0001	<0.0001	<0.0001

a , valores de p de la comparación control vs dexametasona (tanto para consumo basal o consumo estimulado)

b , valores de p de la comparación control (basal) vs control (estimulado).

c , valores de p para la comparación dexametasona (basal) vs dexametasona (estimulado).

\S $p < 0.05$ (vs tiempo 0).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba t (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos). Sólo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de tratamiento; todas las otras diferencias resultaron ser no significativas ($p > 0.05$).

Las células fueron incubadas por el tiempo indicado ya sea con el vehículo del fármaco (Control) o con dexametasona 10 μ M (Dex) por los tiempos indicados. El consumo basal y estimulado se evaluó 240 min después de incubar las células sin (consumo basal) o con insulina 100 nM (consumo estimulado), de acuerdo a lo indicado antes en el texto.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

De igual forma, dexametasona tuvo un efecto negativo sobre el consumo de glucosa estimulado por insulina, el cual significó una caída del 25.3% a 24 h, mientras que a 48 h la reducción fue del 29.5%. Adicionalmente, a tiempo cero de tratamiento se observa que dexametasona indujo un aumento del 32% en el consumo de glucosa estimulado por insulina; este cambio es significativo y sorprendente a la vez.

El efecto inhibitorio de dexametasona sobre el consumo estimulado fue superior al del consumo basal: -177 vs. -116 nmol/mL a 24 h y -232 vs. -133 nmol/mL a 48 h (Tabla 8) descartando la posibilidad de que el efecto sobre el consumo estimulado se deba a la caída en el consumo basal. Esto confirma un efecto de insulino resistencia inducido por este glucocorticoide.

Además, si se analiza el efecto del tiempo de tratamiento se observó un aumento significativo del consumo de glucosa estimulado por insulina a 24 y 48 h solamente para células control comparado con el tiempo cero (Tabla 8).

De los resultados anteriores, en donde el glucocorticoide dexametasona fue el único de los fármacos evaluados hasta aquí que indujo resistencia a la insulina en nuestro modelo celular, se decidió estudiar el efecto de un segundo glucocorticoide sobre el consumo de glucosa.

Efecto de prednisolona

A continuación se evaluó el efecto del glucocorticoide prednisolona sobre el consumo de glucosa. La figura 16 muestra el consumo de glucosa tanto basal como estimulado por insulina en adipocitos 3T3-L1 tratados con prednisolona 10 μ M durante 24 y 48 horas.

En primer lugar e igual a lo observado en las figuras anteriores, se observa que insulina aumentó significativamente el consumo de glucosa (entre 1.7 y 5 veces) comparado con el basal a los distintos tiempos evaluados. Esto es válido tanto para células control como para células tratadas con prednisolona 10 μ M.

Los efectos de prednisolona resultaron ser análogos a los descritos antes para dexametasona. Al comparar el efecto de prednisolona con el control sin prednisolona a un determinado tiempo de tratamiento, se observa que tuvo un efecto negativo sobre el consumo de glucosa basal. De hecho, el tratamiento con prednisolona por 24 h disminuyó el consumo basal en 59.2%, mientras que a 48 h la reducción fue del 58.9% (Tabla 9).

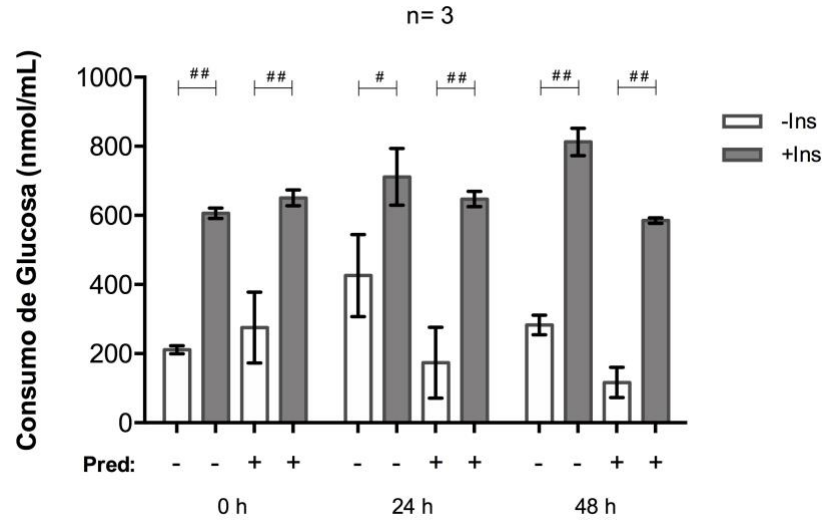


Figura 16. Efecto de prednisolona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con prednisolona (Pred) 10 μ M por distintos tiempos (0-48 h) y el consumo de glucosa basal (-Ins) y estimulado con insulina 100 nM (+Ins) fue evaluado. El estímulo con insulina fue por 240 min. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado.

$p \leq 0.001$; ## $p \leq 0.0001$.

Tabla 9. Efecto de prednisolona (Pred) sobre el consumo de glucosa basal y estimulado con insulina

t (h)	Consumo basal (nmol/L)				Consumo estimulado (nmol/L)					
	Control	Pred	Δ_{basal}	p_a	Control	Pred	Δ_{estim}	p_a	p_b	p_c
0	211 \pm 71	276 \pm 169	65	0.5222	606 \pm 53	650 \pm 51	44	0.0465	<0.0001	<0.0001
24	426 \pm 190 $_{\S}$	174 \pm 168	-252	0.0024	712 \pm 56	647 \pm 94	-65	0.2365	0.0006	<0.0001
48	283 \pm 78 $_{\dagger}$	116 \pm 110 $_{\S}$	-167	0.0004	813 \pm 86 $_{\S}$	585 \pm 55 $_{\dagger}$	-228	<0.0001	<0.0001	<0.0001

a , valores de p de la comparación control vs prednisolona (tanto para consumo basal o consumo estimulado)

b , valores de p de la comparación control (basal) vs control (estimulado).

c , valores de p para la comparación prednisolona (basal) vs prednisolona (estimulado).

\S $p \leq 0.05$ (vs tiempo 0).

\dagger $p \leq 0.05$ (vs tiempo 24).

La comparación entre el consumo basal y el estimulado se realizó por medio de una prueba t (datos paramétricos), o mediante el test de Mann-Whitney (datos no paramétricos).

La comparación entre los diferentes tiempos de tratamiento se realizó mediante un ANOVA seguido del test de Tukey (datos paramétricos), o mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de test de Dunn (datos no paramétricos). Sólo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempos de tratamiento; todas las otras diferencias resultaron ser no significativas ($p > 0.05$).

Las células fueron incubadas por el tiempo indicado ya sea con el vehículo del fármaco (Control) o con prednisolona 10 μ M (Pred) por los tiempos indicados. El consumo basal y estimulado se evaluó 240 min después de incubar las células sin (consumo basal) o con insulina 100 nM (consumo estimulado), de acuerdo a lo indicado antes en el texto.

En negrilla se resaltan los valores estadísticamente significativos.

Se observó un efecto negativo sobre el consumo de glucosa estimulado por insulina, el cual a 24 h significó una caída de 9.1%; sin embargo, esta disminución resultó no ser estadísticamente significativa. Por otro lado, a 48 h el efecto fue incluso mayor reduciendo el consumo estimulado en 28.0% (Tabla 9).

El efecto de prednisolona sobre el consumo estimulado fue superior al del consumo basal a 48 h: -228 vs. -167 nmol/mL (Tabla 9), descartando así la posibilidad de que el efecto sobre el consumo estimulado se deba a la disminución en el consumo basal. Esto confirma el efecto de inducción de resistencia a la insulina de este agente farmacológico.

Sorprendentemente, a tiempo cero en el consumo estimulado prednisolona tuvo un efecto similar a dexametasona, aumentando significativamente dicho consumo en un 7%.

Si se analiza el efecto del tiempo de tratamiento se observa un aumento significativo del consumo de glucosa basal a 24 h para células control y a 48 h para células tratadas con prednisolona, comparado con el tiempo cero; además el consumo de glucosa basal aumentó significativamente en células control a 48 h comparado con el tiempo 24 h. De igual forma, el consumo estimulado por insulina aumentó significativamente a 24 para células control comparado con el tiempo cero y a 48 h para células tratadas con prednisolona comparado con el tiempo 24 h (Tabla 9).

A continuación, se realizó un experimento del tipo concentración-respuesta para ver el efecto de la concentración de prednisolona sobre el consumo de glucosa. Para ello, células adiposas 3T3-L1 de 7 días de diferenciación fueron expuestas a diferentes concentraciones de prednisolona (0-1000 μ M) durante 48 horas, y posteriormente se determinó el consumo de glucosa tanto basal como estimulado por insulina. Se realizaron tres experimentos cada uno de ellos por cuadruplicado, y los resultados se muestran en la figura 17.

Las diferentes concentraciones de prednisolona no tuvieron un efecto sobre el consumo de glucosa basal. En cuanto al consumo estimulado por insulina se observó un claro efecto del glucocorticoide, el cual redujo significativamente el consumo estimulado por insulina a concentraciones iguales o superiores a 10 μ M (Figura 17).

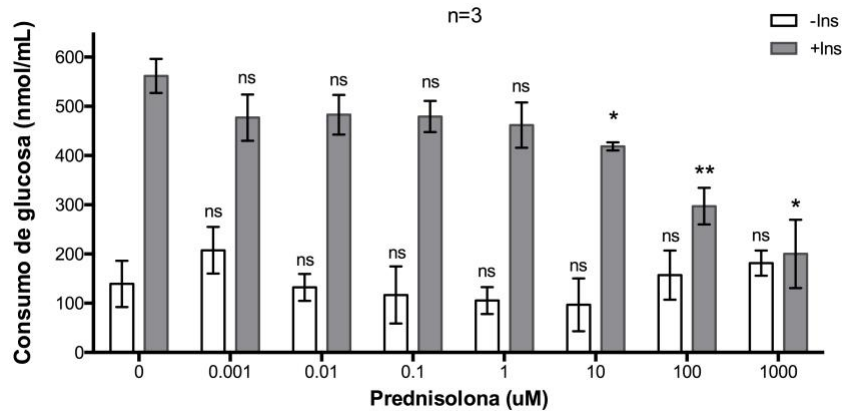


Figura 17. Efecto de la concentración de prednisolona sobre el consumo de glucosa en adipocitos 3T3-L1. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con prednisolona 0-1000 μM por 48 h y el consumo de glucosa basal (-Ins) y estimulado con insulina 100 nM (+Ins) fue evaluado. El estímulo con insulina fue por 240 min. Se realizó la comparación estadística de los valores de consumo de glucosa (basal y estimulado) para cada una de las concentraciones vs. el control (sin tratamiento). Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado. ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

En su conjunto, los resultados de la evaluación de diferentes agentes farmacológicos potencialmente inductores de resistencia a la insulina nos permite concluir lo siguiente: los fármacos indinavir, olanzapina y peróxido de hidrógeno fueron incapaces de inducir resistencia a la insulina bajo las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo. Los glucocorticoides dexametasona y prednisolona indujeron un estado de resistencia a la insulina en nuestro modelo.

Con base en lo anterior, se decidió continuar el estudio utilizando como condiciones de inducción de resistencia a la insulina: prednisolona 100 μM y 48 h de tratamiento.

5.4. Efecto de un sensibilizador a la insulina

Una vez establecidas las condiciones experimentales que permiten la inducción farmacológica de resistencia a la insulina en nuestras células adiposas 3T3-L1, se decidió evaluar el efecto de rosiglitazona (un agente sensibilizador a la insulina) sobre el consumo de glucosa. Para ello, preadipocitos 3T3-L1 fueron sembrados y diferenciados en placas de 48 pozos como se describió en materiales y métodos y posteriormente fueron expuestos

a prednisolona en ausencia o presencia de rosiglitazona. Los resultados se muestran en la figura 18.

En primer lugar, en ausencia de rosiglitazona se confirma lo observado previamente en el sentido de que prednisolona indujo resistencia a la insulina, en este caso particular disminuyendo el consumo de glucosa estimulado por insulina en un 42% al tratar con prednisolona 100 μ M por 48 h. Por otro lado, comparado con las células control, el tratamiento de las células con prednisolona y rosiglitazona simultáneamente, resultó en una sensibilización del 66%. Aunque este incremento (o recuperación) en el consumo de glucosa no logró ser igual al del control sin tratar, es un incremento significativo que confirma el efecto sensibilizador a la insulina de rosiglitazona. Nos llama la atención el hecho de que aquí no observamos un efecto de prednisolona sobre el consumo basal como hemos descrito previamente.

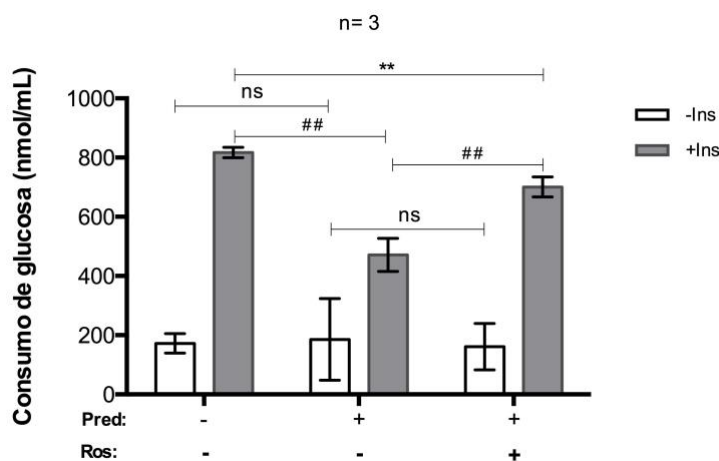


Figura 18. Efecto de rosiglitazona sobre el consumo de glucosa en células con insulino resistencia inducida por prednisolona. Células adiposas 3T3-L1 diferenciadas por 7 días fueron tratadas con diferentes agentes farmacológicos durante 48 h según se indica en el eje x de la figura. Pred: prednisolona 100 μ M; Ros: rosiglitazona 100 μ M. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento farmacológico, se evaluó el consumo basal (-Ins) o estimulado por insulina 100 nM (+Ins) a los 240 min de incubación. Se representa el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por cuadruplicado. ns $p > 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.0001$.

5.5. Análisis proteómico

Con el fin de acercarnos a caracterizar desde el punto de vista molecular nuestro modelo de resistencia a la insulina inducida por prednisolona, se decidió realizar un análisis de proteómica cuantitativa.

Para ello, células 3T3-L1 fueron sembradas y diferenciadas en placas de 6 pozos y luego diferenciadas por 7 días de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se trabajó con 2 grupos experimentales, cada uno con tres réplicas: grupo control (vehículo) y grupo prednisolona (expuesto a prednisolona 100 μM por 48 h). Cumplido el tiempo de tratamiento se extrajo proteína total de nuestras células mediante un protocolo que utilizó metanol/agua/cloroformo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. La proteína total extraída se visualizó en un gel SDS-PAGE al 12.5% como se muestra en la figura 19. La concentración de proteína total obtenida fue de $500.6 \pm 46.9 \mu\text{g}$ para el control (n=3) y $462.5 \pm 25.1 \mu\text{g}$ para la condición tratada con prednisolona 100 μM durante 48 h (n=3).

