

**DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR DE RESISTENCIA A INSULINA:
ESTUDIO PRELIMINAR**

ANA DELIA PINZÓN GARCÍA

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para optar al título de
MAGISTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

2009

**DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR DE RESISTENCIA A INSULINA:
ESTUDIO PRELIMINAR**

ANA DELIA PINZÓN GARCÍA

DIRECTOR

CLAUDIO GÓMEZ ALEGRÍA PH.D

Profesor Asociado

Departamento de Farmacia

Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

2009

A mis padres y mi hermana

*Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos pensado;
está fundado en nuestros pensamientos
y está hecho de nuestros pensamientos.*

Buda (563 AC-486 AC).

*A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota.*

Madre Teresa de Calcuta (1910-1997)

AGRADECIMIENTOS POR APOYO ECONOMICO Y DE EQUIPOS:

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de las siguientes instancias:

Universidad Nacional de Colombia, Vicerrectoría de Investigación, Dirección Nacional de Investigación (DIB), a través de su apoyo económico mediante la financiación de los proyectos de investigación DIB N° 8003056 y DIB N° 8003323.

Departamento de Farmacia, Dirección curricular, por el apoyo para la compra de algunos reactivos.

Al Coordinador del Laboratorio de Ensayos Farmacológicos del Departamento de Farmacia, profesor Luis Fernando Ospina, por su generosidad al permitir la utilización de espacios y equipos para la realización de este proyecto.

Dra. Doris Gómez, Grupo Unimol-Universidad de Cartagena, por la adquisición y envío del reactivo de Glucosa.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
1. <u>RESUMEN</u>	8
2. <u>OBJETIVOS</u>	10
2.1. Objetivo General	10
2.2. Objetivo Especifico	10
3. <u>ESTADO DEL ARTE</u>	11
3.1. Diabetes Mellitus	12
3.1.1. Diabetes tipo 1	12
3.1.2. Diabetes tipo 2	13
3.2. Efectos Fisiológicos de la Insulina	14
3.3. Mecanismos de Acción de la Insulina	15
3.4. Resistencia a insulina	17
3.5. Efecto de los Glucocorticoides en la Desregulación de la Señalización a Insulina	19
3.6. Modelos de estudio de Diabetes Mellitus y de Resistencia a Insulina	21
3.6.1. Modelos Animales	21
3.6.2. Otros Modelos	23
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	25
4.1. Cultivo y diferenciación (Adipogénesis) in vitro de las células 3T3-L1	26
4.1.1. Cultivo y preservación de las células 3T3-L1	26
4.1.2. Diferenciación <i>in vitro</i> de las células 3T3-L1	26
4.2. Valoración de glucosa por un ensayo enzimático –colorimétrico	27
4.3. Ensayo de cuantificación de la captura de glucosa en adipocitos 3T3-L1	28
4.4. Evaluación del efecto de Dexametasona sobre el consumo de glucosa de las células 3T3-L1	28
4.5. Análisis Estadístico	29

5. <u>RESULTADOS</u>	31
5.1. Estandarización de un ensayo no radiactivo para determinación de glucosa en microplacas de 96 pozos	32
5.1.1. Implementación de un ensayo para cuantificar glucosa	32
5.1.2. Cuantificación de la glucosa residual en el medio de adipocitos 3T3-L1	33
5.2. Evaluación del efecto de Dexametasona sobre el consumo de glucosa por parte de las células 3T3-L1	37
6. <u>DISCUSIÓN</u>	40
6.1. Implementación de un ensayo no radiactivo para determinación de glucosa en formato de microplacas	41
6.2. Evaluación del efecto de Dexametasona sobre el consumo de glucosa por parte de las células 3T3-L1	45
7. <u>CONCLUSIONES</u>	47
8. <u>PROYECCIONES</u>	49
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	51

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Vía de señalización de insulina	16
Figura 2. Algunos mecanismos propuestos como responsables de la resistencia a insulina	19
Figura 3. Determinación de la linealidad y sensibilidad del ensayo de glucosa en microplacas de 96 pozos.	33
Figura 4. Glucosa residual en el medio de cultivo de adipocitos cultivados en placas de 24 pozos y estimulados con diferentes concentraciones de insulina	34
Figura 5. Glucosa residual en medio de cultivo de células cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de insulina	35
Figura 6. Curva dosis respuesta a insulina.	36
Figura 7. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de dexametasona sobre el consumo de glucosa de los adipocitos 3T3-L1.	36

1. RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que deriva de la incapacidad del páncreas para producir insulina suficiente y/o de la incapacidad del organismo para utilizarla eficazmente, y representa el tercer problema de salud pública más importante en el mundo (Who, 1999). Existen diferentes modelos experimentales (bioensayos) *in vivo* e *in vitro* que buscan simular las condiciones patológicas de esta enfermedad.

En el presente estudio se iniciaron trabajos tendientes a desarrollar un modelo “*in vitro*” de resistencia a insulina, el cual pueda, en un futuro próximo, ser utilizado como un modelo experimental sencillo, práctico y económico para el *screening* de moléculas con potencial farmacológico, y también como base para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la insulinoresistencia. Para el desarrollo del modelo, se utilizó la línea celular 3T3-L1 cultivada y diferenciada a adipocitos por tratamiento con 1-metil-3-isobutilxantina 0.5mM, dexametasona 0,1µM e Insulina 10 µg/ml (1.72 µM). En primer lugar, se implementó un ensayo enzimático-colorimétrico en microplacas (96 pozos) para valorar glucosa, demostrándose que existe linealidad de la técnica en un amplio rango de concentraciones de glucosa (0,39-200mg/dl; $r^2 = 0.9996$), y que la sensibilidad del método fue de 0,39 mg/dl. A continuación se aplicó dicho ensayo colorimétrico a la cuantificación de la concentración de glucosa en el medio de cultivo de los adipocitos 3T3-L1 bajo condiciones basales y estimuladas con insulina. El tratamiento con insulina estimuló el consumo de glucosa de los adipocitos, medido indirectamente por el descenso en la concentración de glucosa del medio, efecto que fue máximo a las 12 y 16 h de tratamiento (50-70% reducción de glucosa) con insulina 100 y 1000 nM. Por otro lado, el tratamiento de las células con Dexametasona, un conocido agente inductor de resistencia a insulina, a concentración 10 y 1000 nM por 48 h, eliminó completamente el consumo de glucosa

estimulado por insulina, indicando que el glucocorticoide indujo resistencia a insulina en nuestro modelo experimental.

En conclusión, se ha realizado la parte preliminar de un estudio tendiente a implementar un modelo celular de resistencia a insulina en células animales (adipocitos). El estudio implicó implementar un nuevo ensayo indirecto para cuantificar consumo de glucosa en microplacas de 96 pozos, y establecer las condiciones preliminares para inducir resistencia a insulina en el modelo de células adiposas elegido.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Iniciar trabajos tendientes a desarrollar un modelo celular de resistencia a insulina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Implementar un ensayo para cuantificar la captura de glucosa en células 3T3-L1 bajo condiciones basales y estimuladas con insulina.
- b. Estudiar la captura de glucosa en respuesta a algún agente farmacológico (o toxicológico) que interfiera negativamente en la acción de insulina.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus (DM) está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad crónica debida a la incapacidad del páncreas para producir insulina suficiente o a la incapacidad del organismo para utilizarla eficazmente. (WHO, 1999) La Asociación Americana de Diabetes la define como una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia generada por fallas en la secreción/producción de insulina, fallas en la acción de la insulina sobre sus tejidos diana o ambas situaciones (Sanofi-Aventis, 2005).

De acuerdo con la OMS, la DM es el tercer problema de salud pública más importante en el mundo. En 1995 la población mundial de diabéticos adultos era de 135 millones, y se proyecta que para el año 2025 llegará a los 300 millones (un incremento del 120%) de los cuales el 40% provendrá de los países desarrollados y el 80% restante de los países en vías de desarrollo. Al comparar la prevalencia en la población de 20 – 79 años en el periodo 2003 - 2005 en Colombia, ésta pasó de 4.3% al 5.8% (Ministerio de protección Social, 2006).

El diagnóstico de la enfermedad se realiza con base a las recomendaciones de la OMS de 1999: se considera que un individuo es diabético cuando sus niveles de glucosa plasmática en ayunas son superiores a 7 mM (126mg/dl) o cuando son superiores a 11,1 mM (200mg/dl) después de 2 h de haber ingerido un bolo de 75 g de glucosa (Who, 1999).

Los pacientes con DM se clasifican tipo 1 y tipo 2 basados en la etiología;

3.1.1. Diabetes tipo 1

El 5-10% de los pacientes diabéticos caen dentro de la categoría de Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) o diabetes dependiente de insulina (IDDM). Estos pacientes son completamente

dependientes de insulina exógena debido a una destrucción autoinmune de las células (Ministerio de protección social, 2006).

La DMT1 se diagnostica tras la aparición de unos síntomas claros durante varios días. La típica tríada de síntomas incluye una gran sed (polidipsia), mucha hambre (polifagia) y pérdida abundante de orina (poliuria) (Who, 1999; Ministerio de la protección Social, 2006). Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte.

3.1.2. Diabetes tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) es mucho más común y afecta al 75-90% de los pacientes diabéticos y constituye un problema de salud pública global por los elevados costos que genera (Draznin et al, 1989; Who, 1999; Shaw et al, 2009).

La DMT2 se caracteriza por una combinación de factores genéticos y ambientales que afectan la capacidad del organismo para responder a las acciones de la insulina.

En este caso la enfermedad es causada por dos factores: 1) resistencia a insulina, definida como la incapacidad de la hormona para suprimir la producción hepática de glucosa y para promover la captación de glucosa por los tejidos periféricos, y 2) una función disminuida de la célula β del páncreas (Flores; 2006; Chapman, 2008).

La resistencia a insulina induce una mayor secreción de ésta por parte de las células β del páncreas, con el fin de compensar de esta manera su acción disminuida; las células β continúan respondiendo progresivamente hasta que fallan, al parecer por factores genéticos, y se inicia una serie de alteraciones metabólicas representadas inicialmente por hiperglicemia de ayuno (HA) e intolerancia a la glucosa, que finalmente llevan al desarrollo de una diabetes manifiesta la cual puede ser controlada inicialmente con cambios en los

hábitos de vida, en especial en la alimentación y aumento de la actividad física, con la ingesta de diversos antidiabéticos orales (ADO) y posteriormente con la administración de insulina (Who, 1999; Matthaiei 2000). Así, la enfermedad se caracteriza por una disminución progresiva de la acción de la insulina, seguida de una incapacidad por parte de la célula β de compensar esta resistencia a las acciones de la hormona.

La terapéutica de la DM se centra en dos objetivos íntimamente relacionados:

- (a) Mejorar la utilización de la glucosa y otros nutrientes en los tejidos (aminoácidos, glicerol, ácidos grasos y cuerpos cetónicos).
- (b) Normalizar al máximo posible los niveles de glucemia sin perturbar de manera notable el estilo de vida del paciente. Como consecuencia, se previenen un buen número de graves complicaciones: retinopatía y aterosclerosis de diversas localizaciones, nefropatía y neuropatía (Who, 1999; Flores, 2003; Ministerio de la protección Social, 2006; Kurtz 2006).

3.2. EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA INSULINA

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos y masa molecular 5.8 kDa que se sintetiza como un precursor inactivo (proinsulina) por las células beta de los islotes de Langerhans pancreáticos, y que en su travesía a través de la ruta exocítica madura mediante modificaciones post-traduccionales que incluyen eliminación proteolítica de un fragmento interno y unión de los dos fragmentos restantes de la cadena polipeptídica mediante formación de puentes disulfuro (Matthaiei et al, 2000; Flores, 2003).

