



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ALTERACIONES EN PROTEÍNAS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN
DE LA INSULINA EN LA ETAPA FINAL DEL EMBARAZO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L.B.M. EDGAR SÁNCHEZ RAMÍREZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA.
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México, Noviembre de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de tesis fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM)/ Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Durante los estudios de maestría, el autor de la tesis obtuvo apoyo del:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**)

CVU/Becario: 631647/330572

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (**PAEP**), UNAM

Presupuesto 2014-2016

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Cristina Fernández Mejía**, por dirigir esta tesis y ser la autora intelectual de este trabajo. Gracias por guiarme, apoyarme y abrirme las puertas de su laboratorio. Le agradezco por su dedicación y sus aportaciones para la realización de esta tesis.

A la **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez** y el **Dr. Armando Roberto Tovar Palacio** por ser parte de mi comité tutorial. Por el tiempo invertido en el mejoramiento de esta tesis, su crítica constructiva y sus aportaciones.

A los miembros del jurado de examen:

Dr. Veronica Guarner Lans

Dra. Myrian Velasco Torres

Dra. Ana María Salazar Martínez

Dra. Martha Robles Flores

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Por aceptar ser mis revisores, su crítica constructiva y sus comentarios acertados. Mi admiración y mi respeto para cada uno.

A la **Dra. Karina Pasten Hidalgo**, por el apoyo experimental y las aportaciones a este proyecto.

Al **M. en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez**, por el apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A cada uno de los integrantes del **Posgrado en Ciencias Bioquímicas** de la UNAM.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por compartir gratos momentos, así como la oportunidad de intercambiar conocimientos, trabajar juntos y aportar ideas para cada uno de nuestros proyectos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
Insulina.....	6
Transcripción de la insulina y su regulación	8
Secreción de insulina	9
Acción de la insulina.....	11
Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina	12
Vía PI3K-AKT	12
Acciones de la insulina en el metabolismo de carbohidratos.....	13
Acciones de la insulina en el metabolismo de lípidos.....	15
Mecanismos de regulación (inhibición) de la señalización de la insulina	16
Resistencia a la insulina	17
Cambios metabólicos y fisiológicos en el gestación	18
Metabolismo nitrogenado en el gestación	20
Insulinorresistencia: tercer trimestre del gestación	21
Hormonas del gestación y su relación con resistencia a insulina.....	22
Adipocinas en el gestación.....	25
Alteraciones en las proteínas de señalización de la insulina en el gestación	26
Músculo	26
Tejido Adiposo.....	27
Hígado.....	28
PTEN y su relación con resistencia a la insulina en el gestación	28

GSK3 y su relación con resistencia a la insulina en el gestación	28
Antecedentes específicos.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
Modelo animal.....	34
Experimento de sensibilidad a la insulina	34
Homogenización de tejidos para la extracción de RNA total.....	35
Cuantificación de RNA total.....	36
RT-PCR en tiempo real	36
Homogenización de tejidos para extracción de proteína.....	38
Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford	38
Electroforesis en geles de poliacrilamida e Inmunotransferencia (Western Blot).	38
Inmunoprecipitación de proteína	41
Identificación de la proteína aislada.....	42
Análisis Estadístico	43
RESULTADOS	44
Niveles de glucosa en ayuno.....	44
Sensibilidad a la insulina en el día 17 de gestación.....	45
Relación del peso corporal contra la disminución de glucosa en sangre al día 17 gestacional.....	47
Distribución del tejido adiposo durante la etapa final de la gestación	48
Niveles de proteínas totales y fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina; AKT, PDK1, GSK3 β y PTEN	49

Hígado.....	50
Músculo esquelético	53
Tejido adiposo	56
Carbamoil fosfato sintasa (CPS-1); una proteína del metabolismo nitrogenado alterada en gestación.....	60
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS.....	71

RESUMEN

Introducción. La etapa final de la gestación se caracteriza por presentar una disminución en la sensibilidad a la insulina en los tejidos maternos, produciéndose resistencia a la insulina de origen fisiológico, con la finalidad de aportar mayores nutrientes para el desarrollo del feto. Sin embargo, los cambios en las proteínas de la vía de señalización de la insulina en los tejidos sensibles a esta hormona, han sido poco estudiados. La identificación de los mecanismos moleculares que producen resistencia a la insulina en la gestación son importantes para entender las alteraciones que ocurren en esta vía de señalización, previo al desarrollo de la diabetes gestacional.