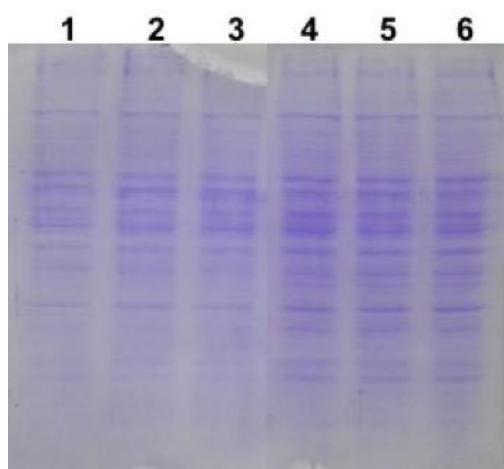


Figura 19. Análisis electroforético de la proteína total obtenida a partir de células adiposas 3T3-L1. El análisis se realizó mediante SDS-PAGE al 12.5% teñido con azul de Coomassie. Se trabajó con dos condiciones experimentales, cada una por triplicado: control (carriles 1-3) y prednisolona (carriles 4-6). En cada carril electroforético se cargó igual volumen de muestra, lo que significó de 8.4 a 9.1 μg de proteína total por carril.

A continuación, las seis muestras de proteína total (3 réplicas de cada grupo experimental) fueron enviadas al exterior para el análisis de proteómica cuantitativa *label free*.

Como ejemplo representativo de los resultados obtenidos, en el anexo 2 se presenta uno de los espectros de masas del análisis de proteómica, el cual corresponde al péptido MGGGFSGK de la proteína xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH) con una relación masa/carga (m/z) de 355.6681.

El análisis proteómico permitió identificar un total de 2044 sets de proteínas, que corresponden a entradas de proteínas con péptidos compartidos, los cuales finalmente representaron a 742 proteínas de nuestras células adiposas.

Se encontró que 76 proteínas se expresaron diferencialmente en el grupo tratado con prednisolona comparado con el grupo control ($p\text{-value} \leq 0.05$ y $\text{fold change} \geq 1.25$). De estas, 56 proteínas (74%) aumentaron su expresión 1.25 o más veces, 19 proteínas aumentaron su expresión 2 o más veces, y solo 3 aumentaron su expresión de 3 a 5 veces (Tabla 10).

Las proteínas que cambiaron en mayor medida fueron: ATP5H (5.1 veces), SAMM50 (4.2 veces) y KBP5 (3.1 veces).

Tabla 10. Proteínas con expresión aumentada en respuesta al tratamiento con prednisolona.

	ID UniProt	Nombre proteína	Fold change	p-value
1	AAH81431.1	ATP synthase subunit d, mitochondrial (ATP5H)	5.1	0.00436081
2	AAI19179.1	Sorting and assembly machinery component 50 homolog (SAMM50)	4.2	0.03476338
3	AAA86983.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (FKBP5)	3.1	0.03435165
4	AAH18371.1	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial (ACSF2)	2.7	0.03975720
5	CAA44705.1	Xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH)	2.7	0.00509246
6	AAB84224.1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (ECH1)	2.5	0.00987274
7	AAH86668.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH)	2.4	0.01198921
8	AAA37264.1	Aspartate aminotransferase, mitochondrial (GOT2)	2.3	0.00497452
9	AAH05460.1	Nucleolin (NCL)	2.3	0.00049247
10	AAH93481.1	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (PRP8)	2.3	0.04163219
11	AAH44781.1	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 (PNPLA2)	2.3	0.00028155
12	AAH13554.1	Citrate synthase, mitochondrial (CS)	2.2	0.00052943
13	AAC53267.1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (STIP1)	2.1	0.0165102
14	AAB62926.1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACOX1)	2.1	0.04359428
15	BAB23678.1	RNA-binding protein 14 (RBM14)	2.1	0.03358771
16	AAI38319.1	Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4)	2.0	0.02131784
17	AAH49956.1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (IDH3A)	2.0	0.04516455
18	AAN85210.1	Lon protease homolog, mitochondrial (LONP1)	2.0	0.0003668
19	AAH21763.1	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial (ACOT9)	2.0	0.00949327

Tabla 10 (continuación). Proteínas cuya expresión aumenta en respuesta al tratamiento con prednisolona.

ID UniProt	Nombre proteína	Fold change	p-value	
20	P02769	Serum albumin (ALB)	1.9	1.08E-06
21	AAH23143.2	Gelsolin (GSN)	1.9	0.01224259
22	AAA69911.1	Histone H1.0 (H1F0)	1.9	0.03394472
23	AAH68111.1	Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3)	1.9	0.01451787
24	AAH65173.1	4F2 cell-surface antigen heavy chain (SLC3A2)	1.8	0.00036442
25	AAH08132.1	Eukaryotic initiation factor 4A-III (EIF4A3)	1.8	0.0026878
26	AAH52727.1	Stress-70 protein, mitochondrial (HSPA9)	1.8	0.03232800
27	AAI38938.1	Extended synaptotagmin-2 (ESYT2)	1.8	0.00927235
28	AAA40556.1	Vimentin (VIM)	1.7	0.00690607
29	AAH25077.1	60S ribosomal protein L11 (RPL11)	1.7	0.04943754
30	AAA53068.1	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1)	1.7	0.01964663
31	AAH12241.1	ATP synthase subunit O, mitochondrial (ATP5PO)	1.7	0.04540205
32	AAA76733.1	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (ACADM)	1.7	0.02509683
33	AAA39906.1	Protein disulfide-isomerase (P4HB)	1.7	0.01970295
34	AAH54531.1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (ATP2A2)	1.7	0.01587586
35	AAH57096.1	Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (TOMM70)	1.7	0.0219172
36	AAH15302.1	Prelamin-A/C (LMNA)	1.7	0.00092585
37	AAF65544.1	Hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1)	1.6	0.00409703
38	AAH03423.1	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (UQCRC2)	1.6	0.02775662
39	AAH03288.1	tRNA-splicing ligase RtcB homolog (RTCB)	1.6	0.04764512
40	AAH22912.1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (TRAP1)	1.6	0.00495714
41	AAA52193.1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 (ACSL1)	1.6	0.00145218
42	AAH52724.1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GLUD1)	1.5	0.01372425
43	AAC52410.1	V-type proton ATPase catalytic subunit A (ATP6V1A)	1.5	0.04371630
44	AAA82599.1	Caprin-1 (CAPRIN1)	1.5	0.04087212
45	AAA40499.1	Tubulin alpha-1A chain (TUBA1A)	1.5	0.03172262
46	AAA37271.1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5F1A)	1.5	0.00182246
47	BAB23646.1	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (ACADSB)	1.5	0.00363241
48	BAB27423.1	60S ribosomal protein L17 (RPL17)	1.5	0.02254285
49	AAA37373.1	Catalase (CAT)	1.4	0.01981235
50	AAC09296.1	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 (NMT1)	1.4	0.04380618
51	AAH09007.1	T-complex protein 1 subunit theta (CCT8)	1.4	0.04122105
52	AAA19689.1	Src substrate cortactin (CCTN)	1.4	0.04060520
53	AAH19512.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHB)	1.4	0.02609766
54	AAC36005.1	Prohibitin-2 (PHB2)	1.3	0.04824162
55	AAH05607.1	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein (DCAKD)	1.3	0.03584991
56	AAH08527.1	Phosphoglucomutase-1 (PGM1)	1.3	0.00182161

Las células fueron incubadas ya sea con el vehículo del fármaco (control) o con prednisolona 100 μ M por los 48 h y posteriormente se aisló la fracción de proteína total para los análisis de proteómica *label free* de acuerdo a lo descrito en metodología.

ID UniProt: número de identificación en la base de datos UniProt.

Fold change: tasa de cambio para la comparación control vs. prednisolona.

p-value: valores de p de la comparación control vs prednisolona.

La figura 20 presenta la distribución de los valores de cambio (*fold change*) para las proteínas que aumentaron su expresión 1.25 o más veces.

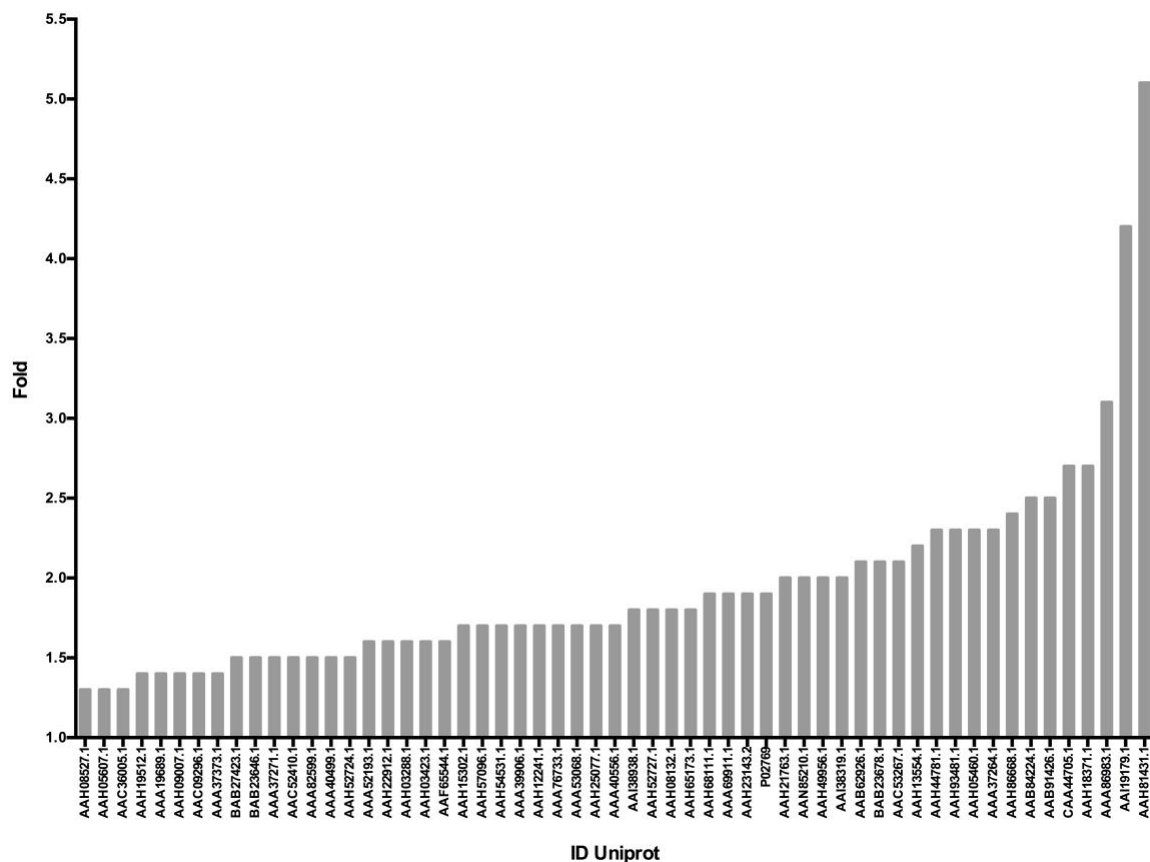


Figura 20. Distribución de los valores de cambio (*fold change*) para proteínas cuya expresión aumenta en respuesta al tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con prednisolona 100 μM por 48 h.

Por otra parte, también se identificaron proteínas cuya expresión disminuyó significativamente en respuesta al tratamiento con prednisolona comparado con la condición control. En efecto, del total de 76 proteínas que fueron expresadas diferencialmente ($p\text{-value} \leq 0.05$ y $\text{fold change} \geq 1.25$), 20 proteínas (26%) disminuyeron su expresión 1.25 o más veces. De estas, 12 proteínas disminuyeron su expresión 2 o más veces y tan solo tres proteínas presentaron una disminución de 3 a 5 veces. Estas tres proteínas fueron C3 (5.1 veces), SCD2 (3.7 veces) y GPD1 (3.0 veces) (Tabla 11).

Tabla 11. Proteínas cuya expresión disminuye en respuesta al tratamiento con prednisolona..

ID Uniprot	Nombre proteína	Fold change	p-value
1 AAA37336.1	Complement C3 (C3)	-5.1	4.51E-06
2 AAA40094.1	Acyl-CoA desaturase 2 (SCD2)	-3.7	0.01154329
3 AAA37726.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic (GPD1)	-3.0	9.61E-07
4 AAH23908.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3/A4 (HNRNPA3)	-2.9	0.04545393
5 AAC52163.1	Hormone-sensitive lipase (LIPE)	-2.3	0.01648285
6 AAH11482.1	Extended synaptotagmin-1 (ESYT1)	-2.3	0.00457969
7 AAH16400.1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	-2.3	0.02686411
8 D38379	Pyruvate kinase (PKM)	-2.0	0.00764567
9 AAG02285.1	Fatty acid synthase (FASN)	-2.0	0.00031097
10 AAA37210.2	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)	-2.0	0.00117537
11 AAH08129.1	14-3-3 protein gamma (YWHAG)	-2.0	0.00741347
12 AAA70267.1	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	-2.0	0.00403003
13 AF064748	Perilipin 4 (PLIN4)	-1.8	0.00031208
14 AAA37659.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	-1.7	0.00310412
15 AAH04760.1	NADH-cytochrome b5 reductase 3 (CYB5R3)	-1.6	0.02949294
16 AAH46755.1	L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB)	-1.5	0.0115795
17 AAC42040.1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)	-1.4	0.03902359
18 AAH17522.1	Small ubiquitin-related modifier 2 (SUMO2)	-1.3	0.01810397
19 AAH17541.1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme (GBE1)	-1.3	0.00105915
20 AAC53588.1	Caveolae-associated protein 1 (CAVIN1)	-1.3	0.01498523

Las células fueron incubadas ya sea con el vehículo del fármaco (control) o con prednisolona 100 μ M por los 48 h y posteriormente se aisló la fracción de proteína total para los análisis de proteómica *label free* de acuerdo a lo descrito en metodología.

ID UniProt: número de identificación en la base de datos UniProt.

Fold change: tasa de cambio para la comparación control vs. prednisolona.

p-value: valores de *p* de la comparación control vs prednisolona.

La figura 21, por su parte, muestra la distribución de la magnitud del cambio (*fold change*) para las proteínas que disminuyeron su expresión.

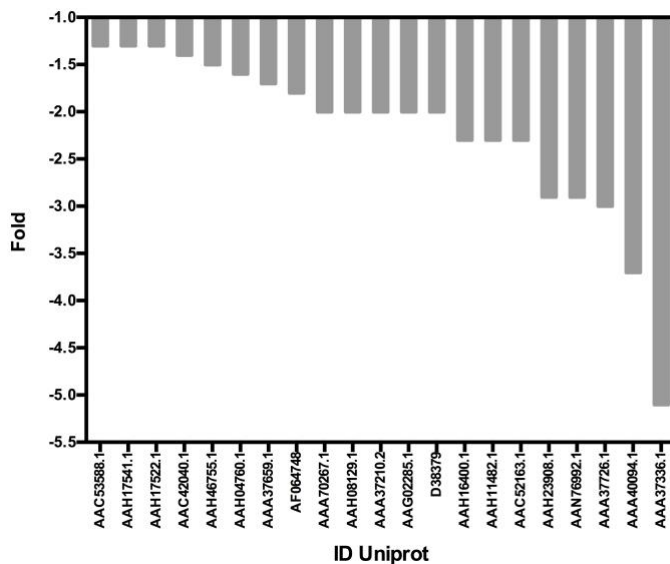


Figura 21. Distribución de los valores de cambio (*fold change*) para proteínas cuya expresión disminuye en respuesta al tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con prednisolona 100 µM por 48 h.