Aunque el efecto *in vivo* más visible de la insulina es la reducción de la glicemia, su influencia real a nivel celular es la de promover el almacenamiento intracelular de energía, acción que se da principalmente a nivel de tres tejidos (LeRoith, 2001; Flores, 2003):

- *hígado*, donde estimula la síntesis de glucógeno e inhibe la conversión de ácidos grasos y aminoácidos en cetoácidos y la de aminoácidos en glucosa (gluconeogénesis).
- *músculo*, donde acelera el transporte de glucosa al interior de la célula y estimula la síntesis de glucógeno al tiempo que inhibe la degradación del mismo.
- *tejido adiposo*, donde favorece el depósito de grasa en forma de triglicéridos, favorece el transporte o captura de glucosa hacia el interior celular y reduce la lipólisis mediante inhibición de la lipasa intracelular.

3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INSULINA

La insulina inicia su acción uniéndose a su receptor, el cual se expresa en células del músculo esquelético, hígado, riñón, cerebro y tejido adiposo (Ullrich 1985; Who, 1999; LeRoith, 2001; Flores, 2003).

El receptor de insulina es una proteína de membrana compuesta de dos subunidades α y dos subunidades β , y pertenece a una subfamilia de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (Ullrich 1985; Giovannone et al, 2000). La insulina se une a la subunidad α extracelular del receptor, induciendo un cambio conformacional que provoca un acercamiento de las dos subunidades. Esto conduce a una rápida auto-fosforilación del receptor en diversos residuos de tirosina localizados en el extremo C-terminal de la subunidad β , que mira hacia el interior celular (White 1988; Mothe 1996) (Figura 1). La fosforilación en residuos de tirosina cercanos, crea un sitio de reconocimiento para el dominio de unión a fosfotirosinas del sustrato del receptor de insulina (IRS) (Figura 1).

Se han descrito doce isoformas de IRS dentro de las cuales se encuentran: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5, IRS-6 y Gab-1. IRS-1 fue el primero en descubrirse y es el encargado de transmitir la señal de la insulina para el transporte de glucosa, síntesis de proteínas, glucógeno, lípidos, mitogénesis y expresión de genes (Mothe 1996). IRS-1 e IRS-2 se expresan en casi toda las células; IRS-3 sólo en tejido adiposo y el IRS-4 en timo, cerebro y riñón (White et al, 1988; White 1998; Giovannone 2000).

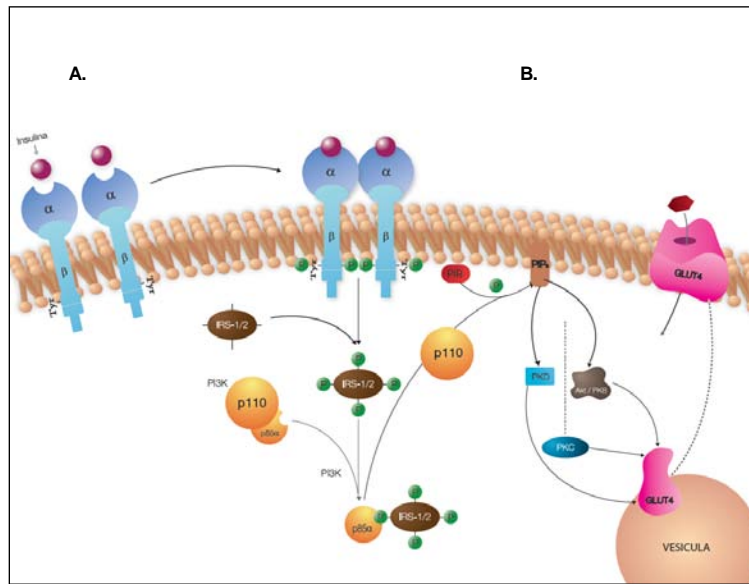


Figura 1. Vía de señalización de insulina: **A.** Estado sin estímulo de insulina **B.** Estado con estímulo de insulina.

Cuando los IRSs interactúan con el receptor de insulina fosforilado, pueden ser fosforilados por éste en diversas tirosinas, creando a su vez nuevos lugares de interacción para otras proteínas (Pederson et al, 2001). Una de éstas es la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), una proteína dimérica consistente en una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85 α) que inhibe la actividad quinasa de p110 por interacción directa con ella. La activación de p110 ocurre cuando IRS es fosforilado en residuos de tirosina e interactúa con la subunidad p85 α , lo cual conduce a liberación de la subunidad p110 activa (Schubert et al, 1996, Flores, 2003). La subunidad p110 activa fosforila varios fosfolípidos de membrana, principalmente el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI 4,5P) para generar fosfatidilinositol 3, 4, 5-Trifosfato (PIP₃). Este último es el encargado de reclutar a la membrana, y activar las proteínas quinasas dependientes de fosfoinositol (PKD1) y Akt/PKB, dos quinasas que median la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina (Hotamisligil et al, 1994; Giovannone et al, 2000). En su forma activa, Akt/PKB fosforila varias proteínas ocasionando efectos metabólicos importantes, como se indicó previamente.

Los efectos de la activación de la vía de señalización de insulina generan diferentes

respuestas celulares, dentro de las cuales se destacan:

- (a) Captura de glucosa a través de la fosforilación de proteínas presentes en las vesículas de almacenamiento de los transportadores de glucosa (GLUT), especialmente de la isoforma GLUT-4 (Bell et al, 1990; Standaert et al, 1997; VanDam et al, 2005).
- (b) Regulación del metabolismo del glucógeno (mayor síntesis, menor degradación) a través de fosforilación de la glucógeno-sintetasa quinasa-3 (GSK3), una enzima que fosforila la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa. (Pederson et al, 2001; Wojtaszewski et al, 2001)
- (c) Regulación positiva de la síntesis de proteínas a través de fosforilación de varias proteínas reguladoras del inicio de la traducción, entre ellos los miembros de la familia FoxO de factores de transcripción (Schubert et al, 1996; VanDam et al, 2005).
- (d) Generación de glicerofosfato, necesario para la esterificación de ácidos grasos y formación de triglicéridos (LeRoith, 2001).
- (e) Expresión de genes que activan la lipoproteína-lipasa del plasma que, al hidrolizar los triglicéridos de las lipoproteínas plasmáticas, proporciona ácidos grasos para su ulterior esterificación dentro de las células (LeRoith, 2001).

3.4. RESISTENCIA A INSULINA

La resistencia a la insulina (RI) es una patología que se define como la incapacidad del organismo de responder normalmente a las acciones de la insulina (Matthaei et al, 2000; Flores, 2003) y es responsable de la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

En condiciones fisiológicas, la señalización a insulina en tejido muscular y adiposo se consigue por regulación llevada a cabo por proteínas que activan o inhiben la vía a distintos niveles (Pederson et al, 2001; LeRoith 2001). Sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas puede darse una desregulación de todo este mecanismo de

control. Entre los factores que inducen desregulación de la vía, y que llevan a resistencia a insulina están los siguientes:

- (a) Factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Hotamisligil et al, 1994; Moller, 2000; Borst, 2004)
- (b) Calcio citosólico (Draznin et al, 1988; Draznin et al, 1989; Mccarty, 2006)
- (c) Ácidos grasos libres (Griffin et al, 1999)
- (d) Estrés del retículo endoplásmico y estrés oxidativo (Ogihara et al, 2004; BlochDamti, 2005; Ge et al, 2008; Kim et al, 2007)
- (e) glucocorticoides (Sakoda et al, 2000; Kajita et al, 2001; Gathercole et al, 2007)
- (f) otros factores (Hresko et al, 1998; Sowers 1998; Bastard et al, 2002; Jager et al, 2007; Chien et al, 2009).

Los mecanismos moleculares que llevan a insulinoresistencia no han sido totalmente esclarecidos. Sin embargo, se han sugerido diferentes hipótesis, una de las cuales postula desensibilización mediada por fosforilación de IRS en residuos de serina y/o treonina (Ser/Thr) en lugar de los residuos de tirosina (Tyr) (Mothe, 1996; Pederson et al, 2001) La fosforilación de IRSs en Ser/Thr podría inducir disociación de IRSs del receptor de insulina, dificultar o disminuir su fosforilación en tirosinas, separar los complejos intracelulares que los mantienen en proximidad al receptor o, incluso, inducir su degradación lo cual reduciría su capacidad de reclutar la PI3K y, por lo tanto, minimizaría la activación de la vía; otro mecanismo descrito postula un aumento en la expresión de p85 α (Draznin, 2006; Adochio et al, 2009), lo cual llevaría a inactivación de la vía debido a que dicha subunidad reclutaría p110 libre, llevando a inhibición de su actividad quinasa; lo anterior genera una serie de respuestas inadecuadas en la vía de señalización corriente abajo que desencadenaría la resistencia a insulina (Standaert et al, 1997) (Figura 2).

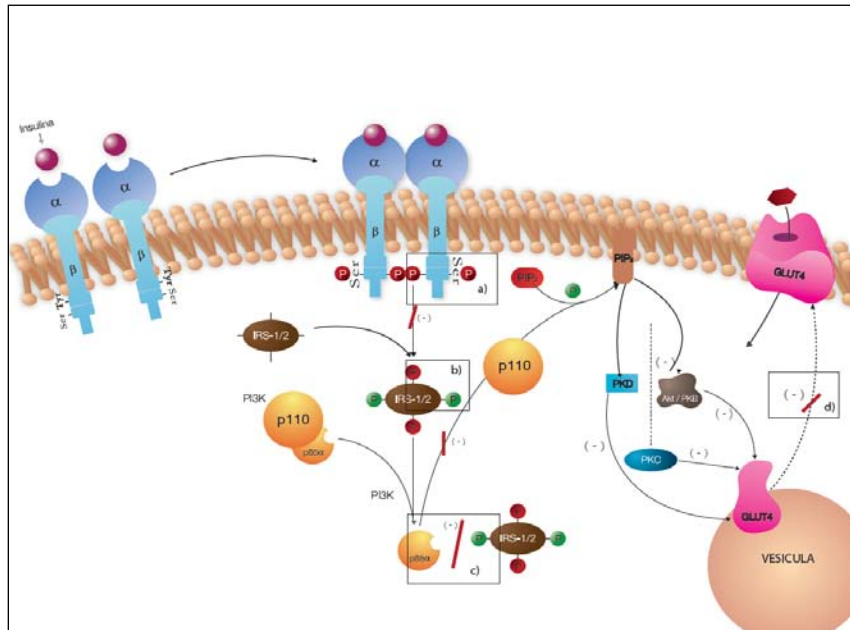


Figura 2. Algunos mecanismos propuestos como responsables de la resistencia a insulina: a) Fosforilación en residuos de serina (Ser) en receptor de insulina b) Fosforilación en residuos de serina en el sustrato del receptor de insulina (IRS) c) Inhibición de subunidad p110 y sus posteriores fosforilaciones d) Inactivación de proteinquinas D y B (PKD-PKB) y activación de proteinquina C generan bloqueo en la translocación del transportador GLUT4.

3.5. EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA DESREGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN A INSULINA

Diferentes investigaciones muestran que los glucocorticoides inducen resistencia a insulina (Caro, 1982; Garvey et al, 1989; Haber, 1992). En patologías complejas tales como el síndrome de Cushing, stress mental, inmunosupresión, y otras, donde se utilizan terapias prolongadas con glucocorticoides, estos fármacos generan resistencia a insulina y diabetes como efecto adverso (Owen, 1973; Moller, 1988; Mlinar et al, 2007).

La resistencia a insulina inducida por glucocorticoides ha sido observada en estudios tanto *in vivo* (Saad et al, 1993; Caperuto et al, 2006; Burén et al, 2008) como *in vitro* (DePirro et al, 1981; Caro, 1982; Sakoda et al, 2000). En músculo esquelético de ratas, y en cultivos celulares de adipocitos, se ha evidenciado que el tratamiento con glucocorticoides disminuye la captura de glucosa inducida por insulina.