Objetivo: Determinar los cambios de expresión y fosforilación que se producen en las proteínas de la vía de señalización de la insulina en la etapa final de la gestación.

Metodología: Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J al día 17 gestacional y no gestantes. Ambos grupos fueron tratados con insulina (1 UI/Kg), vía intraperitoneal, antes de la inyección intraperitoneal de insulina (tiempo 0) se midieron las concentraciones de glucosa en sangre y previo al sacrificio del animal (30 minutos). Se obtuvieron muestras de hígado (lóbulo frontal), músculo esquelético (cuádriceps femoral) y tejido adiposo (perigonadal). En estos tejidos, se determinó la abundancia de las proteínas fosforiladas de la vía de señalización de la insulina: AKT (T308) y PDK-1 (S241), así como la proteína efectora GSK3 β (S9) y la proteína inhibidora de la vía PTEN (S380), mediante la técnica de Western blot. También se analizó la expresión relativa de las proteínas totales AKT, PTEN y CPS-1, así como por RT-PCRq, la abundancia del mensajero de Pten y Cps-1.

Resultados: Encontramos que, comparado con los animales no gestantes, existe una resistencia sistémica a la insulina en el día 17 de gestacional. Después de la estimulación con insulina, el grupo gestante mostró una disminución en la concentración de glucosa del 20 %, comparado con un 50 % del grupo no gestante. Al realizar el análisis de las proteínas de la vía de señalización de la insulina, encontramos altos niveles de expresión en la proteína PTEN, así como del ARNm de Pten en el hígado y tejido adiposo al día 17 gestacional, con respecto al control. En cambio, la fosforilación de la proteína PTEN en serina 380, únicamente fue menor en el hígado. Al analizar las fosforilaciones de las demás proteínas de la vía de señalización, demostramos que ocurre una disminución significativa en la fosforilación de AKT en treonina 308, en los tres tejidos evaluados, al

día 17 gestacional con respecto al no gestante. Sin embargo, la expresión relativa de la proteína total de AKT fue únicamente mayor en el músculo esquelético. Por otra parte, no encontramos diferencias en la fosforilación de la proteína PDK-1 en serina 241 en ninguno de los tejidos estudiados. También, encontramos un incremento significativo en la fosforilación de la proteína GSK3 β en serina 9 en el hígado, en tanto que en el músculo se observó una disminución. En el caso del tejido adiposo no se encontraron cambios en la fosforilación de la GSK3 β . Por último, medimos la abundancia del ARNm y la proteína total de la carbamoil fosfato sintasa-1, en ambos grupos.

Conclusión: Demostramos que al final de la gestación, en los tres tejidos evaluados, se produjo una disminución de AKT fosforilado (T308). Este cambio se produjo por diferentes mecanismos dependiendo del tejido. En el hígado y en el tejido adiposo, este efecto está relacionado con cambios en la expresión y fosforilación en la proteína PTEN, cuya función inhibe actividad de la vía PI3K-AKT. En tanto que en el músculo esta proteína no se encontró modificada. La fosforilación de GSK3 β (S9) se encuentra aumentada en el hígado, disminuye en el músculo y no se modifica en el tejido adiposo. El aumento en la fosforilación de GSK3 β (S9) en el hígado, sugiere que este órgano es capaz de sintetizar glucógeno independientemente de la vía de señalización de la insulina. No encontramos diferencias en la fosforilación de la proteína PDK-1 (S241), en ninguno de los tres tejidos evaluados, lo que indica que esta proteína no juega un papel importante en la resistencia a la insulina durante la gestación. Además, demostramos que la Carbamoil fosfato sintasa-1 (CPS-1), enzima importante en el ciclo de la urea, sufre una disminución en su expresión en el hígado en la etapa final de la gestación.