A continuación, los resultados de los estudios de proteómica cuantitativa *label free* fueron posteriormente analizados utilizando el sistema PANTHER con el fin de clasificar las diferentes proteínas (y sus genes) de acuerdo al recurso de ontología génica (GO). Este recurso es una iniciativa bioinformática que pretende desarrollar un modelo completo y computacional de los sistemas biológicos y para ello cataloga las proteínas de acuerdo a 3 tipos de anotaciones: (i) componente celular, el cual se refiere a la localización celular en la que son activos los productos génicos (ii) función molecular, que corresponde a la actividad molecular de producto génico y (iii) proceso biológico, que hace referencia a las rutas o procesos más grandes a los cuales contribuye la actividad del producto génico (110).

La figura 22 muestra los resultados de anotaciones de GO para el componente celular de las proteínas diferencialmente expresadas en el estado de resistencia a la insulina en nuestro estudio. Excluyendo la anotación célula (GO:0005623), se observa que las proteínas están relacionadas en mayor medida con la anotación organelo (GO:0043226) (13 proteínas, 25.5%), seguido de complejos que contienen proteínas (GO:0032991) (6 proteínas, 11.8%) y membrana (GO:0016020) (3 proteínas, 5.9%).

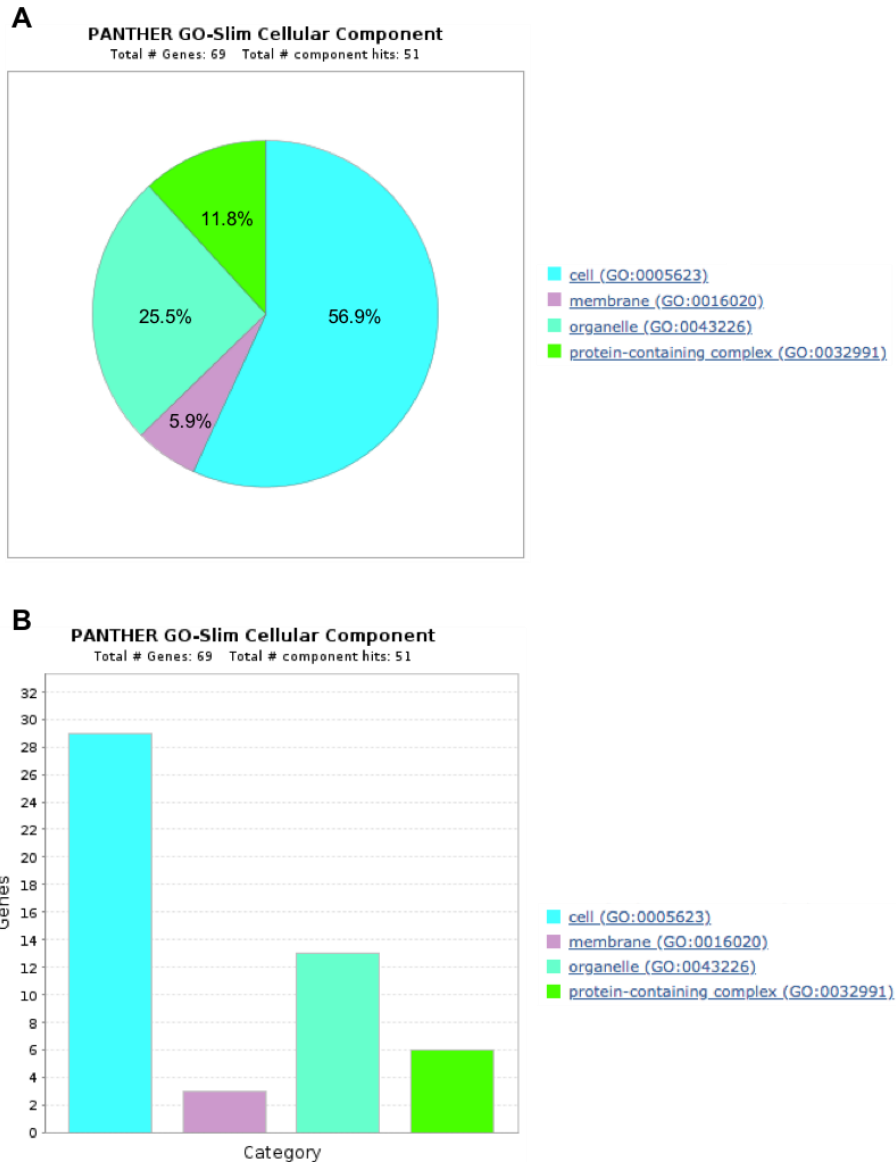


Figura 22. Análisis de GO del componente celular de todas las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulina resistencia en adipocitos 3T3-L1. (A) gráfica circular representativa del porcentaje de proteínas en cada componente celular (B) gráfica de barras representativa del número total de proteínas en cada componente celular.

En la figura 23 se observan los resultados de anotaciones de GO para las funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en nuestro estudio. Estas proteínas resultaron tener principalmente función catalítica (GO:0003824) (30 proteínas, 45.5%) o de unión (GO:0005488) (23 proteínas, 34.8%). En menor medida se identificaron proteínas con función de transportador (GO:0005215) (6 proteínas, 9.1%), estructural (GO:0005198) (4 proteínas, 6.1%), reguladores transcripcionales (GO:0140110) (2

proteínas, 3.0%) o reguladores de la función de otras proteínas (GO:0098772) (1 proteína, 1.5%).

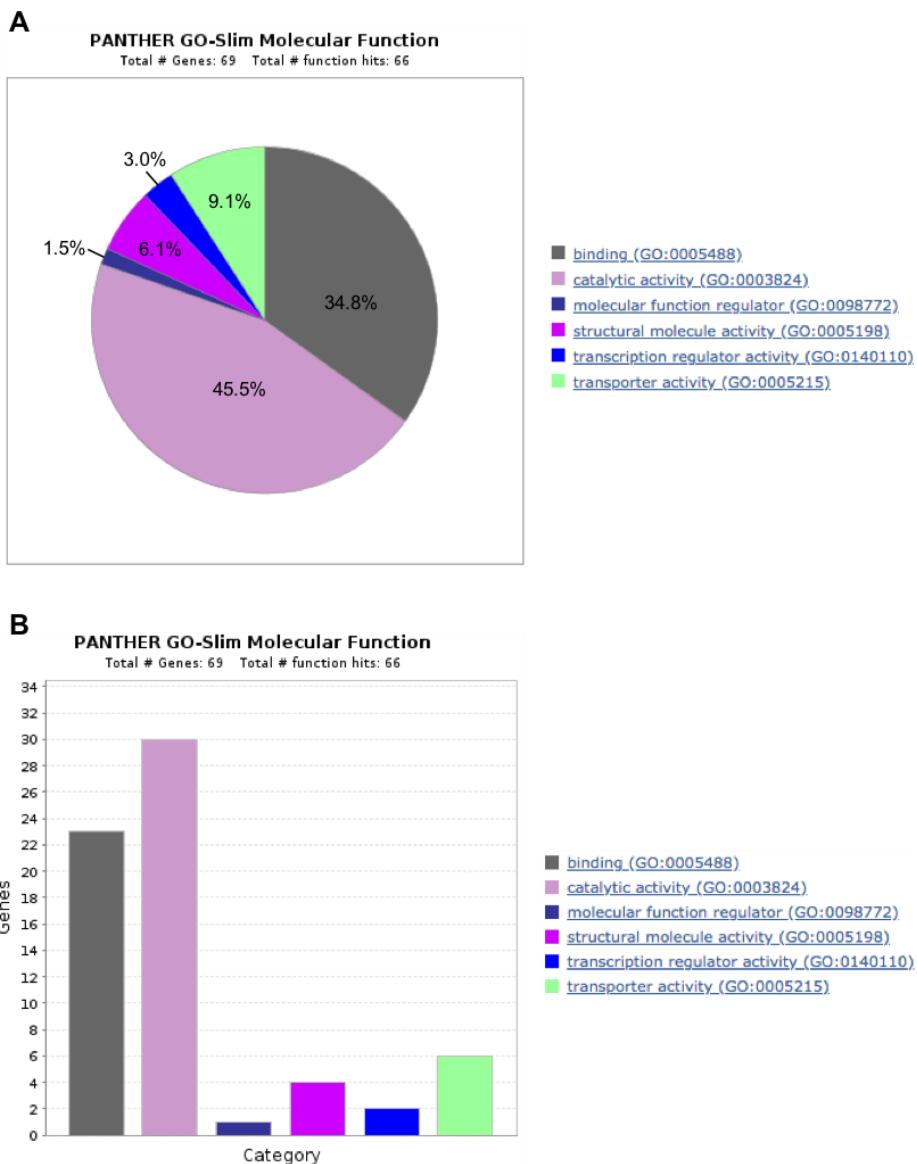


Figura 23. Análisis de GO de la función molecular de las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1. (A) gráfica circular representativa del porcentaje de proteínas para cada función molecular (B) gráfica de barras representativa del número total de proteínas para cada función molecular.

Por último, en la figura 24 se observan los resultados de anotaciones de GO para los procesos biológicos de las proteínas expresadas diferencialmente producto de la inducción de resistencia en nuestro modelo experimental. Excluyendo la anotación proceso celular,

las proteínas implicadas en procesos metabólicos (GO:0008152) (26 proteínas, 32.9%) resultaron ser las más afectadas por el tratamiento con prednisona, mientras que las relacionadas con procesos regulatorios (GO:0065007) (10 proteínas, 12.7%), respuesta a estímulos (GO:0050896) (7 proteínas, 8.9%), localización (GO:0051179) (4 proteínas, 5.1%), procesos del sistema inmune (GO:0002376) (2 proteínas, 5.1%) y organización de componentes celulares o biogénesis (GO:0071840) (1 proteína, 1.3%) fueron afectadas en menor medida.

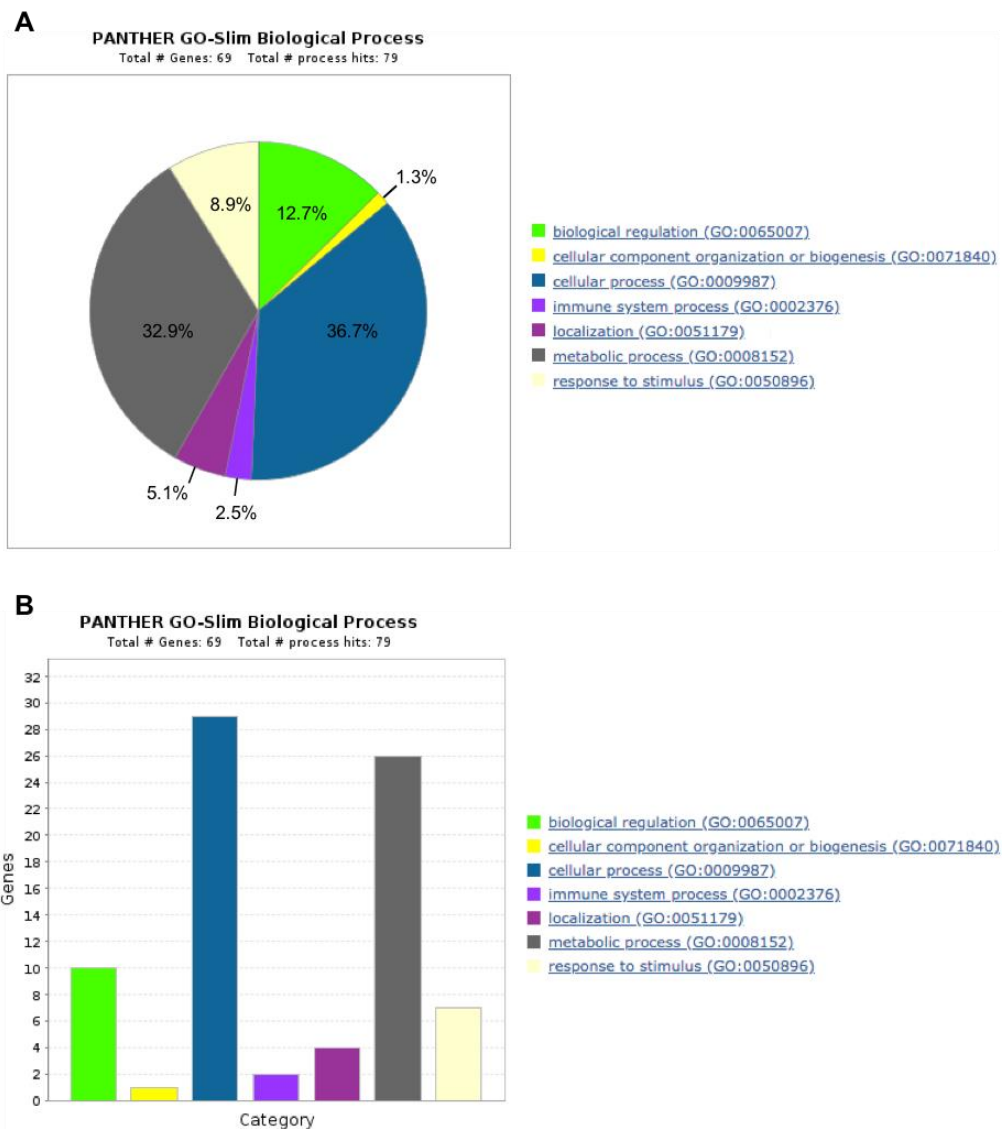


Figura 24. Análisis de GO del proceso biológico de las proteínas expresadas diferencialmente en el estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1. (A) gráfica circular representativa del porcentaje de proteínas para cada proceso biológico (B) gráfica de barras representativa del número total de proteínas para cada proceso biológico.

De acuerdo a los análisis de GO, tenemos que las proteínas expresadas diferencialmente en nuestro modelo celular de resistencia a la insulina inducido por prednisolona se localizan principalmente a nivel de los organelos subcelulares, en su mayoría presentan actividades de catalítica, y de unión y se relacionan fundamentalmente con procesos metabólicos y regulatorios.

6. Discusión

Modelo de células adiposas 3T3-L1

El estudio presentado en este documento se llevó a cabo con la línea celular 3T3-L1, una línea de fibroblastos embrionarios de ratón, la cual está comprometida a diferenciarse a adipocitos maduros. Esta línea celular se encuentra bien establecida y caracterizada, y es ampliamente utilizada como modelo de estudio. De hecho, cerca de un tercio de los artículos publicados entre 2011 y 2016 reportan el uso de células 3T3-L1 para el estudio de adipogénesis y aspectos relacionados con metabolismo y obesidad (111).

La diferenciación de las células 3T3-L1 desde su fenotipo tipo fibroblasto a adipocitos maduros requiere el tratamiento con un coctel de agentes adipogénicos que incluyen insulina, dexametasona e IBMX (112,113). Previamente en nuestro grupo de investigación se implementó el modelo de adipogénesis *in vitro* utilizando la línea de células 3T3-L1 y se estandarizaron las condiciones de diferenciación a adipocitos (22–25). En el presente trabajo se incluyó rosiglitazona en el coctel de diferenciación pues se ha reportado que potencia la adipogénesis e induce un alto grado de acumulación de gotas lipídicas en comparación con protocolos de diferenciación que carecen de rosiglitazona (114,115).

Bajo nuestras condiciones de diferenciación, las células 3T3-L1 presentaron cambios fenotípicos característicos del proceso de diferenciación: aumento del tamaño celular, adquisición de una forma esférica o redondeada, y acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas que fueron visualizadas por tinción con *Oil Red O* (Figuras 4 a 6). Todos estos cambios se observaron a partir del día 4 de diferenciación y resultaron ser más evidentes en el día 7 a 8, lo que se asocia con la conversión a un fenotipo propio de las células adiposas maduras, confirmando así que efectivamente este trabajo se llevó a cabo con células adiposas maduras (115,116).