Se han sugerido diferentes mecanismos por los cuales los glucocorticoides inducirían resistencia a insulina:

- (a) Alteración en la unión de insulina a su receptor (Olefsky et al, 1975; Kahn et al, 1978; Garvey et al, 1989).
- (b) Disminución de la actividad de la vía debida a la baja fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS-1), esto a pesar de que la proteína se encuentre expresada a alto nivel, lo que conlleva a disminución de la activación de PI3K, que es esencial para la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Caro, 1982; Weinstein et al, 1995).
- (c) Alteración de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática (Garvey et al, 1987; Haber et al, 1992; Weinstein et al, 1995; Sakoda et al, 2000).
- (d) Activación de diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) (Kajita et al, 2001).
- (e) Disminución significativa de los niveles de proteína quinasa B (PKB) y de glucógeno-sintasa (GS) tanto en tejido muscular como en tejido adiposo; estas proteínas son primordiales para la translocación del transportador de Glucosa GLUT 4 y para la utilización de glucosa por parte de la célula (Burén et al, 2008).
- (f) Disminución de la absorción periférica de glucosa debido a que se genera una mayor disponibilidad de ácidos grasos libres y aumento de la lipólisis (DePirro et al, 1981).

Así, bajo ciertas circunstancias fisiológicas o patológicas, ya sea por fosforilación desregulada en residuos de serina/treonina de IRS-1 que interfiere con la fosforilación en tirosinas, o por una desfosforilación desregulada de los residuos de tirosina, la cascada de señalización a insulina puede verse afectada de manera negativa, sin que se conduzca apropiadamente la señal, lo que conduciría a un estado de insulinoresistencia. Asimismo, la expresión alterada de citoquinas, o el efecto de sustancias endógenas o exógenas como los glucocorticoides, ejercen acciones perjudiciales en los tejidos periféricos sensibles a la insulina, induciendo o contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina.

3.6. MODELOS DE ESTUDIO DE DIABETES MELLITUS Y DE RESISTENCIA A INSULINA

Se han desarrollado diversos modelos experimentales para el estudio de la DM y de la RI.

3.6.1. Modelos animales

Las diferentes investigaciones de la actividad hipoglicemiante de extractos de plantas y otro tipo de sustancias se han realizado usando modelos animales tales como ratas, ratones o conejos normales o tratados con estreptozotocina o aloxano para destruir las células β pancreáticas productoras de insulina (Díaz y Ospina, 1990; Ospina et al, 1995; Reed, 1999; Somwar et al, 2005; Murillo y Ospina, 2006; Fröde et al, 2008). Sin embargo, estos modelos requieren largos tiempos de ensayo, presentan un alto grado de variabilidad y son de difícil interpretación en el estudio de los mecanismos moleculares de los extractos o principios activos evaluados.

La DM y la RI pueden presentarse espontáneamente en diversos mamíferos, incluyendo animales domésticos, ganado y animales mantenidos en cautiverio; puede también ser inducida de forma experimental y, en ocasiones, combinarse ambas causas. Los modelos animales de diabetes son tan complejos y heterogéneos como lo es el propio síndrome en humanos. En relación con la complejidad de esta patología, estos animales representan todo el rango de posibilidades, predominando en algunos animales la RI mientras que, en el extremo opuesto, otros sufren disfunción de las células β (Bodkin et al, 1993; Hribal et al, 2002; Arias, 2007;)

Un resumen de los modelos animales más utilizados para la investigación de la DM y de la resistencia a insulina se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Modelos animales de DM y de RI

NIVEL DE ORGANIZACIÓN		INDUCCIÓN DE DIABETES POR	CARACTERÍSTICAS DEL MODELO
<p><i>Animales íntegros</i></p> <p>Son los que más se emplean porque se les evalúa como una entidad y se pueden apreciar aspectos variados desde su conducta, apariencia, tomar datos como la presión arterial (invasiva o no invasiva) es factible la toma de muestras biológicas como orina, sangre y conservar los animales por largo tiempo o tomar muestras de diferentes tejidos para análisis posteriores.</p>	Animales no manipulados genéticamente	1. Estreptozotocina	Se trata de animales de diversas cepas, pueden ser ratones, ratas, conejos y perros. Se les puede inducir a un cuadro “diabético” por medio de fármacos; por medio de una dieta rica en calorías; y por manipulación quirúrgica.
		2. Aloxan	
		3. Nutricional	
		4. Quirúrgico	
	Animales manipulados o seleccionados genéticamente	Ratón ob/ob	Resistentes a leptina, desarrolla obesidad e hiperfagia
		Rata db/db	Deficientes en leptina. desarrolla obesidad e hiperfagia
		Rata BB	Estos ejemplares, presentan diabetes espontánea, con una incidencia del 77% en los machos y 87% en las hembras antes de los 120 días de vida. Son obesos, en el 100% de los animales. Corresponde a un modelo de diabetes tipo I.
		Rata Lewis	Estas ratas son muy utilizadas porque son “altamente” susceptibles a diabetes inducida con estreptozotocina.
		Rata Goto-Kakizaki	Estas ratas no son obesas, exhiben un metabolismo hormonal y vascular similar al del paciente diabético. Corresponde a un modelo de diabetes tipo II
		Ratas Zucker i) delgadas ii) fa/fa	i) Desarrollan hiperlipidemia, hiperglicemia cuando se les alimenta con purina 5008, ii) son obesas y presentan resistencia a la glucosa y nefropatía
Rata TZDN	Desarrolla nefropatía diabética, mimetiza el patrón de la enfermedad con la progresión que se presenta en los pacientes		
Rata SHHF	Estas ratas presentan neuropatía, hipertensión y congestión cardiovascular. Modelo de diabetes tipo II		
Rata 2SF1	Cruce de cepas de las cepas TZDN y SHHR		

Tomado de Arias y Balibrea ,2007

3.6.2. Otros modelos

Existen modelos de investigación que no involucran el uso y manejo de animales; estos se pueden dividir en tres categorías (tabla 2):

- (a) celulares: son aquellos que emplean algún componente celular, o líneas celulares;
- (b) órganos
- (c) tejidos.

Dentro del grupo de las líneas celulares, las células adiposas (adipocitos) representan un modelo muy interesante debido a su alta sensibilidad a la insulina y la posibilidad de evaluar de forma simultánea los efectos de diferentes compuestos sobre la adipogénesis, que es el proceso de diferenciación de una célula precursora en una célula adiposa madura (Todaro, 1963; Reed, 1999). Un sistema experimental conveniente para estudiar la diferenciación adiposa lo constituyen las líneas celulares de preadipocitos 3T3 establecidas a partir de embriones tardíos de ratón suizo (Green et al, 1975). Un ejemplo bien estudiado corresponde a las células 3T3 F442A, las cuales responden a concentraciones fisiológicas de insulina de dos diferentes maneras: dando lugar a la amplificación clonal de los adipocitos recién diferenciados (Ntambi et al, 2000) y estimulando la captación de glucosa por adipocitos maduros. Por lo tanto, las líneas celulares de preadipocitos 3T3, en especial la 3T3-L1, resultan una herramienta valiosa para el escrutinio inicial de compuestos “antidiabéticos” o “sensibilizadores de insulina” y también para la subsecuente caracterización de los mecanismos celulares y moleculares (Reed, 1999).

Tabla 2. Modelos “in vitro” empleados para investigar DM y RI

NIVEL DE ORGANIZACIÓN	¿CÓMO SE INDUCE LA DIABETES?	CARACTERÍSTICAS DEL MODELO	LIMITACIONES Y VENTAJAS
Órganos y Tejidos	Se obtienen de animales diabéticos previamente por manejo farmacológico, quirúrgico nutricional o de alguna cepa específica. También se pueden manipular las condiciones ambientales “in vitro” para originar una condición fisiológica específica	Son órganos como el corazón, o el lecho mesentérico y la aorta. Se mantienen en soluciones fisiológicas por varias horas y se determinan diversos aspectos, por ejemplo la producción de óxido nítrico	Ventajas: son experimentos que se realizan en una sesión de horas, brindan de manera confiable información detallada de una reacción o una respuesta fisiológica. Limitación: no siempre se observa una respuesta congruente con otros modelos
Células	Se compran o se obtienen de animales íntegros.	Se cultivan y se pueden hacer muchas repeticiones en un solo experimento	La ventaja es que se obtiene información precisa de diversos eventos celulares. La limitación es que las células se hallan libres en un medio y en la realidad se hallan integradas formando un todo.
Sub-celular	Se adquieren en forma de “Kit “	Son productos sintéticos y semisintéticos que están diseñados para reaccionar con algún tipo específico de molécula o durante una reacción química.	La ventaja es que cuantifica rápidamente una actividad específica. La limitación: estas reacciones las observamos en un medio artificial y nos da idea de lo que sucede, pero biológicamente puede tener diversas rutas metabólicas y originar diversos productos.

Tomado de Arias y Balibrea ,2007

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CULTIVO Y DIFERENCIACIÓN (ADIPOGÉNESIS) IN VITRO DE LAS CÉLULAS 3T3 –L1

4.1.1. Cultivo y preservación de las células 3T3-L1

Se utilizó la línea de fibroblastos 3T3-L1 derivada de células embriónicas de ratón, que es una línea comprometida a diferenciarse en adipocitos maduros (Green 1974; Green 1975). La línea 3T3-L1 fue adquirida directamente de la ATCC (American Type Culture Collection) y se mantuvo de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se sembraron a una densidad inicial de 2500 células/cm² sobre frascos de cultivo T25, conteniendo 7mL de medio completo DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) alto en glucosa (4,5g/L) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL), piruvato de sodio (110mg/L) y bicarbonato de sodio (3.7g/L).

Las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%, con cambios de medio cada dos días. Cuando el cultivo alcanzaba una confluencia de 60%-80% las células se dividían con una solución de Tripsina-EDTA al 0.25%.

4.1.2. Diferenciación *in vitro* de las células 3T3-L1

Las condiciones de diferenciación para esta línea celular 3T3-L1 fueron establecidas previamente en nuestro grupo (Clavijo 2007; Sandoval 2008).

Las células fueron sembradas a una densidad de 5000 ò 3000 células/cm² en placas de 24 ó 96 pozos, respectivamente. El cultivo se dejó en medio completo hasta alcanzar confluencia; a los dos días post-confluencia las células se pusieron en medio de diferenciación, que consistió en medio completo como se indico antes, suplementado con 1-metil 3-isobutilxantina (IBMX) 0.5mM, dexametasona (DEX) 0,1 µM e Insulina(INS) 10 µg/ml (1.72 µM) por un periodo de 48 horas, y luego mantenidas en medio completo por

un tiempo entre seis y ocho días de diferenciación, con cambios de medio cada dos días (Ntambi 2000; Russell 1976).

4.2. VALORACIÓN DE GLUCOSA POR UN ENSAYO ENZIMÁTICO-COLORIMÉTRICO

Para cuantificar glucosa se implementó un ensayo enzimático-colorimétrico en formato de microplacas (96 pozos). Para esto se utilizó un reactivo comercial (Kit Biosystem, USA).

Las condiciones de reacción descritas por el fabricante sugieren usar 1.0mL de reactivo para 10 μ L de muestra (plasma u orina). En el ensayo aquí implementado, se emplearon 200 μ L de reactivo por cada 2 μ L de muestra (manteniendo así la relación de volumen).

Para evaluar la sensibilidad y linealidad del ensayo en estas nuevas condiciones, se probó diferentes concentraciones de glucosa (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.391, 0.195, 0.098mg/dL), todas ellas preparadas a partir de una solución patrón proporcionada con el kit (100mg/dL). La reacción enzimática se llevó a cabo por 10 minutos a temperatura ambiente, leyéndose la absorbancia en un lector de microplacas (BIORAD Model SSO Microplate Reader). Como control negativo se utilizó agua destilada. La concentración de glucosa se calculó a partir de la siguiente fórmula general, según lo indicado en el Kit.

$$C_M = (A_M / A_P) \times C_P$$

Donde:

C_M: Concentración de la muestra (mg/dl)

A_M: Absorbancia de la muestra

A_P: Absorbancia del patrón

C_P: Concentración del patrón (100mg/dl)

4.3. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE LA CAPTURA DE GLUCOSA EN ADIPOCITOS 3T3-L1

Placas de 24 ó 96 pozos fueron sembradas con 5000 y 3000 células/cm², respectivamente. Dos días después de confluencia, las células fueron inducidas a diferenciarse a adipocitos bajo las condiciones anteriormente descritas; al séptimo día de diferenciación, las células fueron mantenidas en un medio OptiMEM (Gibco) sin glucosa (en ayuno) por una hora.