ABSTRACT

Introduction. Metabolic and hormonal changes in late pregnancy decrease maternal insulin sensitivity to facilitate nutrients supply to the fetus. There is little information about insulin signaling proteins in glucose homeostasis regulating tissues during this period. Identification of insulin resistance mechanisms during pregnancy is important given its role in the pathophysiology of gestational diabetes. Aim: To determine changes of insulin signaling proteins in late pregnancy. Methodology: Two groups of C57BL/6J mice, pregnant (day 17) and no pregnant, were tested for insulin sensitivity by insulin tolerance test and insulin induction for 30 minutes. Phosphorylation sites of insulin signaling proteins: AKT (T308), PDK-1 (S241) and GSK3 β (S9), as well as PTEN (S380), an inhibitory protein of this transduction pathway, were analyzed in the liver, muscle and adipose tissue after 30 minutes of insulin administration (i.p: 1 UI/Kg). Also, total proteins of AKT and PTEN were evaluated in the three tissues, as well as CPS-1 in the liver. Results: We found that, compared with non-pregnant animals, insulin tolerance was decreased on day 17 of gestation. Protein immunoblotting analysis revealed that the phosphorylation forms of AKT (active) and PTEN (inactive) were decreased; however, GSK3- β (inactive) was increase in the liver, whereas in muscle AKT and GSK3 β were diminished. In the adipose tissue, the response to insulin-induced was lower only in AKT, and showed variability between individuals in the other proteins evaluated. As well, protein abundance of active PTEN (total protein) was increased in the liver and adipose tissue. Conclusion: In the present study we demonstrated that late gestation produced phosphorylated AKT (T308) decrease. This effect was produced in a tissue specific manner. In the liver and in the adipose tissue this decrease is related to total and phosphorylated PTEN decreased expression. Whereas, in the muscle its expression was not modified. GSK3 β (S9) phosphorylation is increased in the liver, decreased in the muscle and without changes in the adipose tissue. Increased GSK3 β (S9) in the liver suggest that during gestation this tissue is capable to synthesize glycogen independently of PI3K-AKT pathway. Also, our studies revealed that PDK-1 (S241) is not involved in gestational insulin-resistance. Finally, we demonstrated that carbamoyl phosphate synthase-1 (CPS-1), an important urea cycle enzyme, decreases its expression in the liver.

ABREVIATURAS

4-HNE	4-hydroxynonenal
ABC	Área bajo la curva
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADNc	ADN complementario
AGL	Ácidos grasos libres
AKT/PKB	Proteína cinasa B
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
aPKC	Proteína cinasa C atípicas
ARNm	ARN mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
CPS-1	Carbamoil fosfato sintasa-1
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EE	Error estándar
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
FAS	Sintasa de ácidos grasos
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GLUT	Transportador de glucosa
g	Gramos
GS	Glucógeno sintasa
GSK3 β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2 ácido etanosulfónico
HOMA-IR	Evaluación del modelo homeostático-Resistencia a la insulina
hPGH	Hormona de crecimiento placentaria humana
hPL	Lactógeno Placentario humano
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
K ⁺	Potasio
KDa	Kilodaltons
MS-CL	Espectrofotometría de masas-cromatografía líquida
MuLV	Virus de la leucemia murina
Na ⁺	Sodio
nm	Nanómetros
PBS	Solución Salina de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa

PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PPAR1- γ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
PTEN	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
QUICKI	Índice cuantitativo de control de la sensibilidad a la insulina
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
RT-PCRq	Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Desviación estándar
SH2	Dominio de homología a Src 2
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c
SRP	Partícula de reconocimiento de señal
SUR1	Receptor a sulfanilurea 1
TBS-T	Amortiguador salino de Tris, suplementado con Tween-20
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alpha
UA	Unidades arbitrarias
UI/Kg	Unidad Internacional/Kilogramo
V	Voltaje
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
$\Delta\Delta Ct$	Doble delta Ct

INTRODUCCIÓN

Insulina

La insulina es una hormona proteica sintetizada y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Es liberada como proinsulina (dos cadenas de aminoácidos unidas por puentes disulfuro) que al ser hidrolizada libera insulina biológicamente activa y el péptido C. La molécula de insulina madura comprende un total de 51 aminoácidos, 21 en la cadena A y 30 en la cadena B (Oyer et al., 1971).