Evaluación del consumo de glucosa de las células adiposas 3T3-L1

La glucosa es una importante fuente de energía para las células, y el estudio de los procesos de transporte y consumo celular de glucosa se constituyen en un tema fundamental de las ciencias biológicas y biomédicas. Su importancia queda de manifiesto en situaciones patológicas tales como la diabetes mellitus, en donde la disminución en el consumo celular de glucosa por diversos mecanismos lleva a una hiperglicemia y a todas las consecuencias derivadas de ella. Los bioensayos para valorar el transporte y consumo de glucosa representan una herramienta valiosa para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial farmacológico antidiabético.

Las técnicas más comunmente empleadas para el estudio del transporte y consumo de glucosa se fundamentan en el uso de análogos de glucosa radiactivos y, más recientemente, de análogos fluorescentes. En el primer caso, se utilizan análogos de glucosa radiomarcados tales como [^{14}C]-2-deoxiglucosa y [^3H]-2-deoxiglucosa, los cuales producen una mejor relación señal/ruido y mayor especificidad que los análogos fluorescentes, y el consumo de glucosa puede valorarse en pocos minutos (20,21). Sin embargo, los materiales radiactivos requieren de instalaciones con áreas controladas y supervisadas conforme a la regulaciones establecidas y el personal debe ser capacitado para la manipulación de este tipo de reactivos, lo que dificulta mucho el proceso en nuestro país, todo esto sin considerar el riesgo biológico al que se expone el operador o el investigador, y la contaminación ambiental que ello implica. Por otra parte, las técnicas fluorescentes utilizan análogos como 2- o 6-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa (2- o 6-NBDG) que pueden ser utilizados en ensayos en microplacas, con citometría de flujo o con microscopios de fluorescencia, y son una alternativa interesante de cuantificación directa del consumo de glucosa. Con el uso de análogos fluorescentes se requieren tiempos mayores de análisis (entre 20 y 30 minutos) (20,21). Una desventaja de estos métodos es que los equipos necesarios para evaluar el consumo de glucosa son costosos y no fácilmente accesibles para un laboratorio de rutina y para un medio como el nuestro, donde conseguir recursos para investigación es cada vez más difícil.

Con base en lo anterior, nuestro grupo recientemente sondeó de manera preliminar la posibilidad de usar un ensayo colorimétrico para cuantificar el consumo de glucosa en

células adiposas 3T3-L1, encontrando que era posible aplicar de manera exitosa un ensayo para medir glucosa extracelular y, por diferencia, calcular el consumo de glucosa por parte de las células. Dicho ensayo presentaría como ventaja su sencillez y bajo costo (25). El presente trabajo representa la continuación de dicho estudio preliminar, pretendiendo ir más allá: por una parte, se buscaba optimizar las condiciones del bioensayo de cuantificar consumo de glucosa; por otro lado, buscaba emplear el bioensayo para evaluar agentes inductores de resistencia a la insulina y, finalmente, intentaba proyectar tales resultados hacia la identificación de blancos moleculares implicados en el mecanismo de resistencia a la insulina inducida por fármacos.

Los métodos analíticos se caracterizan por ciertos parámetros específicos tales como exactitud, precisión, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), etc, los cuales están estrechamente relacionados con la calidad del método. El LOD y LOQ son parámetros de gran importancia ya que describen la menor concentración de analito que puede ser detectada y cuantificada de manera confiable por el método, algo de vital importancia al momento de reportar los resultados, además de ser un requisito de las autoridades reguladoras a nivel mundial (88,89). Existen diferentes métodos que permiten calcular los parámetros de calidad de los métodos analíticos, específicamente LOD y LOQ; en el presente trabajo se utilizó como referencia lo descrito por la Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH) en su documento “validación de procedimientos analíticos: texto y metodología” (117).

En las curvas de calibración realizadas para la determinación de los parámetros analíticos del método se pudo observar la respuesta lineal en casi todo el rango de concentraciones de glucosa evaluadas (entre 0 y 5549.4 nmol/mL) con un r_2 de 0.9959 (Figura 7). Además, se determinó un LOD de 132.5 nmol/mL, un valor aproximado al reportado por el fabricante para este método (155 nmol/mL), mientras que se obtuvo un LOQ de 401.5 nmol/mL. Con esto presente, todas las mediciones posteriores en este trabajo fueron realizadas por encima de los valores de LOD y LOQ determinados, garantizando así la calidad de nuestros resultados.

Con los parámetros analíticos establecidos, se estandarizaron las condiciones del bioensayo para cuantificar consumo de glucosa, tanto basal como bajo estímulo con insulina. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa inicial (1.4, 2.8 y

5.5 mM) y diferentes tiempos de tratamiento (entre 0 y 480 minutos), observándose un claro aumento del consumo de glucosa en función del tiempo, el cual fue mayor al estimular con la hormona (comparado con el basal), tal y como se esperaba. Con base en esto, se determinaron dos posibles condiciones experimentales para cuantificar de manera reproducible el consumo de glucosa con este bioensayo enzimático-colorimétrico. Una de ellas es usar 5.5 mM de glucosa inicial, y estimular con insulina 100 nM durante 120 min. Bajo esta condición, se observó un consumo basal de glucosa de 372 nmol/mL y un consumo estimulado por insulina de 928 nmol/mL; en esta condición el estímulo con insulina incrementó el consumo 2.5 veces respecto al basal y la diferencia resultó ser estadísticamente significativa respecto del consumo basal ($p \leq 0.01$, Figura 8A y Tabla 2). Estos valores correspondieron a un consumo de 6.7% y 16.7% del total de la glucosa presente en el medio de cultivo en el estado basal y el estimulado, respectivamente. La segunda condición posible de utilizar fue: 1.4 mM de glucosa inicial, y estimulación con insulina 100 nM durante 240 min. Bajo esta condición, observamos un consumo de glucosa basal de 514 nmol/mL y un consumo estimulado de 771 nmol/mL. Así, el estímulo con insulina aumentó el consumo de glucosa 1.5 veces con respecto al consumo basal, un cambio estadísticamente significativo ($p \leq 0.01$, Figura 8C y Tabla 2) y que se reprodujo rutinariamente en todos los ensayos posteriores, incluso con cambios mayores de hasta 5 veces. Estos valores de consumo correspondieron a 37% y 55.6% respectivamente, del total de la glucosa inicial presente en el medio. Todos los experimentos posteriores fueron llevados a cabo bajo esta última condición experimental.

Un resultado interesante de nuestro estudio fue observar la relación lineal entre el consumo de glucosa y el tiempo de incubación hasta los 240 minutos que evaluamos, lo que es característico para el método radiactivo evaluando a tiempos de incubación menores (hasta 30 min). Esta respuesta lineal nos permitió calcular los parámetros cinéticos para el proceso de consumo de glucosa, esto es, los valores de velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y constante de consumo del proceso (K). Observamos una $V_{m\acute{a}x}$ de 5.9 nmol/ml/min en condiciones basales, y de 4.1 nmol/ml/min al estimular con insulina; por su parte, y la constante K fue de 1.1 mM en ambas condiciones. Así, el consumo de glucosa estimulado por insulina en nuestro modelo incrementa con respecto al basal debido a un aumento de 1.4 veces la $V_{m\acute{a}x}$, sin que se afecte el valor de K . Este resultado coincide con lo observado por otros autores quienes empleando métodos radiactivos y tiempos menores de incubación (hasta 30 min), han reportado que la insulina aumenta la $V_{m\acute{a}x}$ del transporte de

glucosa entre 2 y 4 veces sin afectar la constante K , lo cual ha sido observado tanto en adipocitos como en células musculares (118–120). Al comparar nuestros datos con los de otros autores trabajando con adipocitos y el método radiactivo, observamos que los valores de K están dentro del mismo orden magnitud (2-7 mM); no pudimos comparar los valores de $V_{m\acute{a}x}$ porque son reportados en diferentes unidades.

Se sabe que la velocidad de consumo de glucosa, tanto basal como estimulada por insulina, está limitada por la disponibilidad de transportadores de glucosa en la superficie de las células adiposas, GLUT1 en el caso del transporte basal y GLUT4 para el estimulado, y diferentes estudios llevados a cabo con el método radiactivo han demostrado que el transporte de glucosa es la etapa limitante del proceso (121–123).

El proceso de consumo de glucosa depende de dos etapas: transporte al interior celular, y posterior metabolismo del azúcar. Al utilizar glucosa metabolizable, con nuestro bioensayo estamos cuantificando un consumo que representa el resultado de ambas (transporte y metabolismo) por lo cual los parámetros cinéticos evaluados son valores aparentes que involucran las constantes de estos dos procesos individuales. El hecho de haber observado parámetros similares a los reportados por otros autores usando análogos radiactivos de glucosa no hidrolizables, sugiere que bajo nuestras condiciones el consumo de glucosa observado estaría limitado también por la etapa de transporte. La coincidencia de nuestros resultados con los de autores que han empleado el método radiactivo clásico, de alguna manera valida nuestro bioensayo colorimétrico y nos permite proponerlo como una alternativa sencilla y de bajo costo a los métodos clásicos disponibles para el estudio del transporte de glucosa.

Recientemente, y paralelo al desarrollo de nuestro trabajo, Sigma-Aldrich® comenzó a comercializar un kit para la determinación colorimétrica del consumo de glucosa que puede ser utilizado en una gran variedad de células y que se basa en la cuantificación de TNB (5-tio-2-nitro-benzoato) producido a partir de una serie de reacciones enzimáticas que parten del análogo 2-deoxiglucosa (2-DG). Este ensayo tiene como ventaja un menor tiempo de incubación de la muestra con el análogo (20 minutos), pero requiere pasos adicionales de lisado celular y reacciones enzimáticas posteriores a la incubación, los cuales aumentan el tiempo total del ensayo (124).

En el estudio preliminar de nuestro grupo de investigación (25) no observamos cambios significativos en la glucosa extracelular bajo condiciones basales en todo el rango de tiempos estudiados (0-16 horas), y la respuesta inducida por insulina mostró un comportamiento bifásico en función del tiempo de incubación. En respuesta a insulina se observó una primera fase de disminución leve de la glucosa extracelular (20 a 30% entre 0.5 y 8 h) y una segunda fase con un máximo de reducción entre 54 y 66% a 12 y 16 horas, respectivamente. Las discordancias respecto a este trabajo, donde se observa una respuesta lineal en el tiempo, podrían deberse a diferentes razones: (i) en el estudio preliminar se utilizó una concentración de glucosa inicial de 200 mg/dL que es mucho mayor que la usada en el presente trabajo. (ii) Los tiempos de tratamiento no fueron los mismos estudiados previamente. (iii) En el presente trabajo se utilizó un lote diferente de la línea celular 3T3-L1 pudiendo existir variaciones significativas entre diferentes lotes o cepas de la misma línea celular. De hecho, un estudio publicado recientemente reporta que diferentes cepas de la misma línea celular cancerígena (MCF7) presentaron respuestas variables frente al tratamiento con compuestos anticancerígenos (125). Estas diferencias fueron atribuidas a una rápida evolución favorecida por las condiciones del cultivo celular. Este entonces es un escenario probable para la explicación de nuestros resultados. Lamentablemente, no poseemos células de nuestro lote anterior para confirmar esta hipótesis.

Empleando nuestro bioensayo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la concentración de insulina sobre el consumo de glucosa, trabajando a las condiciones optimizadas ya descritas (1.4 mM de glucosa inicial y 240 minutos de estimulación), se observó una respuesta sigmoidal, característica de las curvas concentración-respuesta, con una EC_{50} calculada en 18.4 nM cuyo valor está en el mismo rango de valores descrito por otros autores: 1.4, 1.7, 28.6 nM, por citar algunos (126–128) usando adipocitos 3T3-L1 y adipocitos primarios aislados de ratón. Además, observamos un efecto máximo a concentraciones iguales o superiores a 50 nM, confirmando así que bajo las condiciones optimizadas, el estímulo con insulina 100 nM nos garantiza trabajar en la zona del efecto máximo de la hormona sobre el consumo de glucosa. Otros autores también han utilizado concentraciones de insulina iguales o cercanas a 100 nM para realizar el estímulo en cultivos de adipocitos (12,129,130).

Con base en lo anterior, nuestro bioensayo de consumo de glucosa presenta características comparables al bioensayo radiactivo tradicional usado en este campo.

Efecto de fármacos inductores de resistencia a la insulina sobre el consumo de glucosa

Con las condiciones del bioensayo establecidas, se procedió a evaluar en nuestro modelo celular el efecto de diferentes fármacos que se han relacionado con resistencia a la insulina.

El primer fármaco evaluado fue indinavir, que es un antiretroviral. El tratamiento con indinavir 100 μM durante 24 y 48 horas no mostró efectos significativos sobre el consumo de glucosa basal ni tampoco sobre el consumo estimulado por insulina. En este sentido, nuestros resultados no coinciden con lo reportado previamente por otros autores, ya que para este fármaco se ha observado que a concentraciones entre 50 y 200 μM y tiempos de tratamiento de máximo 1 hora, disminuye significativamente el consumo de glucosa basal y también el consumo estimulado por insulina en diferentes modelos de estudio, entre ellos adipocitos 3T3-L1 y adipocitos primarios de rata y ratón (70,90,131).

Sorprendentemente observamos que indinavir aumentó significativamente el consumo de glucosa basal y estimulado a 48 h de tratamiento respecto del tiempo cero. Quizá este efecto está apantallando la potencial inducción de resistencia a la insulina observada por otros autores.

Otro fármaco que evaluamos fue olanzapina. El tratamiento de los adipocitos 3T3-L1 con olanzapina 100 μM durante 24 y 48 horas no tuvo efectos significativos sobre el consumo de glucosa estimulado por insulina. Sorprendentemente, el consumo basal presentó un aumento significativo como consecuencia de la exposición a este fármaco.

Olanzapina, un antipsicótico de segunda generación, a menudo ha sido relacionado clínicamente con alteraciones en el metabolismo de glucosa y con resistencia a la insulina. En efecto, se ha descrito que la exposición a este agente en dosis entre 4 y 8 mg/kg durante tiempos variables (desde 30 días hasta 8 semanas) ha favorecido el desarrollo de resistencia a la insulina en modelos animales, principalmente ratas y ratones; además, estudios *in vitro* con adipocitos 3T3-L1 han mostrado que el tratamiento con olanzapina 10 μM durante 15 horas disminuye el transporte de glucosa estimulado por insulina en un 30% respecto del control sin tratar, efecto que se mantuvo hasta las 72 horas de tratamiento (73,132–134).

Sin embargo, a pesar de que nuestros datos con olanzapina no coinciden en cuanto a observar resistencia a la insulina, si estuvieron de acuerdo con los reportes de otros autores quienes han observado también un aumento en el consumo basal de glucosa producto del tratamiento con olanzapina 100 μM en adipocitos 3T3-L1 (91). Todavía más, estos y otros autores trabajando con células adiposas 3T3-L1 no observaron cambios en el consumo de glucosa estimulado por insulina al usar diferentes concentraciones de olanzapina (0.07 a 100 μM) (91,135).

Así y con base a lo observado por nosotros y otros autores, concluimos que existen datos discrepantes en la literatura en relación al efecto de olanzapina sobre el consumo de glucosa; y es un campo abierto sobre el cual nuevos estudios enfocados en el papel de olanzapina en la resistencia a la insulina, pues las evidencias hasta ahora parecen ser contradictorias.