Luego del ayuno, las células fueron expuestas a medio OptiMEM suplementado con glucosa 13mM (214mg/dl) y diferentes concentraciones de insulina (Sigma-Aldrich (St Louis, USA): 0nM, 10nM, 100nM, 1000nM, según lo descrito por diferentes autores (Matthaei 1992; Janez 2000; Yang 2007; Takahashi 2008). A distintos tiempos de tratamiento (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas), se cuantificó la glucosa residual en el medio de cultivo. La diferencia entre la glucosa inicial y la residual es una medida del consumo de glucosa. En este trabajo sólo se representan los valores de glucosa residual en el medio. La curva dosis respuesta a insulina, para establecer la concentración óptima de esta hormona, se realizó con las siguientes concentraciones de hormona: 0nM, 15,625nM, 31,25nM, 62,5nM, 125nM, 250nM, 500nM, 1000nM, 2000nM, 4000nM, 5000nM y 10000nM. En todos los casos, al finalizar el tratamiento respectivo, se cuantificó la glucosa según el ensayo descrito anteriormente. Como blanco reactivo se utilizó medio OptiMEM sin glucosa.

4.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE LAS CÉLULAS 3T3-L1

Para estudiar el efecto de la dexametasona (glucocorticoide) sobre la captura de glucosa, se utilizaron adipocitos diferenciados por 8 días, los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de dexametasona por un periodo de 48 horas, según trabajos de otros

autores (Kajita 2001; Gathercole 2007). Las concentraciones de dexametasona ensayadas fueron: 0, 0,1, 1,0, 5,0, 10, 50, 100, 500, 1000 nM (todos en las mismas unidades de concentración: nM) (Ishizuka 1997; Sakoda 2000; Kajita 2001; Klein 2002).

Luego de la exposición al glucocorticoide por 24 ó 48 horas, el medio se reemplazó por medio de ayuno (OptiMEM) por una hora y se procedió a suplementar el medio con glucosa a la concentración establecida anteriormente y se hizo la estimulación de la captura de glucosa por parte de los adipocitos con dos concentraciones diferentes de insulina (1000 y 2500 nM) de acuerdo a los resultados de la curva dosis-respuesta determinada experimentalmente. Luego de 16 horas de exposición a insulina, se cuantificó la glucosa residual en el medio.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- (a) Ensayo enzimático-colorimétrico de valoración de glucosa en formato de microplaca (96 pozos): Los resultados experimentales obtenidos de esta evaluación fueron analizados mediante una regresión lineal y expresados como el promedio \pm desviación estándar de la media.
- (b) Valoración de la glucosa residual en el medio de cultivo: Los resultados experimentales obtenidos, se analizaron usando el software SPSS por análisis de varianza simple, y fueron expresados como el promedio y la desviación estándar.
- Se evaluaron las diferencias entre los diferentes tratamientos vs. control con un valor de significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.001$.
- (c) Evaluación de tiempo óptimo de consumo de glucosa y evaluación del efecto de Dexametasona sobre el consumo de glucosa por parte de las células 3T3-L1 en condiciones basales o estimuladas con insulina: Los resultados experimentales obtenidos se analizaron usando el software SPSS por análisis de varianza simple, y fueron expresados como el promedio y la desviación estándar. Se evaluaron las

diferencias entre los diferentes tratamientos vs. Control con un valor de significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.001$.

Para la determinación de la concentración óptima de insulina y de dexametasona se realizó una curva dosis respuesta, expresando los resultados con la forma de ecuación logarítmica.

Para cada una de las evaluaciones, en aquellos casos en los cuales se encontraron diferencias significativas se procedió a realizar comparaciones múltiples mediante los métodos de Tukey y la prueba C de Dunnet.

5. RESULTADOS

5.1. ESTANDARIZACION DE UN ENSAYO NO RADIATIVO PARA DETERMINACION DE GLUCOSA EN MICROPLACAS DE 96 POZOS

5.1.1. Implementación De Un Ensayo Para Cuantificar Glucosa

El trabajo inició con la implementación de un método ~~enzimático~~ colorimétrico comercializado para la determinación de glucosa en muestras sangre y orina (Kit Biosystems). La idea era aplicar posteriormente este ensayo para valorar glucosa residual en el medio de cultivo.

El método se implementó en nuestro laboratorio en un formato de microplacas de 96 pozos, para lo cual fue necesario reducir por un factor de 5 los volúmenes de muestra y reactivo sugeridos por el fabricante. Así, en lugar de mezclar 1 ml de reactivo con 10 ul de muestra, como sugería el fabricante del kit, en nuestro procedimiento se utilizó un volumen final cinco veces inferior de cada componente de la reacción (200 ul de reactivo, 2 ul de muestra). Bajo estas condiciones, fue necesario evaluar la sensibilidad y linealidad de la respuesta del método implementado. Para esto se realizaron diluciones seriales de glucosa, procediendo a la cuantificación de ésta según lo indicado en Materiales y Métodos.

La figura 3A muestra que, bajo las nuevas condiciones de reacción (2ul de muestra por cada 200ul de reactivo), el ensayo presenta buena linealidad en un amplio rango de concentraciones (0,39 a 200mg/dl), con un coeficiente de correlación de 0.9996. La Figura 3B corresponde a la zona de baja concentración de glucosa (0 a 6,25 mg/dl) del mismo gráfico, que en la Figura 3A no logra apreciarse con detalle. Como se observa en la figura 3B, la respuesta lineal se mantiene, con la única excepción de los dos puntos de concentración inferior a 0,391 mg/dl, los cuales se desvían de la linealidad, indicando que el límite de sensibilidad determinado experimentalmente para estas condiciones es 0,391 mg/dl.

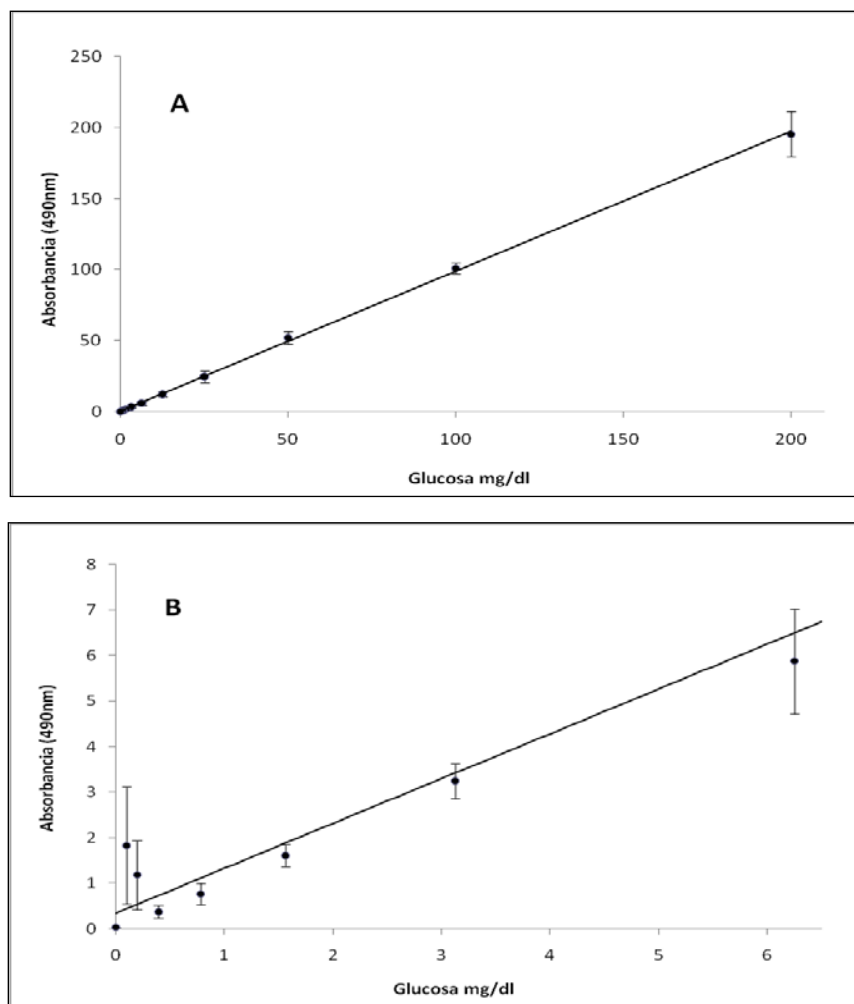


Figura 3. A. Determinación de la linealidad y sensibilidad del ensayo de glucosa en microplacas de 96 pozos. Se ensayaron diluciones seriales de glucosa entre 0 y 200 mg/dl. B. Se muestra la respuesta para la zona de baja concentración de glucosa del gráfico en (0, 0.098, 0.196, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125 y 6.25 mg/dl). Los dos últimos puntos de concentración están por debajo del límite de detección de la técnica, desviándose de la linealidad. Los puntos representan los valores experimentales; la línea trazada representa el ajuste matemático según la ecuación de la recta $y=mx+b$ donde $m=0.9844$ y $b=0.3363$ ($r^2=0.9996$). Se representa el promedio y la desviación estándar de tres ensayos diferentes ($n=3$), cada uno realizado por triplicado.

5.1.2. Cuantificación de la glucosa residual en el medio de adipocitos 3T3-L1

Luego de determinar que el ensayo de glucosa en microplacas presenta buena sensibilidad y linealidad, se aplicó para cuantificar glucosa en el medio de cultivo de los adipocitos 3T3-L1 bajo condiciones basales y estimuladas con insulina.

Para esto, los adipocitos fueron sometidos a un ayuno de glucosa por 1 hora, y luego se incubaron en un medio OptiMEM suplementado con glucosa 13nM (214mg/dl) en

presencia de diferentes concentraciones de insulina (0, 10, 100, 1000nM) y por diferentes tiempos de tratamiento (0-16 horas). Dicha concentración de glucosa simula los valores plasmáticos observados después de la administración de una carga de glucosa a un paciente (Who, 1999; SanofiAventis, 2005).

Para células sembradas en placas de cultivo de 24 pozos, los resultados se muestran en la figura 4, donde se observa que existe una respuesta dependiente del tiempo y de la dosis de tratamiento. En efecto, se observa que la insulina, a concentración de 1000nM por 16 horas, estimuló una clara respuesta en los adipocitos, evidenciado por el cambio en la concentración de glucosa en el medio de cultivo, que disminuyó, de manera significativa, un 70% respecto de las células control sin insulina ($p<0,001$). A tiempos menores de estimulación (0, 15, 30 y 60 minutos), no se observaron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones de insulina ensayadas. Sin embargo, aunque no significativos, los valores reportados para el tiempo 15 minutos e insulina 100nM parecen sugerir un leve descenso de la cantidad de glucosa en el medio, lo que podría indicar una cierta tendencia de captura inicial de glucosa por parte de las células.

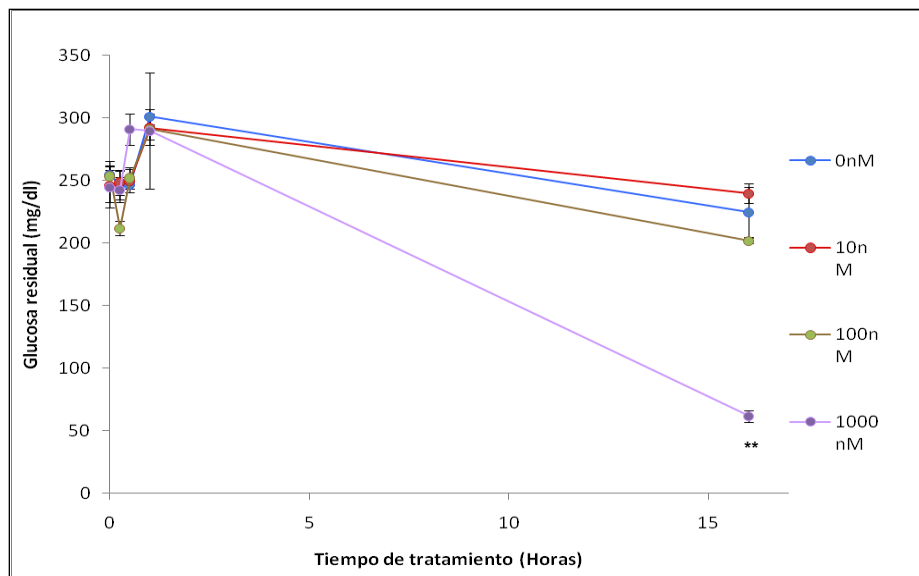


Figura 4. Glucosa residual en el medio de cultivo de adipocitos cultivados en placas de 24 pozos y estimulados con diferentes concentraciones de insulina (0, 10, 100 y 1000 nM) y por distintos tiempos de tratamiento (0, 0.25, 0.5, 1 y 16 horas). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de un experimento realizado por duplicado. (** $p<0,001$).