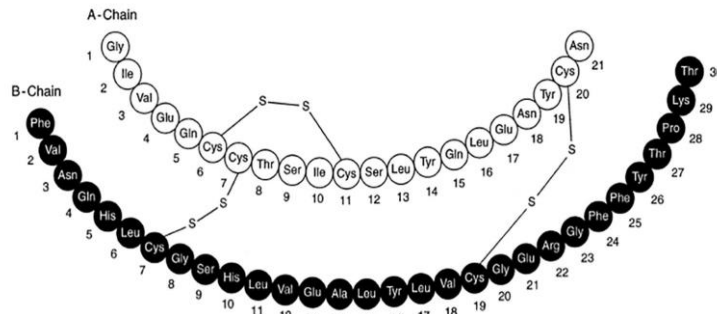


Figura 1. Secuencia de aminoácidos y estructura de la insulina humana. Tomado de Oyer 1971.

La síntesis de la insulina comienza en el núcleo, donde se transcribe el ARN mensajero (ARNm) de la insulina, el cual posee una secuencia líder en su extremo 5', seguida de los dominios peptídicos B, C y A. El producto inicial de la traducción de este ARNm es la preproinsulina, la cual es una sola cadena polipeptídica que se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico. La preproinsulina posee un péptido señal de 24 residuos, característico de las proteínas secretoras de cualquier organismo (Baillies EM, 1992). El péptido señal interactúa con la partícula de reconocimiento de señal (SRP), una ribonucleoproteína del citosol que facilita la separación de la preproinsulina naciente del compartimento citosólico y la envía a la vía secretora. La preproinsulina se transloca al lumen del retículo endoplásmico rugoso, donde el péptido señal es cortado por una peptidasa especializada, quedando como proinsulina. Dentro del retículo endoplásmico rugoso, la proinsulina se pliega y se forman tres puentes disulfuro que le darán su estructura nativa. En un tiempo de 10 a 20 minutos, la proinsulina se transporta al aparato de Golgi para su procesamiento y empaquetamiento en gránulos secretores, proceso que durará de 2 a 3 horas posteriores a la traducción de la preproinsulina (Barrett, 2005).

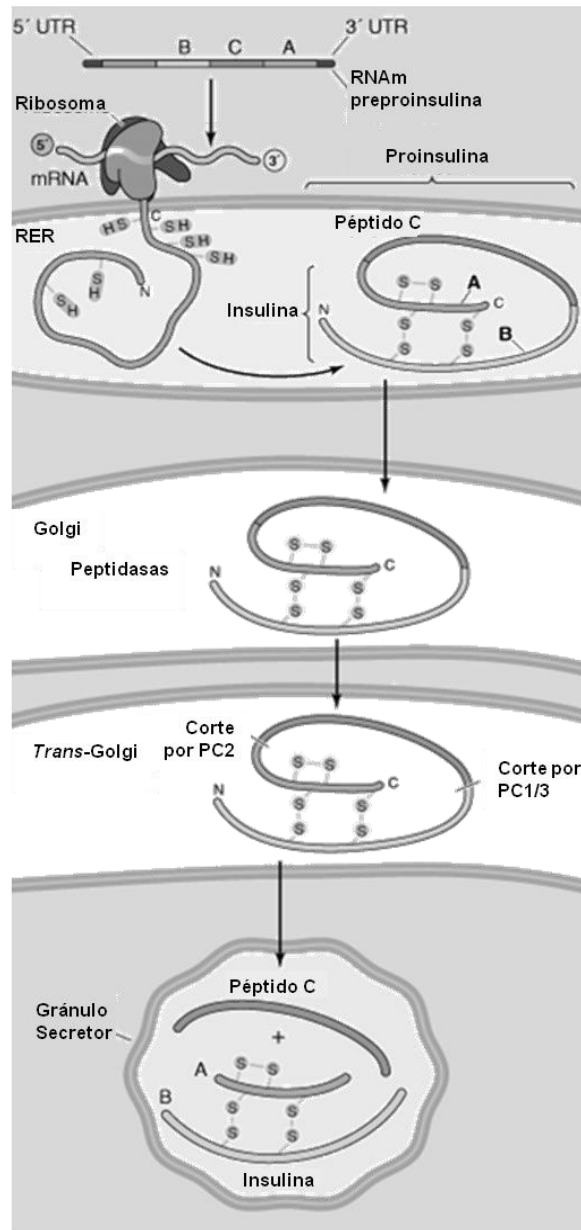


Figura 2. Síntesis y procesamiento celular de la insulina.