Otro compuesto evaluado fue peróxido de hidrógeno. Nuestros resultados no mostraron ningún efecto sobre el consumo de glucosa basal ni tampoco sobre el consumo estimulado por insulina al tratar nuestros adipocitos 3T3-L1 con H_2O_2 100 μM por 24 y 48 h. El efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo H_2O_2 , y del estrés oxidativo en el desarrollo de resistencia a la insulina ha sido reportado en diversos modelos celulares, incluyendo células adiposas 3T3-L1 y células musculares. En efecto, otros autores han observado que el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con H_2O_2 (12 y 200 μM) por hasta 48 horas disminuye considerablemente el consumo de glucosa estimulado por insulina (136–138). Así, nuestros resultados no coincidieron con lo reportado previamente por tales autores.

Las discrepancias entre nuestros resultados y lo reportado por otros podría deberse a la necesidad de evaluar otras concentraciones y tiempos de tratamiento. Una segunda posibilidad es la hipotética variabilidad lote a lote o entre diferentes cepas de la línea celular (discutido previamente). Pensamos que esta es quizás la posibilidad más plausible porque con otros fármacos evaluados (glucocorticoides) si observamos los resultados esperados.

En cuanto al efecto de los glucocorticoides, el tratamiento con dexametasona 10 μM resultó en una disminución significativa del consumo de glucosa basal y estimulado a 24 y 48 h. La disminución neta (estimulado - basal) fue de 61 nmol/mL a 24 h y de 99 nmol/mL a 48 h. Estos datos confirmarían que la disminución del consumo en respuesta al estímulo con

insulina no es completamente explicada por la caída en el consumo basal, evidenciando un claro efecto de insulino resistencia inducido por el glucocorticoide.

Previamente nuestro grupo de investigación reportó el desarrollo de resistencia a la insulina en un modelo de adipocito 3T3-L1 como consecuencia del tratamiento con diferentes concentraciones de dexametasona (10, 100 y 1000 nM) durante 48 horas (25), lo que concuerda con lo observado en el presente trabajo. Los glucocorticoides son conocidos, entre otras razones, porque favorecen el desarrollo de resistencia a la insulina en humanos y en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, para dexametasona se ha descrito ampliamente su relación con alteraciones en el consumo de glucosa y de la señalización de insulina (12,13). Se ha reportado que el tratamiento con dexametasona (1.0 mg/Kg por 12 días) disminuyó el consumo de glucosa estimulado por insulina en músculo de rata (13). En los modelos de células adiposas 3T3-L1 o 3T3-F442A y también en adipocitos aislados de rata, el consumo tanto basal como estimulado también se vio reducido por dexametasona en un amplio rango de concentraciones (1 nM hasta 1 μ M) y de tiempos de tratamiento (2 horas a 5 días) (11,17,139). De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados de disminución del consumo de glucosa producto del tratamiento con dexametasona coinciden con lo reportado previamente por otros autores, efecto que se puede asociar con el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por este corticoide en nuestro modelo celular.

Por otro lado, al evaluar un segundo glucocorticoide, observamos que el tratamiento con prednisolona 10 μ M también afectó negativamente tanto el consumo basal como estimulado por insulina, análogo a lo observado con dexametasona. En el caso particular de prednisolona, el efecto neto sobre el consumo de glucosa (estimulado – basal) fue de 61 nmol/mL a 48 h, lo que confirma que este glucocorticoide indujo un estado de resistencia a la insulina inducida en nuestro modelo celular.

Prednisolona es un glucocorticoide que ha sido menos estudiado que dexametasona y a nivel clínico también se ha reportado que presenta efectos negativos sobre el metabolismo de la glucosa. A dosis tanto bajas como altas (6 y 30 mg/día) ha sido relacionado con disminución en la sensibilidad a la insulina en pacientes con artritis reumatoide y otras relacionadas (140,141). Adipocitos de rata tratados con con prednisolona 1 μ M durante 1 h mostraron una reducción en el consumo de glucosa estimulado por insulina de aproximadamente un 50% (142). También ha sido reportado que el tratamiento con

prednisolona 1 μM por 48 h muestra un efecto dependiente del tiempo sobre el consumo estimulado por insulina en células adiposas 3T3-L1 (94). Así, nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura en cuanto a la disminución del consumo de glucosa estimulado por insulina producto del tratamiento con prednisolona.

Nuestro estudio constituye la primera evidencia experimental del efecto de prednisolona sobre el consumo de glucosa basal.

En conjunto, los resultados obtenidos con dexametasona y con prednisolona nos permiten concluir que hemos logrado inducir resistencia a la insulina en nuestras células adiposas 3T3-L1 lo que se evaluó a través de la cuantificación de glucosa con un bioensayo colorimétrico.

Un aspecto importante de destacar de nuestro trabajo es el relacionado con el efecto de la insulina sobre el consumo de glucosa. Bajo las condiciones estandarizadas de nuestro bioensayo, insulina incrementó significativamente el consumo de glucosa en todos los ensayos realizados, con incrementos que fluctuaron entre 1.5 y 5.0 veces. Este efecto fue totalmente reproducible como se confirma en todas las evaluaciones farmacológicas realizadas.

Todo lo anteriormente mencionado nos permite proponer un modelo celular de resistencia a la insulina inducida farmacológicamente gracias al tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con glucocorticoides, ya sea dexametasona o prednisolona.

Estos resultados indirectamente validan nuestro bioensayo colorimétrico de cuantificación del consumo de glucosa en este modelo celular, permitiendo incluso determinar los parámetros cinéticos del proceso de consumo (K_t y $V_{m\acute{a}x}$).

Efecto del sensibilizador Rosiglitazona

En este trabajo también se evaluó la respuesta de nuestro modelo celular frente a un sensibilizador a la insulina que ha sido utilizado para el tratamiento de la DMT2 como es rosiglitazona, fármaco perteneciente al grupo de las glitazonas. Se observó que rosiglitazona mejoró el consumo de glucosa en respuesta a insulina en respuesta en el modelo de resistencia inducido por prednisolona.

Rosiglitazona ha mostrado efectos sensibilizadores a la insulina en diferentes modelos experimentales. Por ejemplo, el tratamiento de tejido muscular de ratas Zucker obesas con rosiglitazona (3.67 mg/Kg, dos veces al día y durante 7 días) resultó en un aumento del transporte de glucosa basal y estimulado por insulina (143). Por otra parte, adipocitos 3T3-L1 tratados con rosiglitazona 10 μ M durante 5 días exhibieron un aumento del consumo de glucosa basal y estimulado por insulina (144).

Aunque nosotros no vimos cambios significativos en el consumo basal, nuestros resultados coinciden con lo reportado para el consumo de glucosa estimulado por insulina y el efecto de rosiglitazona se relaciona entonces con una mayor sensibilidad a insulina. Sin embargo a la condición evaluada (rosiglitazona 100 μ M por 48 h) no se logró revertir completamente el efecto de prednisolona.

Todo lo anterior nos permitiría confirmar de manera preliminar la validez del modelo propuesto, y proponerlo a futuro para evaluar moléculas, extractos o fracciones con potencial actividad antidiabética o sensibilizadora a la insulina.

Análisis proteómico

Con el fin de caracterizar a nivel molecular nuestro modelo de resistencia a la insulina inducido por prednisolona, se decidió realizar un análisis de proteómica cuantitativa *label free* con el fin de indagar en los posibles cambios en el perfil proteico que pudieran relacionarse con el estado de insulino resistencia.

Al respecto, se observó que 76 proteínas cambiaron su expresión al menos 1.25 veces en el estado de insulino resistencia por prednisolona comparado con el control (56 proteínas aumentaron y 20 disminuyeron sus niveles de expresión). El análisis de estas proteínas por GO concluyó: (i) que se localizan principalmente a nivel de los organelos celulares, (ii) que presentan mayoritariamente función actividad catalítica y de unión y (iii) que están relacionadas primordialmente con procesos metabólicos.

Respecto a las proteínas que aumentaron su expresión 1.25 o más veces destacamos las siguientes que han sido relacionadas previamente con el desarrollo de resistencia a la insulina:

- Xantina oxidoreductasa (XDH) (aumentó 2.7 veces): en humanos jóvenes se ha observado correlación positiva entre la actividad plasmática de esta enzima y el índice de masa corporal (BMI por sus siglas en inglés) y correlación negativa con la sensibilidad a la insulina, con adiponectina, una adipoquina con efectos sensibilizadores a la insulina. La XDH, en pacientes con DMT2 y síndrome metabólico ha sido directamente relacionada con resistencia a la insulina (145,146). Nuestros resultados de aumento de la expresión de esta proteína, se relacionan directamente con tales observaciones, fortaleciendo la asociación entre XDH y resistencia a la insulina. En nuestro caso, se constituyen en la primera evidencia experimental de su asociación con resistencia a la insulina inducida por prednisolona.
- Citrato sintasa mitocondrial (CS) (aumentó 2.2 veces su expresión): Es una proteína marcadora del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Se ha reportado una menor actividad de esta enzima en tejido muscular de individuos obesos y también en miotubos de pacientes con DMT2 (147,148), situaciones clínicas que se relacionan con resistencia a la insulina. Nuestros resultados muestran un aumento en los niveles de esta enzima lo cual no concuerda con lo observado por otros autores. Por ahora, no tenemos una explicación para esta observación.
- Factor de *splicing* rico en serina/arginina 3 (SRSF3) (aumentó 1.9 veces): se ha reportado que ratones *knockout* para *Srsf3* han presentado un incremento en la sensibilidad a la insulina (149). Nuestros resultados estarían relacionados con esto en el sentido de que el estado de insulino resistencia de las células adiposas 3T3-L1 estaría induciendo un aumento de la expresión de la proteína SRSF3.
- Proteína de choque térmico 90-alfa (HSP90AA1) (aumentó 1.7 veces): se ha reportado una relación entre esta proteína y la kinasa Akt (PKB), un componente importante de diversas rutas metabólicas incluyendo de la respuesta a insulina mediado por PI3K/Akt. La unión de HSP90AA1 a Akt preserva la actividad de ésta kinasa en células 293T y además, inhibidores de HSP90AA1 disminuyen los niveles de Akt y la fosforilación tanto de Akt como de ERK1 y 2 en diferentes líneas celulares de cáncer (150–152). Nuestros resultados muestran un aumento de la expresión de HSP90AA1 lo cual estaría relacionado con una mayor actividad de Akt, así como también un aumento en los niveles y fosforilación de esta kinasa, lo que conllevaría a una activación en esa vía de señalización de la insulina. En ese sentido nuestros resultados no estarían de acuerdo con lo reportado ya que nos encontramos con un aumento de HSP90AA1 frente a un estado de insulino resistencia en adipocitos 3T3-L1. Sin embargo, el aumento de HSP90AA1 también podría ser un producto

del estrés generado por el estado de resistencia inducido por prednisolona y la activación de la vía de señalización de la PI3K/Akt podría constituirse como una respuesta compensatoria de la célula a dicho estado.

- Catalasa (CAT) (aumentó 1.4 veces): la relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y el desarrollo de resistencia a la insulina tanto *in vivo* como *in vitro* ha sido ampliamente descrita. La catalasa previene el daño que este tipo de sustancias pueden causar a las células, ya que cataliza la descomposición del H_2O_2 y se ha reportado que mejora la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en ratones obesos y además protege del desarrollo de resistencia inducida por lípidos en músculo de ratones (153–155). Nuestros datos revelan un aumento de la expresión de la catalasa producto del tratamiento con prednisolona en el estado de resistencia a la insulina, lo cual podría indicar una respuesta compensatoria a un exceso de ROS en las células, en ese sentido el desarrollo de insulino resistencia inducido farmacológicamente en nuestro modelo de adipocitos 3T3-L1 estaría relacionado con el estrés oxidativo.
- Prohibitina 2 (PHB2) (aumentó 1.3 veces): se ha descrito la interacción de PHB con PIP3 en células 3T3-L1 y además se ha demostrado que la sobreexpresión de esta proteína atenúa la señalización de insulina corriente abajo de la PI3K. Adicionalmente, ratones machos sobreexpresando PHB en adipocitos han presentado alteraciones en la homeostasis de glucosa, además de altos niveles de insulina y bajos niveles de adiponectina (156,157). Otros autores han observado Akt se une al complejo nuclear PHB2-PHB, el cual es un represor transcripcional, produciendo una disminución de dicho efecto represor. Nuestros resultados mostrando un aumento de 1.3 veces en la expresión de esta proteína podrían indicar un aumento en la represión transcripcional en el modelo de resistencia a la insulina inducido por prednisolona. Nuestros datos constituyen la primera evidencia experimental de la asociación de PHB2 y resistencia a la insulina inducida por prednisolona.
- Fosfoglucomutasa 1 (PGM1) (aumentó 1.3 veces): se ha reportado una disminución significativa en la expresión tanto del gen como de la proteína PGM1 acompañado de una disminución de la expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT4 en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Mientras que en músculo esquelético de pacientes con DMT2, un tejido clave para el control de la homeostasis de la glucosa, se observó un aumento en los niveles de PGM1 (158,159). Por lo anterior, se puede afirmar que la evidencia disponible hasta ahora no es concluyente y se requiere de más investigaciones en este campo. Nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión de esta

proteína en adipocitos 3T3-L1 sometidos a tratamiento con prednisolona, lo cual estaría de acuerdo con lo reportado para músculo esquelético y podría relacionarse con el desarrollo de resistencia a la insulina en nuestro modelo celular.

En cuanto a las proteínas que disminuyeron su expresión 1.25 o más veces en nuestro modelo de insulino resistencia inducida por prednisolona destacamos las siguientes que han sido relacionadas previamente con el desarrollo de resistencia a la insulina:

- Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano (GBE1) (disminución de 1.3 veces): se ha reportado una disminución en la expresión del mRNA de GBE1 en tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos y además se ha establecido una correlación negativa entre los niveles de expresión génica de *gbe1* y el BMI; adicionalmente, también se han observado mayores niveles de expresión de dicho gen en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (160,161). Nuestros resultados muestran una disminución de los niveles de GBE1 en células adiposas, lo cual está de acuerdo con tales observaciones y parecería estar relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina en nuestro modelo celular.
- L-lactato deshidrogenasa cadena B (LDHB) (disminución de 1.5 veces): esta enzima tiene como función catalizar la reacción de reducción del piruvato a lactato, y distintos autores han estudiado la relación entre los niveles de lactato y la resistencia a la insulina, reportando que un aumento en los niveles plasmáticos de la enzima LDHB podría estar relacionado con las etapas iniciales del desarrollo de resistencia a la insulina en pacientes sanos, así como también en músculo esquelético de pacientes VIH positivos bajo tratamiento con nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (162,163). En nuestro caso, trabajando con células adiposas, observamos una disminución de la expresión de la enzima LDHB lo que podría reducir los niveles de lactato; sin embargo, no podemos concluir acerca del papel de los niveles de lactato y la resistencia a la insulina en nuestro modelo, pero nuestros datos sí están de acuerdo con la observación de otros autores en dicho sentido y proporcionarían una base molecular para explicar dicha asociación, resultado que se constituye en la primera evidencia de este tipo.
- Proteína 14-3-3 gamma (YWHAG) (disminución de 2.0 veces): El efecto de esta proteína en el transporte de glucosa mediado por GLUT4 en adipocitos ha sido descrito previamente. En células en reposo la translocación de GLUT4 a la membrana, un proceso de transporte vesicular mediado por Rab, se encuentra inhibido por el sustrato de 106 kDa de Akt (AS160) y por TBC1D1; los cuales son forforilados por Akt en respuesta a la

estimulación con insulina, facilitando su unión a YWHAG con posterior pérdida de su actividad supresora (164,165). De acuerdo con esto, la unión de YWHAG resultaría crucial para la translocación de GLUT4 y el proceso de transporte de glucosa al interior de la célula. Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la expresión de esta proteína producto del tratamiento con el corticoide, lo cual podría ser uno de los determinantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina inducida por prednisolona en nuestro modelo experimental. En este sentido, nuestros resultados se constituyen en la primera evidencia experimental *in vitro* relacionando a YWHAG con la resistencia a la insulina inducida por prednisolona.