Teniendo en cuenta el interesante resultado anterior, se decidió profundizar en dicha respuesta, para lo cual se ensayaron nuevos tiempos intermedios de tratamiento y se cambió las células a un formato de placas de cultivo de 96 pozos, lo que nos permitía trabajar con más réplicas en un mismo experimento. Así, los experimentos sucesivos se realizaron con tres a cuatro réplicas por experimento. Para estos nuevos ensayos se mantuvo la concentración de glucosa inicial evaluada anteriormente (13mM ó 214 mg/dl).

La figura 5 muestra los resultados del tratar adipocitos 3T3-L1 con diferentes concentraciones de insulina (0, 10, 100, 1000 nM) por diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 4, 8, 12 y 16 horas). Estas células fueron cultivadas en microplacas de 96 pozos. Se observa que el tratamiento con insulina 100 y 1000nM, por tiempos iguales ó mayores a 4 h, causó una disminución significativa de la concentración de glucosa en el medio de cultivo comparado con el control sin insulina. El máximo efecto se logra a 12 y 16 horas de tratamiento, donde insulina 100nM provocó una disminución en la glucosa del medio del 57 y 61%, respectivamente. Por su parte, el tratamiento con insulina 1000nM por los mismos tiempos, resulto en reducción del 64 y 67%, respectivamente, en la glucosa residual.

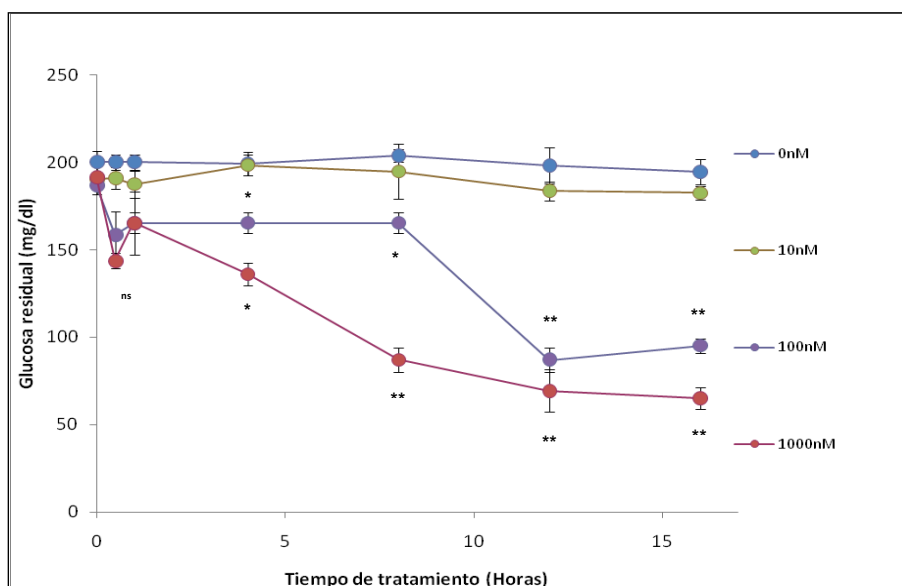


Figura 5. Glucosa residual en medio de cultivo de células cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de insulina (0, 10, 100 y 1000 nM) por distintos tiempos (0, 0.5, 1, 4, 8, 12 y 16 horas). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de dos experimentos, cada uno realizado por cuadruplicado. (*p<0,005; **p<0,001; ns: no significativo). La significancia se establece para las concentraciones de 100 y 1000nM. El descenso observado para la concentración de 1000nM a los 60 minutos se evidencia mas no es significativo (ns).

También se observó que, a tiempos de 30 y 60 minutos, se presenta un descenso de aproximadamente 20% en la glucosa residual en el medio para las concentraciones de 100 y 1000nM que, aunque no es un cambio estadísticamente significativo, sí podría reflejar una tendencia (posiblemente una captura temprana de glucosa por parte de las células). Esta observación concuerda con lo visto para los valores de 15 minutos y 100nM de insulina en la placa de 24 pozos (Figura 4).

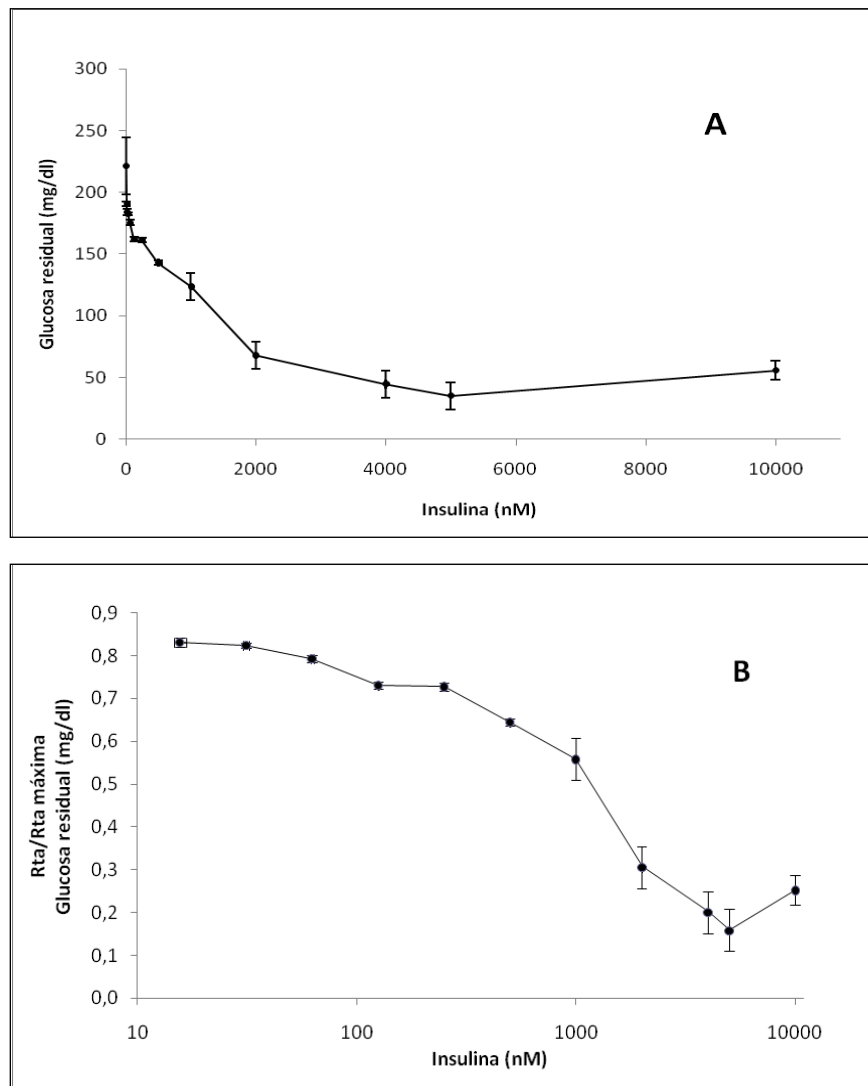


Figura 6. Curva dosis respuesta a insulina. A. Estimulación de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de insulina (0, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 5000 Y 10000 nM). B. Respuesta fraccional (respuesta/respuesta máxima) en función de la concentración de insulina (en escala logarítmica, con base 10). La cuantificación de la glucosa residual en el medio se realizó a las 16 h de tratamiento con insulina. Se representa el promedio y la desviación estándar de dos experimento, cada uno realizado por cuadruplicado.

Hasta aquí, los resultados nos permitían seguir trabajando en cultivos con microplacas de 96 pozos, y con tratamientos de insulina por 16 h. A continuación, se realizó un experimento de dosis-respuesta a insulina. Los resultados se presentan en la Figura 6. En la figura 6A se muestran los datos graficados en forma de la concentración de glucosa residual en función de la concentración de insulina. La figura 6B, por su parte, muestra los mismos datos, esta vez expresados en forma de una función logarítmica. Los resultados claramente indican una respuesta dependiente de la dosis de insulina, con un efecto semi-máximo observado a una concentración de insulina de aproximadamente 1000nM (EC_{50}).

5.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA POR PARTE DE LAS CÉLULAS 3T3-L1.

Luego de haber implementado un ensayo para cuantificar glucosa en el medio de cultivo, se procedió a inducir resistencia a insulina en los adipocitos mediante tratamiento con dexametasona por 48 h, un conocido agente farmacológico que interfiere negativamente en la acción de la insulina.

Los adipocitos 3T3-L1 fueron primero tratados con diferentes concentraciones de dexametasona por 48 h, y luego estimulados con insulina por 16 h, según se indica en la Figura 7. Se observa que, en ausencia de dexametasona, el tratamiento con insulina 1000 nM redujo la concentración de glucosa en el medio en un ~25% respecto del control sin tratar ($p < 0.001$), indicando que las células son sensibles a la insulina (Figura 7A). El tratamiento con dexametasona 0,1 nM fue incapaz de bloquear este efecto de la insulina, indicando que el glucocorticoide, a esa concentración, no afectó la respuesta a la insulina. Sin embargo, a concentraciones superiores de dexametasona, comienza a observarse una disminución en el efecto de la insulina sobre el consumo de glucosa de los adipocitos, evidenciando el fenómeno de resistencia a insulina inducido por los glucocorticoides. En efecto, a dexametasona 1nM, la glucosa residual en el medio fue un 83 % del control, mientras que a concentraciones superiores (10, 100 y 1000nM), el glucocorticoide

suprimió completamente el efecto de la insulina, evidenciando un fenotipo de insulinoresistencia de las células bajo estas condiciones.

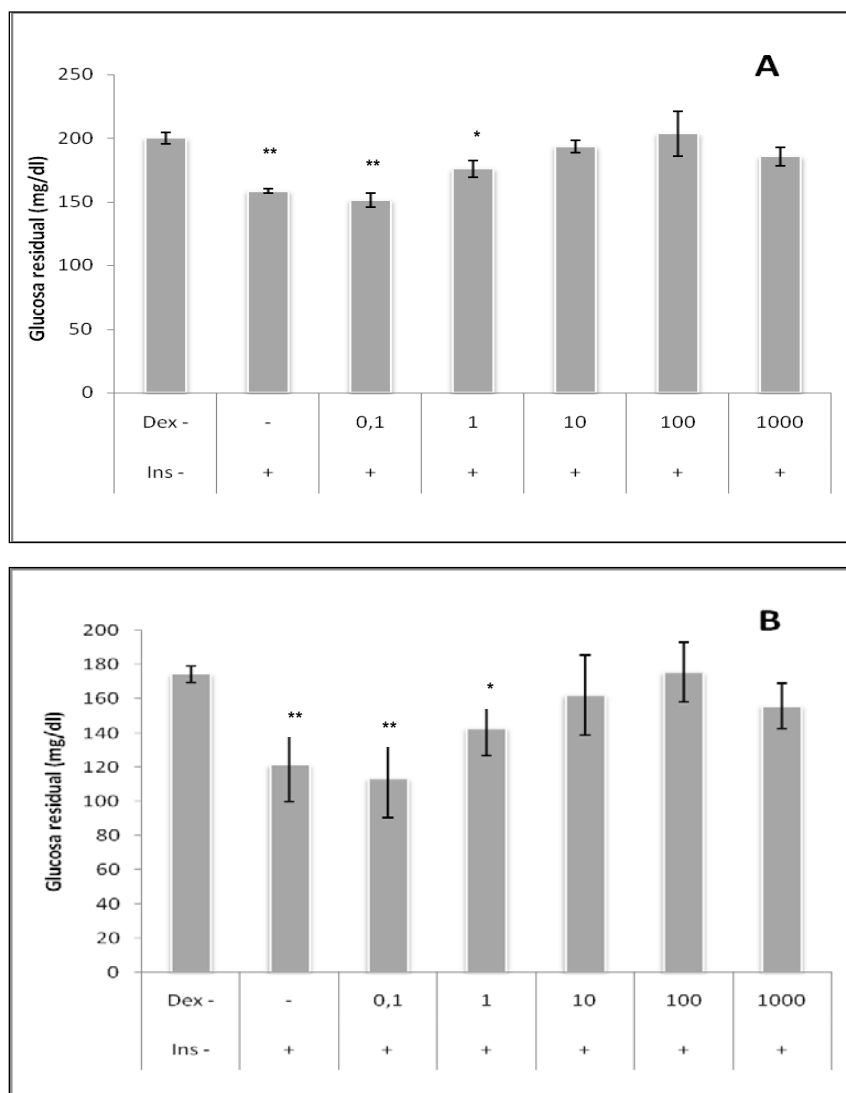


Figura 7. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de dexametasona (0, 0,1, 1,0, 10, 100, 1000nM) sobre el consumo de glucosa de los adipocitos 3T3-L1. Las células fueron tratadas con dexametasona por 48 h, y luego estimuladas con insulina 1000 nM (A) y 2500nM (B) por 16 h. La respuesta se representa como glucosa residual después del estímulo por 16 h con insulina. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de un experimento realizado por triplicado (*p<0,05; **p<0,001)

Asimismo, el tratamiento con insulina a una dosis superior (2500nM) disminuyó la concentración de glucosa en el medio un 32 % respecto del control (Figura 7B; p<0.001). Similar a los observado en la Figura 7A, dexametasona 0,1nM no afectó la respuesta a

insulina, mientras que concentraciones superiores del glucocorticoide (1, 10, 100, 1000nM) disminuyeron o anularon completamente la respuesta a esta hormona, indicativo de un fenotipo de insulinoresistencia de las células (Figura 7B).

6. DISCUSIÓN

6.1. IMPLEMENTACION DE UN ENSAYO NO RADIATIVO PARA DETERMINACION DE GLUCOSA EN FORMATO DE MICROPLACAS

El presente trabajo constituye la parte preliminar de un proyecto tendiente a implementar y disponer de un modelo celular *in vitro* de resistencia a insulina en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

La existencia de modelos celulares de resistencia a insulina no es algo nuevo en el contexto internacional, donde se emplean diferentes líneas celulares derivadas de tejidos sensibles a la insulina como el tejido muscular, hígado y tejido adiposo. En general, en la mayoría de estos modelos se cuantifica directamente el ingreso (captura) de glucosa a las células en respuesta a la estimulación con insulina, lo cual se realiza a los pocos minutos de aplicado el estímulo (de 1 a 10 minutos); se utiliza para ello, derivados radiomarcados de glucosa ($[^3\text{H}]$ -2-deoxiglucosa, D-[U- ^{14}C]-glucosa y $[^{14}\text{C}]$ -2-deoxiglucosa, entre otros), y la captura de glucosa se determina por cuantificación del radioisótopo incorporado en la célula desde el medio de cultivo, a través del uso de un equipo de alto costo como es un contador de centelleo líquido (LSC) (Draznin et al, 1987; Ishizuka et al, 1999; Ross et al, 2000; Li et al, 2000; Kajita et al, 2001; Takaguri et al, 2008).

Disponer de un equipo Contador de centelleo líquido no es algo fácil. De hecho, existen contados equipos en el país, y ninguno de ellos se encuentra en nuestro Departamento de Farmacia, lo que representaba una gran limitación para la implementación de este tipo de modelos en nuestro Departamento.

Nuestro grupo de investigación pensó, entonces, en la posibilidad de desarrollar e implementar un modelo celular de resistencia insulina basado en procedimientos no radiactivos, y que pudiera llevarse a cabo con los equipos disponibles actualmente en el Departamento. Así, se pensó en dos posibilidades alternativas al uso de radioisótopos: (i) fluorescencia; (ii) colorimetría.

Una revisión exhaustiva de la literatura, antes de iniciado este proyecto, nos reveló que ya se han descrito procedimientos basados en fluorescencia para valorar el ingreso de glucosa a las células. En efecto, mediante la utilización de derivados fluorescentes de glucosa, incluyendo α -N-(2-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxiglucosa (2-NBDG), entre otros, se puede cuantificar el ingreso de glucosa a la célula a través de la cuantificación de la fluorescencia emitida por tales derivados con técnicas costosas tales como la microscopía de fluorescencia acoplada con sistema de video-imágenes y software de análisis de imágenes, procedimientos que se han empleado en modelos de células procariotas (Yoshioka et al, 1996) y animales, incluyendo células pulmonares (Leira et al, 2002), células mamarias (Yamada et al, 2007) y células tumorales (Oneil et al, 2005). En todos estos procedimientos se mide, de manera directa, la glucosa que ingresa a las células, mediante detección de la fluorescencia celular después del estímulo con insulina.

Por otro lado, aunque diferentes métodos colorimétricos han sido descritos para la cuantificación de glucosa, incluyendo métodos químicos (Benedict, Ferrocianuro, o-toluidina, etc) y enzimáticos (glucosa oxidasa, hexoquinasa y glucosa deshidrogenasa) (Passey et al, 1977.), que han permitido la valoración de glucosa en diferentes tipos de muestras biológicas, en especial sangre y orina, ninguno de ellos ha sido utilizado en la evaluación de glucosa en muestras provenientes de cultivos celulares. La razón de esto, probablemente, sea la menor sensibilidad de un método colorimétrico comparado con los métodos basados en radiactividad y fluorescencia ya descritos.

Nuestro grupo de investigación decidió comenzar a evaluar la potencial aplicación de un método colorimétrico para cuantificar ingreso de glucosa a células adiposas, a través de la medición de la glucosa remanente en el medio de cultivo después del estímulo con insulina. Los sistemas comerciales actuales para cuantificar glucosa en muestras clínicas (sangre y orina), están basados en el método de Trinder's para cuantificación de glucosa, que consiste en la utilización de dos reacciones enzimáticas acopladas (Glucosa oxidasa y peroxidada) para formar un compuesto coloreado que absorbe a 49500nm (Lott et al,

1975; Dobrick, 1958). En este trabajo se muestran los resultados obtenidos al aplicar este procedimiento a nuestro cultivo de células adiposas.

El kit utilizado fue el de Biosystems (USA), que tiene unas condiciones ya estandarizadas para la determinación de glucosa en muestras clínicas; las condiciones de reacción descritas por el fabricante sugieren usar 1.0mL de reactivo para 10 μ l de muestra (plasma u orina). Sin embargo, debido a que se pretendía implementar un ensayo en microplacas de 96 pozos, se disminuyó el volumen de reacción por un factor de 5 respecto a lo recomendado por el fabricante. Debido al cambio aplicado, se decidió primero estudiar la respuesta del kit bajo estas nuevas condiciones, para lo cual se evaluó la sensibilidad y linealidad de respuesta del ensayo implementado (Figura 3). Se observó linealidad y buena correlación en un rango amplio de concentraciones de glucosa (0,39 a 200mg/dL; $r^2=0.9996$). En cuanto a sensibilidad, mientras el fabricante reporta un límite de sensibilidad de 0.23mg/dl, en nuestro ensayo y bajo las nuevas condiciones se pudo determinar un valor de 0.39mg/dl, algo inferior al reportado por el fabricante del kit. Esta diferencia, posiblemente se deba a la reducción de volúmenes en nuestro ensayo. Aún así, el ensayo implementado presentó buena sensibilidad para la continuación del trabajo y para las proyecciones que se tenían para el desarrollo del objetivo planteado.

Para la implementación del ensayo de glucosa en el medio de cultivo se tomaron como referentes diversos protocolos establecidos para los métodos radioactivos y fluorescentes. Rosen et al (1978) y Draznin et al (1987) reportan la preparación de una suspensión celular y un lavado de las células previo al tratamiento con insulina (5 y 60 minutos respectivamente), posterior a esto se incorpora el sustrato radiomarcado hasta 10 minutos. Kajita et al (2001) establece la incubación de una suspensión celular durante 30 minutos con insulina previo a la exposición durante 5 minutos al sustrato radiomarcado. En el caso de la metodología utilizada por Bastard et al (2002), la incubación con insulina se realiza durante 60 minutos antes de la exposición al sustrato radiomarcado el cual está en contacto con las células durante 30 minutos. Para el caso de utilización de

fluorescencia, se reporta la incubación de las células con el análogo fluorescente por tiempos entre 5 y 120 minutos (Leira et al, 2001). En todos los casos, la concentración de insulina utilizada variaba entre 0.1 y 1000nM, no existiendo un consenso en la concentración de insulina para la adecuada estimulación de la captura de glucosa.

Inicialmente, nuestros experimentos se enfocaron en cuantificar glucosa residual en el medio de cultivo después de estimular con diferentes concentraciones de insulina por tiempos breves de tratamiento (5 a 30 min). Bajo estas condiciones, no se observaron cambios significativos respecto al control. Debido a esto, se decidió ayunar de glucosa las células y aumentar el tiempo de estimulación con insulina (hasta 16 h). Esto nos daría una idea del comportamiento de la técnica, y definiría si la metodología planteada era útil para continuar con el estudio.

Se realizó la evaluación de las nuevas condiciones en placas de cultivo de 24 y de 96 pozos. La respuesta de las células a altas concentraciones de insulina (100 y 1000nM) por 12 ó 16 h de tratamiento, fue significativa, con un descenso en la glucosa residual de aproximadamente un 50 a 70% comparado con el control. El hecho de observar respuesta a tiempos largos de tratamiento (> 4h) indica que la respuesta no sólo se debe a captura de glucosa, sino también a la metabolización (consumo) de la misma en los procesos de glucólisis y lipogénesis por parte de la célula adiposa.

En este trabajo empleamos el término “consumo” de glucosa para referirnos al conjunto de procesos estimulados por insulina (captura y metabolismo). En este sentido, nuestro modelo se diferencia de los modelos previamente descritos por otros autores, que mayoritariamente se enfocan, exclusivamente, en el proceso de captura de glucosa. A pesar de esto, pensamos que nuestro modelo es válido y relevante como modelo de estudio, porque representa mejor el estado fisiológico de resistencia a insulina; cabe anotar que no se puede hacer una determinación de la glucosa que es utilizada para uno u otro proceso metabólico de la célula, solo una determinación que describe un cambio

representativo en la glucosa y que pudo ser medido por nuestra metodología lo que le da un valor adicional con respecto a otros métodos que no simulan las condiciones “crónicas” de la resistencia a insulina

La concentración de insulina adecuada para los tratamientos sucesivos se obtuvo a partir de curvas dosis-respuesta, donde se observó que el efecto de insulina es dosis dependiente (Figura 6). Se determinó un valor de EC_{50} de $\sim 1000\text{nM}$ insulina. Fue interesante observar que la respuesta no fue comparable con los ensayos anteriores, donde la misma concentración de insulina inducía una disminución de casi un 70% en la glucosa residual. Esto indica que las células disminuyeron su capacidad de respuesta a la hormona. No tenemos claras las razones por las cuales pudieron haberse dado estos cambios en la respuesta a insulina. Una posibilidad pudiese ser el cambio de lotes celulares durante el desarrollo de estos ensayos ya que, por problemas de contaminación, se tuvieron que descongelar nuevos viales de células que pudieran tener diferente sensibilidad a la hormona. Otra posibilidad es que las nuevas células descongeladas no se diferenciaron en igual proporción a las células que se venían utilizando y, dado que la sensibilidad a insulina es mayor en el estado diferenciado, esto explicaría la menor respuesta. Otra razón pudo ser el cambio de reactivo insulina; de hecho, en esa etapa del trabajo, se acabó la insulina que veníamos utilizando y se debió comprar una nueva, con diferente número de lote. Es posible que el nuevo reactivo no tuviera el mismo efecto biológico sobre las células o de alguna manera no pudiera unirse adecuadamente a los receptores, sin embargo ésta es solo una hipótesis pues no se puede determinar la razón por la cual hubo una menor respuesta por parte de las células.