- Fructosa-bifosfato aldolasa A (ALDOA) (disminución de 2.0 veces): se ha reportado que la ALDOA funciona como una proteína *scaffold* con un importante papel en la asociación entre las vesículas de GLUT4 y el citoesqueleto de actina de las células (166). De acuerdo con lo anterior es posible plantear que una disminución en los niveles de esta proteína, como la observada en nuestras células, estaría alterando la traslocación de GLUT4 y por ende, el transporte de glucosa hacia el interior celular, favoreciendo el estado de insulino resistencia observado. Esta observación está de acuerdo también con lo recién discutido para la proteína 14-3-3 gamma (YWHAG).
- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citoplásmica (GPD1) (disminución de 2.0 veces): diversos autores han observado una importante disminución en los niveles de esta enzima en piel de ratas con diabetes inducida por aloxano, así como también en la actividad de GPD1 mitocondrial en pacientes con DMT2. Adicionalmente, linfocitos de pacientes obesos/diabéticos resistentes a la insulina presentaron una disminución de la actividad de GPD1 (167–169). Nuestros resultados muestran una disminución considerable de los niveles de esta enzima en el estado de insulino resistencia inducida por prednisolona en nuestro modelo de adipocitos 3T3-L1 y están en concordancia con los estudios previamente mencionados, razón por la cual se podría pensar en el papel de esta proteína en el desarrollo de resistencia en nuestro modelo celular.
- Complemento C3 (C3) (disminución de 5.1 veces): se han encontrado niveles plasmáticos de C3 y C4 significativamente mayores en individuos obesos y se ha establecido una correlación positiva entre estos niveles, el índice de masa corporal (BMI) y la resistencia a la insulina en pacientes sometidos a cirugía bariátrica; adicionalmente, C3 se ha asociado con resistencia a nivel hepático y resistencia en tejido y células adiposas (170–172). Aquí nosotros hemos observado una disminución significativa de la expresión

de esta proteína, lo cual parecía ir en contravía a los hallazgos de esos otros autores. Por ahora, no tenemos una explicación para esta observación.

Cabe resaltar que este estudio corresponde a la primera evidencia experimental de la relación de las proteínas XDH, CS, SRSF3, HSP90AA1, PGM1, GBE1, LDHB, YWHAG, ALDOA, GPD1 y C3 con resistencia a la insulina inducida por prednisolona.

Por otra parte, en cuanto al efecto de prednisolona sobre la expresión de genes y proteínas en modelos experimentales diferentes al nuestro se tiene lo siguiente:

Packialakshmi *et al.* (2015) evaluaron en pollos los cambios en el perfil de proteínas plasmáticas asociados con predisposición a la separación de la cabeza femoral inducida por prednisolona (10 mg/kg durante 6 u 11 días) utilizando HPLC-MS, observando alteraciones en la expresión de diferentes proteínas. El aumento en los niveles de PHB2 en dicho modelo resultó ser el único cambio observado, el cual coincide con los resultados reportados en el presente trabajo (173).

Por otra parte, Shan *et al.* (2017) evaluaron el perfil proteico de células de la malla trabecular humana (HTMC) sometidas a tratamiento durante 7 días con dexametasona (300 nM), prednisolona (300 nM) o una combinación de los dos corticoides utilizando LC-MS/MS. Si bien en todos los casos se presentaron cambios en dicho perfil al tratar con dexametasona, ninguna de las proteínas coincidió con lo reportado en este trabajo; mientras que bajo el tratamiento con prednisolona se observó un aumento de los niveles de CAT, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados. El tratamiento con los dos fármacos, dexametasona y prednisolona, resultó en una disminución de los niveles de ALB y SLC3A2, lo cual es contrario a lo observado en nuestro modelo (174).

En otro estudio, Kamisoglu, *et al.* (2015) reportaron cambios en el proteoma en hígado de ratas utilizando nano-LC/LTQ al tratar por 0.5-66 horas con una única dosis de metilprednisolona (50 mg/kg). Las proteínas cuya expresión cambió de manera coincidente con lo reportado en el presente trabajo fueron: HSP90AA1, ACADSB, GOT2, XDH, CYB5R3, ACSL1, ACOX1, PGM1 y C3 (175).

Adicionalmente, Ayyar *et al.* (2017) analizaron proteínas en hígado de ratas tratadas con metilprednisolona (50 mg/kg) por diferentes periodos de tiempo (0.5-66 h), observando alteraciones en las siguientes proteínas, y que coinciden con nuestros resultados: CAT,

HSP90AA1, PHB, XDH, GOT2, GLUD1, ALDOA, GAPDH, PGM1, PGK1, PKM, FASN, GPD1, ACSL1, ACADM, ACOX1, ACADSB, NCL, LMNA, P4HB, HSPD1, ATP5F1A, ATP5PD, ATP5PO, C3 y VIM (176).

Finalmente, Nouri-Nigjeh *et al.* (2014) evaluó el efecto del tratamiento con metilprednisolona (50 mg/kg) por diferentes intervalos de tiempo (0.5-66 h) en hígado de ratas. Para 48 horas de tratamiento las proteínas que se observaron aumentadas, coincidentes con nuestros resultados fueron: ACSF2, ALB, ATP5F1A, CCT8, FASN, GAPDH, GBE1, GLUD1, GPD1, HNRNPA3, HSPD1, NCL, P4HB, PGK1 y RPL17. Por otra parte, las proteínas que se observaron disminuidas y que coinciden con nuestros datos fueron: ACADM, ACOX1, ACSL1, ALDOA, ATP2A2, ATP5PD, C3, CAT, CS, CYB5R3, ECH1, GOT2, H1F0, HSP90AA1, HSPA9, HYOU1, LMNA, LONP1, PGM1, PHB2, UQCRC2, VIM, XDH y YWHAG (177).

Además de las proteínas ya mencionadas que han presentado expresión diferencial bajo el tratamiento con prednisolona en diferentes modelos, en este trabajo encontramos cambios en algunas proteínas que no han sido relacionadas previamente con resistencia a la insulina. Aquellas que presentaron un aumento en sus niveles como resultado del tratamiento farmacológico fueron: ACADSB, ACOT9, ATP6V1A, CKAP4, CTTN, DCAKD, EIF4A3, ESYT2, FKBP5, GSN, NMT1, PHGDH, PNPLA2, RBM14, SAMM50, SLC3A2, SRSF3 y TUBA1A. Mientras que las que presentaron una disminución fueron: SCD2, CAVIN1, ESYT1, LIPE, PKM, PLIN4, SPTBN1 y SUMO2.

Un hecho sorprendente e interesante de nuestros resultados de proteómica es que no observamos diferencias significativas en la expresión de proteínas como IRS-1, IRS-2, GLUT1, GLUT4, Akt/PKB, PI3K (y otras), que han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por glucocorticoides y otros fármacos en diferentes modelos de estudio (4,54). Hasta este momento no tenemos explicación para esto.

Por último, es importante resaltar que nuestro estudio constituye el primer acercamiento proteómico al entendimiento de los cambios moleculares relacionados con el estado de insulino resistencia inducida por prednisolona en adipocitos 3T3-L1, y los resultados encontrados abren nuevas y amplias posibilidades de estudio a futuro, no solamente en relación con los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina inducida por

fármacos, sino también para la identificación de nuevas dianas farmacológicas relacionadas con diabetes y obesidad. Dicho conocimiento nuevo debería permitir el desarrollo de nuevos fármacos con menores efectos adversos.

Así mismo, consideramos importante resaltar el hecho de que hemos desarrollado un nuevo método o bioensayo para cuantificar consumo de glucosa, de manera relativamente simple y económica, el cual prescinde de equipos costosos y del uso de radioisótopos. Consideramos que en un país con tanta dificultad para acceder a fondos para investigación, esto es realmente un logro importante y representa un ejemplo de innovación y desarrollo.

Según nuestro conocimiento, somos el primer grupo en desarrollar esta metodología alternativa para cuantificar consumo de glucosa.

7. Conclusiones

- Se estandarizó y caracterizó un modelo celular de resistencia a la insulina inducido farmacológicamente. Este modelo se basó en el uso de la línea celular 3T3-L1 que fue primero diferenciada *in vitro* a células adiposas.
- De cinco agentes farmacológicos evaluados, sólo dexametasona y prednisolona presentaron el efecto de resistencia a la insulina esperado en nuestro modelo celular, y se establecieron las condiciones óptimas (concentración y tiempos de tratamiento) para lograr un estado de insulino-resistencia.
- Los fármacos indinavir, olanzapina y peróxido de hidrógeno no tuvieron el efecto esperado de resistencia a la insulina en nuestro modelo de células adiposas 3T3-L1.
- La resistencia a la insulina fue evaluada a través del efecto negativo de los fármacos sobre el consumo de glucosa, para lo cual se estandarizó un bioensayo colorimétrico que permitió cuantificar dicho consumo en nuestras células. Este bioensayo ha sido descrito y aplicado por primera vez a cultivos celulares por nuestro grupo.
- El bioensayo colorimétrico descrito permitió determinar los parámetros cinéticos ($V_{máx}$ y K_t) para el proceso de consumo de glucosa. La similitud entre los valores determinados aquí y los descritos por otros autores usando el método radiactivo clásico soportan la validez y pertinencia de nuestro bioensayo, permitiendo proponerlo como un método alternativo para la determinación de consumo de glucosa tanto basal como estimulado por insulina en cultivos de adipocitos 3T3-L1.
- El modelo celular de resistencia a la insulina inducida por prednisolona respondió a rosiglitazona, observándose una sensibilización parcial de los adipocitos 3T3-L1 a las

condiciones evaluadas. Esto da validez al modelo planteado. Se requiere profundizar en este punto.

- Nuestro modelo celular de resistencia a la insulina inducida por prednisolona fue caracterizado a nivel molecular mediante análisis proteómico cuantitativo, lo que reveló una expresión diferencial de 76 proteínas al comparar con las células control, 56 de las cuales aumentaron y 20 disminuyeron su expresión entre 1.25 y 5 veces. Dichas proteínas se asocian mayoritariamente con funciones de unión, actividad catalítica y procesos metabólicos.
- Nuestro análisis de caracterización molecular nos permitió identificar por primera vez un grupo de proteínas cuya expresión aumenta o disminuye en el estado de resistencia a la insulina comparado con el control. Entre las proteínas que aumentaron su expresión 1.25 o más veces se tienen: ACADSB, ACOT9, ATP6V1A, CKAP4, CTTN, DCAKD, EIF4A3, ESYT2, FKBP5, GSN, NMT1, PHGDH, PNPLA2, RBM14, SAMM50, SLC3A2, SRSF3, TUBA1A. Entre las proteínas que disminuyeron su expresión 1.25 o más veces destacan: SCD2, CAVIN1, ESYT1, LIPE, PKM, PLIN4, SPTBN1 y SUMO2.

8. Proyecciones

- Realizar un estudio comparativo entre el bioensayo colorimétrico de consumo de glucosa aquí descrito y un método clásico (radiactivo o fluorescente) con el fin de validar el método aquí presentado.
- Se propone utilizar el modelo celular de resistencia a la insulina aquí planteado para evaluar extractos, fracciones o moléculas con potencial actividad antidiabética o sensibilizadora a la insulina.
- Se recomienda continuar con la evaluación del efecto de rosiglitazona (y de otros sensibilizadores a la insulina) para encontrar las condiciones óptimas de sensibilización en el modelo propuesto.
- Profundizar en el estudio de los cambios moleculares observados con el fin de identificar nuevas dianas moleculares y conocer su papel en la resistencia y sensibilidad a la insulina. Esta información debería tener impacto sobre el mejoramiento y desarrollo de nuevos fármacos.

9. Bibliografía

1. OMS. Informe mundial sobre la diabetes. Ginebra; 2016.
2. OMS. Diabetes country profiles 2016 [Internet]. 2016. Available from: https://www.who.int/diabetes/country-profiles/col_en.pdf?ua=1
3. Ahmad SI. Diabetes: an old disease, a new insight. New York: Springer; 2013.
4. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2010 Jul;1(3):68–75.
5. Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? *Medicine (Baltimore)*. 2019;47(1):1–4.
6. Borst SE. The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine*. 2004;23(2–3):177–82.
7. Draznin B, Sussman KE, Eckel RH, Kao M, Yost T, Sherman NA. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J Clin Invest*. 1988 Dec;82(6):1848–52.
8. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 1999 Jun;48(6):1270–4.
9. Ge X, Yu Q, Qi W, Shi X, Zhai Q. Chronic insulin treatment causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. *Free Radic Res*. 2008 Jun;42(6):582–91.
10. Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol

- 3-kinase. *Diabetologia*. 2004 May;47(5):794–805.
11. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*. 2000;49(10):1700–8.
 12. Buren J, Liu HX, Jensen J, Eriksson JW. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol*. 2002;146:419–29.
 13. Ruzzin J, Wagman AS, Jensen J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. *Diabetologia*. 2005;48(10):2119–30.
 14. Reed MJ, Scribner KA. In-vivo and in-vitro models of type 2 diabetes in pharmaceutical drug discovery. *Diabetes Obes Metab*. 1999;1(2):75–86.
 15. Fröde TS, Medeiros YS. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *J Ethnopharmacol*. 2008;115(2):173–83.
 16. Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacol Rep*. 2016 Dec;68(6):1165–77.
 17. Ayala-Sumuano J-T, Velez-delValle C, Beltran-Langarica A, Marsch-Moreno M, Hernandez-Mosqueira C, Kuri-Harcuch W. Glucocorticoid paradoxically recruits adipose progenitors and impairs lipid homeostasis and glucose transport in mature adipocytes. *Sci Rep*. 2013;3:2573.
 18. Jaiswal N, Gunaganti N, Maurya CK, Narender T, Tamrakar AK. Free fatty acid induced impairment of insulin signaling is prevented by the diastereomeric mixture of calophyllic acid and isocalophyllic acid in skeletal muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jan;746:70–7.
 19. Beg M, Abdullah N, Thowfeik FS, Altorki NK, McGraw TE. Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *Elife*. 2017 Jun;6.
 20. Yamamoto N, Ashida H. Evaluation Methods for Facilitative Glucose Transport in Cells and Their Applications. 2012;18(4):493–503.