Debido a lo anterior, en los experimentos sucesivos, el estímulo se realizó con insulina a concentración 1000nM y 2500nM . Con esto, nos asegurábamos una estimulación significativa de las células.

Los resultados obtenidos (Figuras 4, 5, 6) llevaron a establecer las condiciones preliminares para determinar consumo de glucosa en un modelo de resistencia a insulina.

6.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA DE LAS CÉLULAS 3T3-L1.

Bajo las condiciones implementadas se procedió a evaluar el efecto de un glucocorticoide (dexametasona) sobre el consumo de glucosa por parte de los adipocitos 3T3-L1.

Según lo reportado en la literatura, los glucocorticoides ejercen un efecto negativo sobre la acción de la insulina cuando se administran por periodos prolongados, generando en las células un estado de resistencia a la insulina (Klein et al, 2002; Buren et al, 2008). Las concentraciones reportadas en los ensayos que se ha observado resistencia a insulina varían entre 10 y 100nM, y tiempos de exposición de 24, 48 y 72 horas (Garvey et al, 1987; Haber, 1992; Kajita et al, 2000). Teniendo en cuenta tales datos, se procedió a evaluar en nuestro modelo el efecto de la dexametasona sobre el consumo de glucosa estimulado por insulina.

El efecto inductor de resistencia a insulina del glucocorticoide se evidenció claramente en la Figura 7, donde se aprecia que dexametasona 10, 100, y 1000nM anuló completamente el efecto de insulina (1000 ó 2500 nM).

Por último, es esencial destacar aquí que lo más importante de este trabajo es que se aplicó un método enzimático-colorimétrico simple y económico para implementar un ensayo de cuantificación de consumo de glucosa en un modelo celular de adipocitos en cultivo, Adicionalmente, el ensayo implementado, se aplicó, de manera exitosa, a un modelo celular de resistencia a insulina inducida por glucocorticoides.

7. CONCLUSIONES

1. Se implementó un nuevo ensayo no radiactivo, sencillo y económico para medir consumo de glucosa, en formato de microplacas (96 pozos), en células animales en cultivo.
2. Se iniciaron trabajos tendientes a desarrollar un modelo celular de resistencia a insulina, estableciendo las condiciones preliminares de tratamiento con dexametasona de los adipocitos 3T3-L1.

8. PROYECCIONES

Los resultados preliminares de este trabajo representan una clara innovación, y una importante alternativa a los procedimientos actuales utilizados en el estudio de la resistencia a insulina desde el punto de vista de los ensayos *in vitro* con modelos celulares. Las grandes ventajas del ensayo implementado, respecto de los métodos convencionales actuales, son su sencillez y economía, esto porque no se requieren equipos sofisticados de alto costo como los descritos anteriormente en este documento, ni tampoco la utilización de personal calificado en el manejo de tales instrumentos, haciéndolo apropiado para su utilización en países en vías de desarrollo donde es difícil contar con equipos sofisticados.

La implementación del ensayo en un formato de microplacas de 96 pozos lo convierte en un ensayo susceptible de ser automatizado en un futuro cercano, y aplicable como método de rutina no sólo para el *screening* de nuevas moléculas con potencial sensibilizador a insulina (antidiabético), sino también como potencial método de diagnóstico en el laboratorio clínico, ya que podría proyectarse como un ensayo alternativo para evaluar la insulinoresistencia. Por último, puede llegar a ser un método de utilidad en los estudios tendientes a descifrar los mecanismos implicados en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo-2.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adochio, R., Leitner, J. W., Hedlund, R., & Draznin, B. (2009). Rescuing 3T3-L1 adipocytes from insulin resistance induced by stimulation of akt-mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase (S6K1) pathway and serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: Effect of reduced expression of p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and S6K1 kinase. *Endocrinology*, *150*(3), 1165-73.
- Arias, j., & Balibrea, j. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr. Hosp*, 160-168.
- Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., et al. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(5), 2084-9.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., et al. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, *13*(3), 198-208.
- Bloch-Damti, A., & Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(11-12), 1553-67.
- Bodkin, N. L., Ortmeyer, H. K., & Hansen, B. C. (1993). Diversity of insulin resistance in monkeys with normal glucose tolerance. *Obesity Research*, *1*(5), 364-70.
- Borst, S. E. (2004). The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine*, *23*(2-3), 177-82.
- Borst, S. E., Conover, C. F., & Bagby, G. J. (2005). Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine*, *32*(1), 39-44.
- Brindley, D. N., Wang, C. N., Mei, J., Xu, J., & Hanna, A. N. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and ceramides in insulin resistance. *Lipids*, *34 Suppl*, S85-8.
- Burant, C. F., Sivitz, W. I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., et al. (1991). Mammalian glucose transporters: Structure and molecular regulation. *Recent Progress in Hormone Research*, *47*, 349-87; discussion 387-8.
- Burén, J., Lai, Y. C., Lundgren, M., Eriksson, J. W., & Jensen, J. (2008). Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *474*(1), 91-101.
- Caperuto, L. C., Anhê, G. F., Amanso, A. M., Ribeiro, L. M., Medina, M. C., Souza, L. C., et al. (2006). Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. *Endocrine*, *29*(3), 391-8.
- Carlson, C. J., & Rondinone, C. M. (2005). Pharmacological inhibition of p38 MAP kinase results in improved glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *54*(7), 895-901.
- Caro, J. F., & Amatruda, J. M. (1982). Glucocorticoid-Induced insulin resistance: The importance of postbinding events in the regulation of insulin binding, action, and degradation in freshly isolated and primary cultures of rat hepatocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, *69*(4), 866-75.
- Chapman, M. J., & Sposito, A. C. (2008). Hypertension and dyslipidaemia in obesity and insulin resistance: Pathophysiology, impact on atherosclerotic disease and pharmacotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *117*(3), 354-73.

- Chien, C. S., Cheng, S. C., Wu, H. T., Tsao, C. W., & Cheng, J. T. (2009). Insulin resistance induced by glucosamine in fructose-fed rats. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*, 41(7), 542-7.
- Chiou, G. Y., & Fong, J. C. (2004). Prostaglandin f2alpha increases glucose transport in 3T3-L1 adipocytes through enhanced GLUT1 expression by a protein kinase c-dependent pathway. *Cellular Signalling*, 16(4), 415-21.
- Clavijo, Gomez, & Gomez (2007). Adipogenesis in vitro de células 3T3-L1. *Revista Med*, 15, 170-176.
- De Pirro, R., Green, A., Kao, M. Y., & Olefsky, J. M. (1981). Effects of prednisolone and dexamethasone in vivo and in vitro: Studies of insulin binding, deoxyglucose uptake and glucose oxidation in rat adipocytes. *Diabetologia*, 21(2), 149-53.
- Desrois, M., Sidell, R. J., Gauguier, D., King, L. M., Radda, G. K., & Clarke, K. (2004). Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular Research*, 61(2), 288-96.
- Díaz, G. E. Ospina Giraldo, L. F. (1990). Comprobación de la actividad hipoglicémica de las hojas de eucalyptus globulus labill en ratones hiperglicémicos por administración de aloxano. Tesis de grado Químico Farmacéutico. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia
- Dobrick, L. (1958). Screening method for glucose of blood serum utilizing glucose oxidase and an indophenol indicator. *The Journal of Biological Chemistry*, 231(1), 403-9.
- Draznin, B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: The two sides of a coin. *Diabetes*, 55(8), 2392-7.
- Draznin, B., Lewis, D., Houlder, N., Sherman, N., Adamo, M., Garvey, W. T., et al. (1989). Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes. *Endocrinology*, 125(5), 2341-9.
- Draznin, B., Sussman, K. E., Eckel, R. H., Kao, M., Yost, T., & Sherman, N. A. (1988). Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(6), 1848-52.
- Draznin, B., Sussman, K., Kao, M., Lewis, D., & Sherman, N. (1987). The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14385-8.
- Duarte, A., Santos, M., Seíça, R., & Resende de Oliveira, C. (2000). Effect of oxidative stress on the uptake of GABA and glutamate in synaptosomes isolated from diabetic rat brain. *Neuroendocrinology*, 72(3), 179-86.
- Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., & Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 567-613.
- Flores, Armijo, & Mediavilla (2003). *Farmacología humana* (4 ed.). (pp. 927-30). Barcelona : Masson.
- Flores-Riveros, J. R., McLenithan, J. C., Ezaki, O., & Lane, M. D. (1993). Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: Effects on transcription and mRNA turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 512-6.

- Fröde, T. S., & Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *115*(2), 173-83.
- Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P., Matthaei, S., & Olefsky, J. M. (1988). Role of glucose transporters in the cellular insulin resistance of type II non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, *81*(5), 1528-36.
- Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P., Monzon, R., & Marshall, S. (1989). Dexamethasone regulates the glucose transport system in primary cultured adipocytes: Different mechanisms of insulin resistance after acute and chronic exposure. *Endocrinology*, *124*(5), 2063-73.
- Garvey, W. T., Olefsky, J. M., Matthaei, S., & Marshall, S. (1987). Glucose and insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. A new mechanism of insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(1), 189-97.
- Gathercole, L. L., Bujalska, I. J., Stewart, P. M., & Tomlinson, J. W. (2007). Glucocorticoid modulation of insulin signaling in human subcutaneous adipose tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *92*(11), 4332-9.
- Ge, X., Yu, Q., Qi, W., Shi, X., & Zhai, Q. (2008). Chronic insulin treatment causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. *Free Radical Research*, *42*(6), 582-91.
- Giovannone, B., Scaldaferrri, M. L., Federici, M., Porzio, O., Lauro, D., Fusco, A., et al. (2000). Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: Distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *16*(6), 434-41.
- Green, H., & Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, *3*(2), 127-33.
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, *5*(1), 19-27.
- Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., et al. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, *48*(6), 1270-4.
- Haber, R. S., & Weinstein, S. P. (1992). Role of glucose transporters in glucocorticoid-induced insulin resistance. GLUT4 isoform in rat skeletal muscle is not decreased by dexamethasone. *Diabetes*, *41*(6), 728-35.
- Haupt, A., Häring, H. U., & Matthaei, S. (2003). [National practice guidelines. New aspects in therapy of type 2 diabetes mellitus]. *MMW Fortschritte Der Medizin*, *145*(26), 41-6.
- Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N., & Spiegelman, B. M. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(11), 4854-8.
- Hresko, R. C., Heimberg, H., Chi, M. M., & Mueckler, M. (1998). Glucosamine-Induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(32), 20658-68.
- Hribal, M. L., Oriente, F., & Accili, D. (2002). Mouse models of insulin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *282*(5), E977-81.
- Inokuchi, J. (2007). Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, *127*(4), 579-86.