21. Yamamoto N, Ueda-Wakagi M, Sato T, Kawasaki K, Sawada K, Kawabata K, Akagawa M, Ashida H. Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Dec;71:12.14.1-26.
22. Clavijo MA, Gómez Camargo D, Gómez Alegría C. Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1. Vol. 15, *Revista Med*. 2007. p. 170–6.
23. Sandoval A. Modulación farmacológica de PPAR γ y su efecto en la expresión de caveolina-1 en células 3T3-L1. Universidad Nacional de Colombia; 2008.
24. Domínguez GP. Efectos de la modulación de los receptores PPAR γ y de Glucocorticoides en la expresión de Caveolina-1 en células 3T3-L1. Universidad Nacional de Colombia; 2011.
25. Pinzón García AD, Sandoval Hernández AG, Rivera Diaz PA, Gómez Camargo DE, Gómez Alegría CJ. Determinación colorimétrica de glucosa y consumo de glucosa en cultivos de células adiposas 3T3-L1. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2017;51(2):195–202.
26. Florez J, Armijo JA, Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 5ª ed. Barcelona: Masson; 2008. 1051–1072 p.
27. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*. 2004;26(12):1351–62.
28. Rang HR, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang y Dale. Farmacología*. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2008. 397–409 p.
29. Hall JE. *Guyton y Hall: Tratado de fisiología médica*. 12ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
30. Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong. Fisiología Médica*. 23ª ed. México D.F.: McGraw Hill; 2010. 315–336 p.
31. Goodman LS, Brunton L, Blumenthal D, Buxton I. *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 12ª ed. McGraw-Hill Education; 2008.
32. Newsholme EA, Dimitriadis G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl:S122-34.

33. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S52-9.
34. Mangmool S, Denkaew T, Parichatikanond W, Kurose H. β -Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart. *Biomol Ther (Seoul).* 2017;25(1):44–56.
35. Ye L, Maji S, Sanghera N, Gopalasingam P, Gorbunov E, Tarasov S, Epstein O, Klein-Seetharaman J. Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery. *Drug Discov Today.* 2017 Jul;22(7):1092–102.
36. Yunn N-O, Kim J, Kim Y, Leibiger I, Berggren P-O, Ryu SH. Mechanistic understanding of insulin receptor modulation: Implications for the development of anti-diabetic drugs. *Pharmacol Ther.* 2018 May;185:86–98.
37. Saltiel A, Kahn C. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414(6865):799–806.
38. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014 Sep;46(6):372–83.
39. King M. *Integrative Medical Biochemistry: Examination and Board Review.* McGraw-Hill Education; 2014. 912 p.
40. Choi K, Kim Y-B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010;25(2):119–29.
41. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex.* 2017;153:214–28.
42. Thatcher JD. The Ras-MAPK Signal Transduction Pathway. *Sci Signal.* 2010;3(119):tr1 LP-tr1.
43. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:85.
44. OPS. Diabetes [Internet]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6715:2012-diabetes&Itemid=39446&lang=es

45. Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong SS, Mohamed Elhassan SA, Tan SH, Ling Lim GP, RongTay NW, Annan NC, Bhattamisra SK, Candasamy M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2019;13(1):364–72.
46. Holt RIG, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ, editors. *Textbook of Diabetes.* 4^a ed. Chicester, United Kingdom: Willey-Blackwell; 2011.
47. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2018;391(10138):2449–62.
48. Chetan MR, Thrower SL, Narendran P. What is type 1 diabetes? *Medicine (Baltimore).* 2019;47(1):5–9.
49. Boles A, Kandimalla R, Reddy PH. Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis.* 2017 May;1863(5):1026–36.
50. Selivanova OM, Grishin SY, Glyakina A V, Sadgyan AS, Ushakova NI, Galzitskaya O V. Analysis of Insulin Analogs and the Strategy of Their Further Development. *Biochemistry (Mosc).* 2018 Jan;83(Suppl 1):S146–62.
51. Sharma AK, Taneja G, Kumar A, Sahu M, Sharma G, Kumar A, Sardona S, Deep A. Insulin analogs: Glimpse on contemporary facts and future prospective. *Life Sci.* 2019;219(15):90–9.
52. Pfeiffer AFH, Klein HH. The treatment of type 2 diabetes. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(5):69–81.
53. Thrasher J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Available Therapies. *Am J Med.* 2017 Jun;130(6S):S4–17.
54. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta.* 2007;375(1–2):20–35.
55. Soumaya K. Molecular mechanisms of insulin resistance in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:240–51.
56. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14(11–12):741–51.

57. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:71.
58. Nicholson T, Church C, Baker DJ, Jones SW. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. *J Inflamm*. 2018;15(1):9.
59. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J-P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab*. 2008 Feb;34(1):2–11.
60. Repaske DR. Medication-induced diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2016 Sep;17(6):392–7.
61. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003 Feb;3(2):178–85.
62. Fathallah N, Slim R, Larif S, Hmouda H, Ben Salem C. Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. *Drug Saf*. 2015 Dec;38(12):1153–68.
63. Rehman A, Setter SM, Vue MH. Drug-Induced Glucose Alterations Part 2: Drug-Induced Hyperglycemia. *Diabetes Spectr*. 2011;24(4):234–8.
64. Huang C-Y, Ma T, Tien L, Hsieh Y-W, Lee S-Y, Chen H-Y, Jon GP. A retrospective longitudinal cohort study of antihypertensive drug use and new-onset diabetes in Taiwanese patients. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
65. Chan JC, Cockram CS, Critchley JA. Drug-induced disorders of glucose metabolism. Mechanisms and management. *Drug Saf*. 1996 Aug;15(2):135–57.
66. Kostis JB, Wilson AC, Freudenberger RS, Cosgrove NM, Pressel SL, Davis BR. Long-term effect of diuretic-based therapy on fatal outcomes in subjects with isolated systolic hypertension with and without diabetes. *Am J Cardiol*. 2005 Jan;95(1):29–35.
67. Anyanwagu U, Idris I, Donnelly R. Drug-Induced Diabetes Mellitus: Evidence for Statins and Other Drugs Affecting Glucose Metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Apr;99(4):390–400.
68. Navarese EP, Buffon A, Andreotti F, Kozinski M, Welton N, Fabiszak T, Caputo S, Grzesk G, Kubica A, Swiatkiewicz I, Sukiennik A, Kelm M, De Servi S, Kubica J. Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2013 Apr;111(8):1123–30.

69. Feeney ER, Mallon PWG. Insulin resistance in treated HIV infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;25(3):443–58.
70. Hresko RC, Hruz PW. HIV Protease Inhibitors Act as Competitive Inhibitors of the Cytoplasmic Glucose Binding Site of GLUTs with Differing Affinities for GLUT1 and GLUT4. *PLoS One.* 2011;6(9).
71. Hruz PW. Molecular mechanisms for insulin resistance in treated HIV-infection. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(3):459–68.
72. Ballon JS, Pajvani U, Freyberg Z, Leibel RL, Lieberman JA. Molecular pathophysiology of metabolic effects of antipsychotic medications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Nov;25(11):593–600.
73. Ren L, Zhou X, Huang X, Wang C, Li Y. The IRS/PI3K/Akt signaling pathway mediates olanzapine-induced hepatic insulin resistance in male rats. *Life Sci.* 2019 Jan;217:229–36.
74. Liu X, Zhu X, Miao Q, Ye H, Zhang Z, Li Y-M. Hyperglycemia induced by glucocorticoids in nondiabetic patients: a meta-analysis. *Ann Nutr Metab.* 2014;65(4):324–32.
75. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007;125(3):451–72.
76. Martínez BB, Pereira ACC, Muzetti JH, Telles F de P, Mundim FGL, Teixeira MA. Experimental model of glucocorticoid-induced insulin resistance. *Acta Cir Bras.* 2016;31(10):645–9.
77. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012 Jun;166(3):877–94.
78. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol.* 2016 Jan;99:1–10.
79. Prabhakar PK. Animal Models in Type 2 Diabetes Research. In: Govil JN, editor. *Recent Progress in Medicinal Plants.* 1^a ed. India: Studium Press; 2015.
80. The National Centre for the Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs). The 3Rs [Internet]. [cited 2018 Jan 14]. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>

81. Esmaeili MA, Yazdanparast R. Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *J Ethnopharmacol.* 2004 Nov;95(1):27–30.
82. Wu W, Tang S, Shi J, Yin W, Cao S, Bu R, Zhu D, Bi Y. Metformin attenuates palmitic acid-induced insulin resistance in L6 cells through the AMP-activated protein kinase/sterol regulatory element-binding protein-1c pathway. *Int J Mol Med.* 2015 Jun;35(6):1734–40.
83. Zhou L, Wang L, Hu X, Li Y. PTEN in propofol-induced insulin resistance in mouse primary hepatocytes. *Exp Ther Med.* 2018 Dec;16(6):4831–5.
84. Fang Z-J, Shen S-N, Wang J-M, Wu Y-J, Zhou C-X, Mo J-X, Lin LG, Gan L-S. Triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* that Enhance Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecules.* 2019;24(1):187.
85. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.* 1975;5(1):19–27.
86. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974;3(2):127–33.
87. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 1969;6:24–7.
88. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2011;2(1):21–5.
89. Little TA. Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation. *BioPharm Int.* 2015;28(4):48–51.
90. Rudich A, Konrad D, Torok D, Ben-Romano R, Huang C, Niu W, Garg RR, Wijesekara N, Germinario RJ, Bilan PJ, Klip A. Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. *Diabetologia.* 2003 May;46(5):649–58.
91. Houseknecht KL, Robertson AS, Zavadoski W, Gibbs EM, Johnson DE, Rollema H. Acute effects of atypical antipsychotics on whole-body insulin resistance in rats: implications for adverse metabolic effects. *Neuropsychopharmacology.* 2007 Feb;32(2):289–97.
92. Ma M, Quan Y, Li Y, He X, Xiao J, Zhan M, Zhao W, Xin Y, Lu L, Luo L. Bidirectional

- modulation of insulin action by reactive oxygen species in 3T3L1 adipocytes. *Mol Med Rep.* 2018 Jul;18(1):807–14.
93. Lo KA, Labadorf A, Kennedy NJ, Han MS, Yap YS, Matthews B, Xin Y, Sun L, Davis RJ, Lodish HF, Fraenkel E. Analysis of in vitro insulin-resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance. *Cell Rep.* 2013 Oct;5(1):259–70.
 94. Fleuren WWM, Linssen MML, Toonen EJM, van der Zon GCM, Guigas B, de Vlieg J, Dokter WHA, Ouwens DM, Alkema W. Prednisolone induces the Wnt signalling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Physiol Biochem.* 2013 May;119(2):52–64.
 95. Sapcariu SC, Kanashova T, Weindl D, Ghelfi J, Dittmar G, Hiller K. Simultaneous extraction of proteins and metabolites from cells in culture. *MethodsX.* 2014;1:74–80.
 96. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC, Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics.* 2011;11(4):535–53.
 97. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics.* 2013;13(1):22–4.
 98. Craig R, Beavis RC. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics.* 2004 Jun;20(9):1466–7.
 99. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2018;47(D1):D419–26.
 100. Mi H, Muruganujan A, Huang X, Ebert D, Mills C, Guo X, Thomas PD. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc.* 2019;14(3):703–21.
 101. Hartley HO. The use of range in analysis of variance. *Biometrika.* 1950;37(3–4):271–80.
 102. Smirnov N. Table for Estimating the Goodness of Fit of Empirical Distributions. *Ann Math Stat.* 1948;19(2):279–81.
 103. Student. The Probable Error of a Mean. *Biometrika.* 1908;6(1):1–25.

104. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann Math Stat.* 1947;18(1):50–60.
105. Fisher R. *Statistical methods for research workers.* Edinburg: Oliver and Boyd; 1925.
106. Tukey JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics.* 1949 Jun;5(2):99–114.
107. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47(260):583–621.
108. Dunn O. Multiple comparisons among means. *JASA.* 1961;56:54–64.
109. GraphPad Prism. GraphPad Prism versión 6.07 (Demo) [Internet]. La Jolla California, USA; 2015. Available from: www.graphpad.com
110. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource [Internet]. [cited 2019 Jun 14]. Available from: <http://geneontology.org/>
111. Ruiz-Ojeda FJ, Ruperez AI, Gomez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM. Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun;17(7).
112. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000;130(12):3122S-3126S.
113. Gathercole LL, Bujalska IJ, Stewart PM, Tomlinson JW. Glucocorticoid modulation of insulin signaling in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4332–9.
114. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem.* 2012 Jun;425(1):88–90.
115. Vishwanath D, Srinivasan H, Patil MS, Seetarama S, Agrawal SK, Dixit MN, Dhar K. Novel method to differentiate 3T3 L1 cells in vitro to produce highly sensitive adipocytes for a GLUT4 mediated glucose uptake using fluorescent glucose analog. *J Cell Commun Signal.* 2013 Jun;7(2):129–40.
116. Gregoire FM, Smas CM, Sul HEIS. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78(3):783–809.

117. ICH. "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)", ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva; 1996.
118. Olefsky JM. Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J Clin Invest.* 1975 Dec;56(6):1499–508.
119. Hjollund E, Pedersen O. Transport and metabolism of D-glucose in human adipocytes. Studies of the dependence on medium glucose and insulin concentrations. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Jan;937(1):93–102.
120. Perriott LM, Kono T, Whitesell RR, Knobel SM, Piston DW, Granner DK, Powers AC, May JM. Glucose uptake and metabolism by cultured human skeletal muscle cells: rate-limiting steps. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jul;281(1):E72-80.
121. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry.* 5a ed. New York: W.H. Freeman; 2008.
122. Brown GK. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2000 May;23(3):237–46.
123. Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res.* 2002;35(1):9–26.
124. Sigma-Aldrich®. Glucose Uptake Colorimetric Assay Kit-Technical Bulletin [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 22]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak083bul.pdf>
125. Ben-David U, Siranosian B, Ha G, Tang H, Oren Y, Hinohara K, Strathdee CA, Dempster J, Lyons NJ, Burns R, Nag A, Kugener G, Cimini B, Tsvetkov P, Maruvka YE, O'Rourke R, Garrity A, Tubelli AA, Bandopadhyay P, Tsherniak A, Vazquez F, Wong B, Birger C, Ghandi M, Thorner AR, Bittker JA, Meyerson M, Getz G, Beroukhi R, Golub TR. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature.* 2018;560(7718):325–30.
126. Weiland M, Bahr F, Hohne M, Schurmann A, Ziehm D, Joost HG. The signaling potential of the receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) in 3T3-L1 adipocytes: comparison of glucose transport activity, induction of oncogene c-fos, glucose transporter mRNA, and DNA-synthesis. *J Cell Physiol.* 1991 Dec;149(3):428–35.

127. Young PW, Cawthorne MA, Coyle PJ, Holder JC, Holman GD, Kozka IJ, Kirkham DM, Lister CA, Smith SA. Repeat treatment of obese mice with BRL 49653, a new potent insulin sensitizer, enhances insulin action in white adipocytes. Association with increased insulin binding and cell-surface GLUT4 as measured by photoaffinity labeling. *Diabetes*. 1995 Sep;44(9):1087–92.
128. Semaan DG, Igoli JO, Young L, Gray AI, Rowan EG, Marrero E. In vitro anti-diabetic effect of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on the glucose uptake assays by HepG2, L6, 3T3-L1 and fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol*. 2018 Apr;216:8–17.
129. Janneh O, Hoggard PG, Tjia JF, Jones SP, Khoo SH, Maher B, Back DJ, Pirmohamed M. Intracellular disposition and metabolic effects of zidovudine, stavudine and four protease inhibitors in cultured adipocytes. *Antivir Ther*. 2003 Oct;8(5):417–26.
130. El-Houri RB, Kotowska D, Olsen LCB, Bhattacharya S, Christensen LP, Grevsen K, Oksbjerg N, Faergeman N, Kristiansen K, Christensen KB. Screening for bioactive metabolites in plant extracts modulating glucose uptake and fat accumulation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:156398.
131. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS*. 2002 Apr;16(6):859–63.
132. Coccorello R, Brina D, Caprioli A, Conti R, Ghirardi O, Schepis F, Moles A. 30 days of continuous olanzapine infusion determines energy imbalance, glucose intolerance, insulin resistance, and dyslipidemia in mice. *J Clin Psychopharmacol*. 2009 Dec;29(6):576–83.
133. Li R, Ou J, Li L, Yang Y, Zhao J, Wu R. The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 Mediates Olanzapine-Induced Weight Gain and Insulin Resistance. *Front Pharmacol*. 2018;9:379.
134. Vestri HS, Maianu L, Moellering DR, Garvey WT. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Apr;32(4):765–72.
135. Robinson KA, Yacoub Wasef SZ, Buse MG. At therapeutic concentrations, olanzapine does not affect basal or insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 Jan;30(1):93–8.
136. Matsuda M, Shimomura I. Roles of oxidative stress, adiponectin, and nuclear

- hormone receptors in obesity-associated insulin resistance and cardiovascular risk. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014 Aug;19(2):75–88.
137. Guo H, Ling W, Wang Q, Liu C, Hu Y, Xia M. Cyanidin 3-glucoside protects 3T3-L1 adipocytes against H₂O₂- or TNF- α -induced insulin resistance by inhibiting c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *Biochem Pharmacol.* 2008 Mar;75(6):1393–401.
138. Nagami M, Ito Y, Nagasawa T. Phenethyl isothiocyanate protects against H₂O₂-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 Nov;81(11):2195–203.
139. Garvey WT, Huecksteadt TP, Monzon R, Marshall S. Dexamethasone regulates the glucose transport system in primary cultured adipocytes: different mechanisms of insulin resistance after acute and chronic exposure. *Endocrinology.* 1989 May;124(5):2063–73.
140. den Uyl D, van Raalte DH, Nurmohamed MT, Lems WF, Bijlsma JWW, Hoes JN, Dijkmans BAC, Diamant M. Metabolic effects of high-dose prednisolone treatment in early rheumatoid arthritis: balance between diabetogenic effects and inflammation reduction. *Arthritis Rheum.* 2012 Mar;64(3):639–46.
141. Petersons CJ, Mangelsdorf BL, Jenkins AB, Poljak A, Smith MD, Greenfield JR, Thompson CH, Burt MG. Effects of low-dose prednisolone on hepatic and peripheral insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal adiposity in patients with inflammatory rheumatologic disease. *Diabetes Care.* 2013 Sep;36(9):2822–9.
142. Ishizuka T, Nagashima T, Kajita K, Miura A, Yamamoto M, Itaya S, Kanoh Y, Ishizawa M, Murase H, Yasuda K. Effect of glucocorticoid receptor antagonist RU 38486 on acute glucocorticoid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Metabolism.* 1997;46(9):997–1002.
143. Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism.* 2001 Nov;50(11):1294–300.
144. Martinez L, Berenguer M, Bruce MC, Le Marchand-Brustel Y, Govers R. Rosiglitazone increases cell surface GLUT4 levels in 3T3-L1 adipocytes through an enhancement of endosomal recycling. *Biochem Pharmacol.* 2010 May;79(9):1300–9.
145. Washio K (Watanabe), Kusunoki Y, Murase T, Nakamura T, Osugi K, Ohigashi M, Ohigashi M, Sukenaga T, Ochi F, Matsuo T, Katsuno T, Moriwaki Y, Yamamoto T, Namba M, Koyama H. Xanthine oxidoreductase activity is correlated with insulin

- resistance and subclinical inflammation in young humans. *Metab - Clin Exp*. 2017 May 1;70:51–6.
146. Sunagawa S, Shirakura T, Hokama N, Kozuka C, Yonamine M, Namba T, Morishima S, Nakachi S, Nishi Y, Ikema T, Okamoto S, Matsui C, Hase N, Tamura M, Shimabukuro M, Masuzaki H. Activity of xanthine oxidase in plasma correlates with indices of insulin resistance and liver dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: A pilot exploratory study. *J Diabetes Investig*. 2019;10(1):94–103.
 147. Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999 Nov;13(14):2051–60.
 148. Ortenblad N, Mogensen M, Petersen I, Hojlund K, Levin K, Sahlin K, Beck-Nielsen H, Gaster M. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun;1741(1–2):206–14.
 149. Sen S, Jumaa H, Webster NJG. Splicing factor SRSF3 is crucial for hepatocyte differentiation and metabolic function. *Nat Commun*. 2013;4:1336.
 150. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem*. 2002 Oct;277(42):39858–66.
 151. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N. Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene*. 2002 Feb;21(8):1159–66.
 152. Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res*. 2001 May;61(10):4003–9.
 153. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006 Apr;440(7086):944–8.
 154. Ikemura M, Nishikawa M, Hyoudou K, Kobayashi Y, Yamashita F, Hashida M. Improvement of insulin resistance by removal of systemic hydrogen peroxide by PEGylated catalase in obese mice. *Mol Pharm*. 2010 Dec;7(6):2069–76.

155. Lee H-Y, Choi CS, Birkenfeld AL, Alves TC, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Zhang D, Woo DK, Shadel GS, Ladiges W, Rabinovitch PS, Santos JH, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI. Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell Metab.* 2010 Dec;12(6):668–74.
156. Ande SR, Mishra S. Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(3):1023–8.
157. Ande SR, Nguyen KH, Padilla-Meier GP, Wahida W, Nyomba BLG, Mishra S. Prohibitin Overexpression in Adipocytes Induces Mitochondrial Biogenesis, Leads to Obesity Development, and Affects Glucose Homeostasis in a Sex-Specific Manner. *Diabetes.* 2014 Nov 1;63(11):3734 LP – 3741.
158. Burkart AM, Tan K, Warren L, Iovino S, Hughes KJ, Kahn CR, Patti M-E. Insulin Resistance in Human iPS Cells Reduces Mitochondrial Size and Function. *Sci Rep.* 2016;6:22788.
159. Hojlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P, Handberg A, Dela F, Vinten J, McCormack JG, Reynet C, Beck-Nielsen H. Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem.* 2003 Mar;278(12):10436–42.
160. Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Serena C, Duran X, Montori-Grau M, Rodriguez MA, MA, Yanes O, Núñez-Roa C, Roche K, Puthanveetil P, Garrido-Sánchez L, Saez E, Tinahones FJ, Garcia-Roves PM, Gómez-Foix AM, Saltiel AR, Vendrell J, Fernández-Veledo S. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. *Mol Metab.* 2016 Jan;5(1):5–18.
161. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of Translation Initiation Factor 2 α Enhances Glucose Tolerance and Attenuates Hepatosteatosis in Mice. *Cell Metab.* 2008;7(6):520–32.
162. Berhane F, Fite A, Daboul N, Al-Janabi W, Msallaty Z, Caruso M, Lewis MK, Yi Z, Diamond MP, Abou-Samra AB, Seyoum B. Plasma Lactate Levels Increase during Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp and Oral Glucose Tolerance Test. *J Diabetes Res.* 2015;2015:102054.
163. Maagaard A, Holberg-Petersen M, Torjesen PA, Bruun JN, Kvale D. Insulin resistance is affected by increased levels of plasma lactate but not mitochondrial alterations in skeletal muscle in NRTI-exposed HIV-infected patients. *HIV Clin Trials.*

- 2007;8(5):345–53.
164. Kleppe R, Martinez A, Døskeland SO, Haavik J. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(7):713–9.
 165. Chen S, Synowsky S, Tinti M, MacKintosh C. The capture of phosphoproteins by 14-3-3 proteins mediates actions of insulin. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 Nov;22(11):429–36.
 166. Kao AW, Noda Y, Johnson JH, Pessin JE, Saltiel AR. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* 1999 Jun;274(25):17742–7.
 167. Ziboh VA, Rauls TJ, Hsia SL. Adaptive changes of glycerol 3-phosphate dehydrogenase level in rat skin: effects of starvation, alloxan diabetes and insulin. *Endocrinology.* 1971 Jul;89(1):240–5.
 168. Gudayol M, Vidal J, Usac EF, Morales A, Fabregat ME, Fernandez-Checa JC, Novials A, Gomis R. Identification and functional analysis of mutations in FAD-binding domain of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in caucasian patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 2001 Oct;16(1):39–42.
 169. Tu K, Ju H, Pettit F, Shive W, Topek N, Matthews R, Matthews K. Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Activity in Human Lymphocytes- Effects of Insulin, Obesity and Weight Loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207(1):183–90.
 170. Bratti L de OS, do Carmo IAR, Vilela TF, Wopereis S, de Moraes ACR, Borba BGM, et al. Complement component 3 (C3) as a biomarker for insulin resistance after bariatric surgery. *Clin Biochem.* 2017 Jun;50(9):529–32.
 171. Wlazlo N, van Greevenbroek MMJ, Ferreira I, Feskens EJM, van der Kallen CJH, Schalkwijk CG, Schalkwijk CG, Bravenboer B, Stehouwer CD. Complement Factor 3 Is Associated With Insulin Resistance and With Incident Type 2 Diabetes Over a 7-Year Follow-up Period: The CODAM Study. *Diabetes Care.* 2014 Jul 1;37(7):1900 LP – 1909.
 172. Ursini F, Abenavoli L. The Emerging Role of Complement C3 as A Biomarker of Insulin Resistance and Cardiometabolic Diseases: Preclinical and Clinical Evidence. *Rev Recent Clin Trials.* 2018 Jan;13(1):61–8.
 173. Packialakshmi B, Liyanage R, Lay JJ, Okimoto R, Rath N. Prednisolone-induced

predisposition to femoral head separation and the accompanying plasma protein changes in chickens. *Biomark Insights*. 2015;10:1–8.

174. Shan SW, Do CW, Lam TC, Kong RPW, Li KK, Chun KM, Stamer WD, To CH. New Insight of Common Regulatory Pathways in Human Trabecular Meshwork Cells in Response to Dexamethasone and Prednisolone Using an Integrated Quantitative Proteomics: SWATH and MRM-HR Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2017 Oct;16(10):3753–65.
175. Kamisoglu K, Sukumaran S, Nouri-Nigjeh E, Tu C, Li J, Shen X, Duan X, Qu J, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ, Androulakis IP. Tandem analysis of transcriptome and proteome changes after a single dose of corticosteroid: a systems approach to liver function in pharmacogenomics. *OMICS*. 2015 Feb;19(2):80–91.
176. Ayyar VS, Almon RR, DuBois DC, Sukumaran S, Qu J, Jusko WJ. Functional proteomic analysis of corticosteroid pharmacodynamics in rat liver: Relationship to hepatic stress, signaling, energy regulation, and drug metabolism. *J Proteomics*. 2017 May;160:84–105.
177. Nouri-Nigjeh E, Sukumaran S, Tu C, Li J, Shen X, Duan X, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ, Qu J. Highly multiplexed and reproducible ion-current-based strategy for large-scale quantitative proteomics and the application to protein expression dynamics induced by methylprednisolone in 60 rats. *Anal Chem*. 2014 Aug;86(16):8149–57.

10. Anexos

Anexo 1: Cuantificación de la proteína total de adipocitos 3T3-L1

La proteína total extraída empleando un protocolo basado en el uso de metanol/agua/cloroformo fue cuantificada por medio de un kit comercial que emplea el método del BCA, la curva de calibración de absorbancia (562 nm) en función de la concentración de BSA (entre 0 y 2000 $\mu\text{g/mL}$) se muestra en la figura A1.

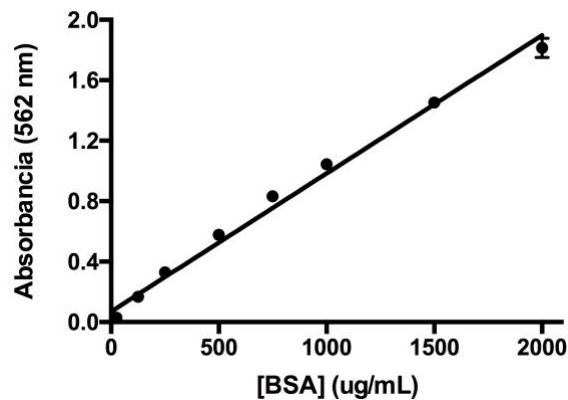


Figura A1. Curva de calibración de absorbancia (562 nm) vs. concentración de BSA ($\mu\text{g/mL}$) para la cuantificación de proteína total extraída de adipocitos 3T3-L1. Se representa el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado.

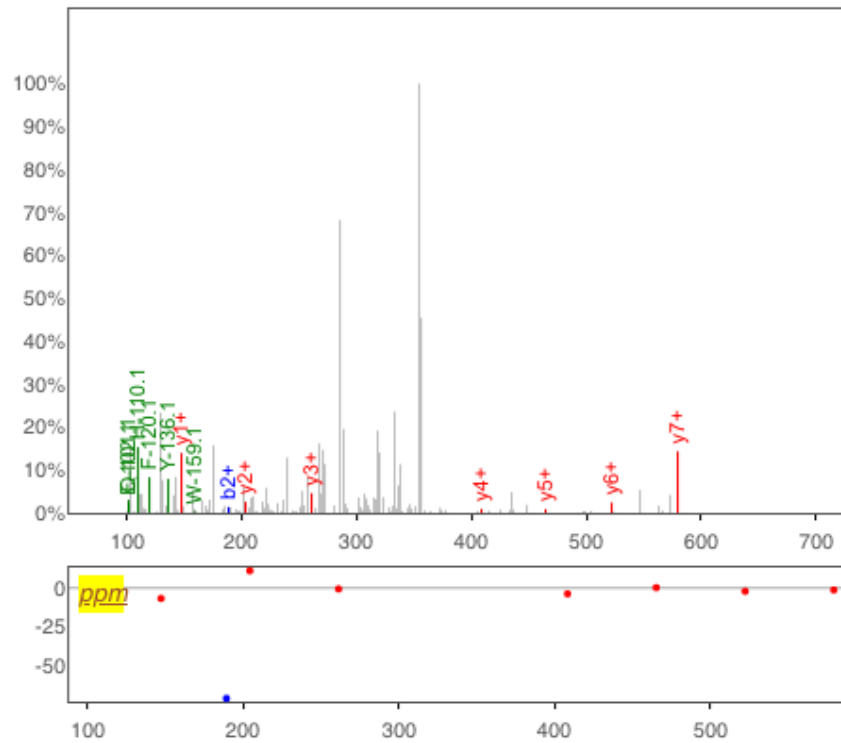
Se realizó un ajuste lineal para la curva con un coeficiente de correlación (r_2) de 0.9894 y se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 9.143 * 10^{-4}x + 0.06906$$

Anexo 2: Espectro de masas para el péptido MGGGFGGK de la proteína XDH

MGGGFGGK, MH+ 710.3290, m/z 355.6681

File: Project scope, Exp. m/z: 355.66853823344, Charge: 2



b+	b2+	b3+	#	Seq	#	y+	y2+	y3+
132.0478	66.5275	44.6874	1	M	8			
189.0692	95.0383	63.6946	2	G	7	579.2885	290.1479	193.7677
246.0907	123.5490	82.7017	3	G	6	522.2671	261.6372	174.7605
303.1122	152.0597	101.7089	4	G	5	465.2456	233.1264	155.7534
450.1806	225.5939	150.7317	5	F	4	408.2241	204.6157	136.7462
507.2020	254.1047	169.7389	6	G	3	261.1557	131.0815	87.7234
564.2235	282.6154	188.7460	7	G	2	204.1343	102.5708	68.7163
			8	K	1	147.1128	74.0600	49.7091

[\[Click\]](#) to move table

Figura A2. Espectro de masas para el péptido MGGGFGGK de la proteína XDH de adipocitos 3T3-L1.