- Ishizuka, T., Kajita, K., Miura, A., Ishizawa, M., Kanoh, Y., Itaya, S., et al. (1999). DHEA improves glucose uptake via activations of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 1), E196-204.
- Ishizuka, T., Nagashima, T., Kajita, K., Miura, A., Yamamoto, M., Itaya, S., et al. (1997). Effect of glucocorticoid receptor antagonist RU 38486 on acute glucocorticoid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 46(9), 997-1002.
- Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1 β -Induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 148(1), 241-51.
- Janez, A., Worrall, D. S., & Olefsky, J. M. (2000). Insulin-Mediated cellular insulin resistance decreases osmotic shock-induced glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 141(12), 4657-63.
- Jullien, D., Tanti, J. F., Heydrick, S. J., Gautier, N., Grémeaux, T., Van Obberghen, E., et al. (1993). Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 15246-51.
- Kahn, C. R., Goldfine, I. D., Neville, D. M., & De Meyts, P. (1978). Alterations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone. *Endocrinology*, 103(4), 1054-66.
- Kajita, K., Ishizuka, T., Miura, A., Ishizawa, M., Kanoh, Y., & Yasuda, K. (2000). The role of atypical and conventional PKC in dehydroepiandrosterone-induced glucose uptake and dexamethasone-induced insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 361-7.
- Kajita, K., Ishizuka, T., Miura, A., Kanoh, Y., Ishizawa, M., Kimura, M., et al. (2001). Glucocorticoid-Induced insulin resistance associates with activation of protein kinase C isoforms. *Cellular Signalling*, 13(3), 169-75.
- Kang, Y., & Kim, H. Y. (2004). Glucose uptake-stimulatory activity of amomi semen in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 103-5.
- Kim, D. S., Jeong, S. K., Kim, H. R., Kim, D. S., Chae, S. W., & Chae, H. J. (2007). Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(1), 140-5.
- Klein, H. H., Ullmann, S., Drenckhan, M., Grimmsmann, T., Unthan-Fechner, K., & Probst, I. (2002). Differential modulation of insulin actions by dexamethasone: Studies in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 37(4), 432-40.
- Kurtz, T. W. (2006). New treatment strategies for patients with hypertension and insulin resistance. *The American Journal of Medicine*, 119(5 Suppl 1), S24-30.
- Lawrence, D. A., & Jullien, P. (1982). Differential uptake of 2-fluoro-2-deoxyglucose by normal and transformed chicken and mouse fibroblasts as a function of glucose concentration. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, 18(8), 755-62.
- Le Roith, D., & Zick, Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24(3), 588-97.

- Leira, F., Louzao, M. C., Vieites, J. M., Botana, L. M., & Vieytes, M. R. (2002). Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucose in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 16(3), 267-73.
- Li, C. J., Cheng, J. Y., Zhang, X. L., & Zhang, C. B. (2004). The labeling of 3T3-L1 preadipocyte cells with enhanced green fluorescent protein. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 20(4), 607-9.
- Li, J., Houseknecht, K. L., Stenbit, A. E., Katz, E. B., & Charron, M. J. (2000). Reduced glucose uptake precedes insulin signaling defects in adipocytes from heterozygous GLUT4 knockout mice. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(9), 1117-25.
- Liu, H. X. (2001). [The molecular mechanism of high glucose-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao = Hunan Yike Daxue Xuebao = Bulletin of Hunan Medical University*, 26(4), 294-6.
- Lott, J. A., & Turner, K. (1975). Evaluation of trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 21(12), 1754-60.
- Malinowski, J. M., & Bolesta, S. (2000). Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: A critical review. *Clinical Therapeutics*, 22(10), 1151-68; discussion 1149-50.
- Matthaei, S., & Greten, H. (1991). Evidence that metformin ameliorates cellular insulin-resistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane. *Diabète & Métabolisme*, 17(1 Pt 2), 150-8.
- Matthaei, S., Hamann, A., Klein, H. H., Benecke, H., Kreyman, G., Flier, J. S., et al. (1992). Evidence that metformin increases insulin-stimulated glucose transport by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters from an intracellular pool to the cell surface in rat adipocytes. *Hormone and Metabolic Research. Supplement Series*, 26, 34-41.
- Matthaei, S., Stumvoll, M., Kellerer, M., & Häring, H. U. (2000). Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine Reviews*, 21(6), 585-618.
- McCarty, M. F. (2006). Pkc-Mediated modulation of L-type calcium channels may contribute to fat-induced insulin resistance. *Medical Hypotheses*, 66(4), 824-31.
- Ministerio de la proteccion social (2006). Guía de atención de la diabetes mellitus tipo 2. *Republica De Colombia*.
- Mlinar, B., Marc, J., Janez, A., & Pfeifer, M. (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 375(1-2), 20-35.
- Moller, D. E. (2000). Potential role of tnf-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 11(6), 212-7.
- Moller, D. E., & Flier, J. S. (1988). Problems of insulin resistance. *Hospital Practice (Office Ed.)*, 23(10A), 83-4, 86, 89 passim.
- Moller, D. E., & Flier, J. S. (1991). Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *The New England Journal of Medicine*, 325(13), 938-48.

- Morgan, S. A., Sherlock, M., Gathercole, L. L., Lavery, G. G., Lenaghan, C., Bujalska, I. J., et al. (2009). 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes*.
- Mothe, I., & Van Obberghen, E. (1996). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11222-7.
- Murillo. E. Ospina Giraldo. L.F. (2006). Evaluación preliminar de la actividad hipoglicémica en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de bauhinia kalbreyeri harms. Tesis de grado Químico Farmacéutico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia.
- Muthusamy, V. S., Anand, S., Sangeetha, K. N., Sujatha, S., Arun, B., & Lakshmi, B. S. (2008). Tannins present in cichorium intybus enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1), 69-78.
- Nagai, Y., Yonemitsu, S., Erion, D. M., Iwasaki, T., Stark, R., Weismann, D., et al. (2009). The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9(3), 252-64.
- Natarajan, A., & Srienc, F. (2000). Glucose uptake rates of single E. Coli cells grown in glucose-limited chemostat cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), 87-96.
- Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of Nutrition*, 130(12), 3122S-3126S.
- O'Neil, R. G., Wu, L., & Mullani, N. (2005). Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Molecular Imaging and Biology : MIB : The Official Publication of the Academy of Molecular Imaging*, 7(6), 388-92.
- Ogihara, T., Asano, T., Katagiri, H., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., et al. (2004). Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia*, 47(5), 794-805.
- Olefsky, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R., Brillon, D., Matthaei, S., & Freidenberg, G. R. (1988). Cellular mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. *The American Journal of Medicine*, 85(5A), 86-105.
- Olefsky, J. M., Johnson, J., Liu, F., Jen, P., & Reaven, G. M. (1975). The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 24(4), 517-27.
- Ospina G L.F., Olarte C. J, Calle J., Pinzón R. (1995). Comprobación de la Actividad Hipoglicémica y Captadora de Radicales Libres Oxigenados de los Principios Activos de Curatella americana L.. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 24(1), 3-11.
- Owen, O. E., & Cahill, G. F. (1973). Metabolic effects of exogenous glucocorticoids in fasted man. *The Journal of Clinical Investigation*, 52(10), 2596-605.

- Passey, R. B., Gillum, R. L., Fuller, J. B., Urry, F. M., & Giles, M. L. (1977). Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). *Clinical Chemistry*, 23(1), 131-9.
- Pederson, T. M., Kramer, D. L., & Rondinone, C. M. (2001). Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: Possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes*, 50(1), 24-31.
- Pekala, P., Kawakami, M., Vine, W., Lane, M. D., & Cerami, A. (1983). Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. *The Journal of Experimental Medicine*, 157(4), 1360-5.
- Reed, M. J., & Scribner, K. A. (1999). In-Vivo and in-vitro models of type 2 diabetes in pharmaceutical drug discovery. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 1(2), 75-86.
- Rosen, O. M., Smith, C. J., Fung, C., & Rubin, C. S. (1978). Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(20), 7579-83.
- Ross, S. A., Chen, X., Hope, H. R., Sun, S., McMahon, E. G., Broschat, K., et al. (2000). Development and comparison of two 3T3-L1 adipocyte models of insulin resistance: Increased glucose flux vs glucosamine treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(3), 1033-41.
- Rudich, A., Kozlovsky, N., Potashnik, R., & Bashan, N. (1997). Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *The American Journal of Physiology*, 272(5 Pt 1), E935-40.
- Russell, T. R., & Ho, R. (1976). Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: Triggering of differentiation by prostaglandin f2alpha and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(12), 4516-20.
- Saad, M. J., Folli, F., Kahn, J. A., & Kahn, C. R. (1993). Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 2065-72.
- Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Funaki, M., Inukai, K., Katagiri, H., et al. (2000). Dexamethasone-Induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes*, 49(10), 1700-8.
- Sandoval (2008). *Modulación farmacológica de PPARy y su efecto en la expresión de caveolina-1 en células 3T3-L1*. Tesis de grado Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia : Universidad Nacional de Colombia.
- Sanofi aventis, N. (2005). La diabetes mellitus en latinoamérica. Epidemiological Bulletin, OPS, Vol. 22, No. 2, 2001 http://www.paho.org/english/dd/ais/EB_v22n2.pdf
- Schubert, C., Carel, K., DePaolo, D., Leitner, W., & Draznin, B. (1996). Interactions of protein kinase C with insulin signaling. Influence on GAP and sos activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15311-4.
- Semenkovich, C. F. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1813-22.

- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2009). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. *Articulo proximo a indexar*.
- Somwar, R., Fang, X., & Sweeney, G. (2005). Models of type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(3), 183-189.
- Sowers, J. R., & Draznin, B. (1998). Insulin, cation metabolism and insulin resistance. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 9(2-4), 223-33.
- Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J., & Farese, R. V. (1997). Protein kinase c-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30075-82.
- Takada, J., Machado, M. A., Peres, S. B., Brito, L. C., Borges-Silva, C. N., Costa, C. E., et al. (2007). Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: A model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56(7), 977-84.
- Takaguri, A., Satoh, K., Itagaki, M., Tokumitsu, Y., & Ichihara, K. (2008). Effects of atorvastatin and pravastatin on signal transduction related to glucose uptake in 3T3L1 adipocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 107(1), 80-9.
- Takahashi, M., Takahashi, Y., Takahashi, K., Zolotaryov, F. N., Hong, K. S., Kitazawa, R., et al. (2008). Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters*, 582(5), 573-8.
- TODARO, G. J., & GREEN, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17, 299-313.
- Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., et al. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313(6005), 756-61.
- Usui, I., Haruta, T., Takata, Y., Iwata, M., Uno, T., Takano, A., et al. (1999). Differential effects of palmitate on glucose uptake in rat-1 fibroblasts and 3T3-L1 adipocytes. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme*, 31(10), 546-52.
- van Dam, E. M., Govers, R., & James, D. E. (2005). Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(4), 1067-77.
- Wagner, H. J., Hoffmann, K. P., & Zwerger, H. (1981). Layer-Specific labelling of cat visual cortex after stimulation with visual noise: A [³H]2-deoxy-d-glucose study. *Brain Research*, 224(1), 31-43.
- Wang, C. C., Goalstone, M. L., & Draznin, B. (2004). Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*, 53(11), 2735-40.
- Weinstein, S. P., Paquin, T., Pritsker, A., & Haber, R. S. (1995). Glucocorticoid-Induced insulin resistance: Dexamethasone inhibits the activation of glucose transport in rat skeletal muscle by both insulin- and non-insulin-related stimuli. *Diabetes*, 44(4), 441-5.

- White, M. F. (1998). The irs-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182(1-2), 3-11.
- White, M. F., Livingston, J. N., Backer, J. M., Lauris, V., Dull, T. J., Ullrich, A., et al. (1988). Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell*, 54(5), 641-9.
- WHO (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. [<http://www.who.int/diabetes/publications/en/>] Geneve.
- Wojtaszewski, J. F., Nielsen, P., Kiens, B., Richter, E. A., & Wojtaszewski, J. F. (2001). Regulation of glycogen synthase kinase-3 in human skeletal muscle: Effects of food intake and bicycle exercise. *Diabetes*, 50(2), 265-9.
- Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito, M., Matsuoka, H., & Inagaki, N. (2000). Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22278-83.
- Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H., & Inagaki, N. (2007). A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nature Protocols*, 2(3), 753-62.
- Yang, G. Z., Gao, X. P., Yan, J. F., Ou, K. Q., & Zhao, J. (2007). [Mechanism of rosiglitazone to improve glucose-uptake of 3T3-L1 adipocyte with insulin resistance induced by dexamethasone and insulin]. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 38(5), 816-8.
- Yoshioka, K., Takahashi, H., Homma, T., Saito, M., Oh, K. B., Nemoto, Y., et al. (1996). A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of escherichia coli. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1289(1), 5-9.