Modificada de Barret 2005.

Posteriormente en el aparato de Golgi, la proinsulina es cortada por las prohormonas convertasas PC2 y PC1/3 para formar la insulina y el péptido C, una proteína de 31 aminoácidos. La insulina y el péptido C se empaquetan en gránulos que contienen un centro electrodenso formado por 6 moléculas de insulina ordenadas en arreglos cristalinos romboédricos alrededor de una molécula de zinc (Zn^{2+}) (Engelking, 1997). Estas moléculas están suspendidas en un halo constituido por el péptido C, pequeñas

cantidades (3%-5%) de proinsulina y sus productos intermediarios de corte, polipéptido amiloide, iones (Zn^{2+} y Ca^{2+}) y moléculas pequeñas como ATP, GABA, serotonina y glutamato. Cada célula beta contiene de 10000 a 13000 gránulos secretores, que contienen aproximadamente 10^{-18} moles de insulina por gránulo. Estos gránulos pueden almacenarse por varios días antes de ser liberados, o pueden ser degradados por crinofagia (destrucción por lisosomas) (Eliasson et al., 2008).

Transcripción de la insulina y su regulación

La insulina está codificada por un solo gen en los humanos (INS, cromosoma 11p15.5) y dos genes en los ratones (*Ins1*, 19, 49.0 cM e *Ins2*, 7, 69.1 cM). Existen diversos factores *cis*-activadores y *trans*-activadores asociados a la activación específica en la célula beta del enhancer del gen de la insulina. Además, la misma insulina puede actuar de forma autocrina para regular esta activación mediada por enhancers, utilizando las mismas vías para la activación por glucosa (Artner and Stein, 2008).

El enhancer del gen de la insulina está constituido principalmente por los elementos A, C y E, cuyos motivos de unión se encuentran tanto en el gen de roedores como de humano. La estimulación de estos sitios está dada por factores transcripcionales, como Pdx-1, NeuroD1 and MafA, que actúan de manera cooperativa formando redes transcripcionales. Estas redes no sólo regulan la expresión de la insulina, sino también modulan la expresión de otros genes que participan en la producción y secreción de insulina, estableciendo y manteniendo así el fenotipo altamente diferenciado de la célula beta (Andrali et al., 2008).

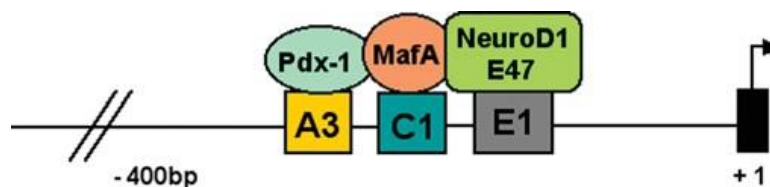


Figura 3. Factores en Trans que permiten la expresión del gen de la insulina. Tomada de Andrali 2008.

Secreción de insulina

La glucosa es el nutriente más importante para la secreción de insulina. El mecanismo por el cual la glucosa promueve la secreción de insulina requiere sentir la cantidad de glucosa en sangre y el metabolismo de la glucosa dentro de la célula beta, un proceso conocido como secreción de insulina en respuesta a glucosa (Fernandez Mejia, 2013).

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil y bifásica. Los pulsos secretorios de la célula beta están asociados a oscilaciones sincrónicas de calcio (Ca^{2+}) en respuesta a los estímulos de glucosa y se ha sugerido que estas oscilaciones están acopladas a oscilaciones en la glucólisis dentro de la célula beta (Stagner et al., 1980). Poco después de que la célula beta recibe el estímulo de glucosa hay un primer pico de secreción de insulina. Una segunda fase sostenida de secreción de insulina sigue a este decremento, la cual puede continuar durante horas hasta que se alcance la normoglicemia (Henquin, 2009).

La secreción de insulina es un proceso complejo de múltiples pasos que requiere del transporte y la oxidación de la glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretorios que contienen insulina con la membrana plasmática de la célula beta (Fernandez Mejia, 2013). La glucosa entra a la célula por difusión facilitada mediada por un grupo de proteínas transportadoras de glucosa relacionadas, caracterizadas por 12 dominios hidrofóbicos tipo hélice. En la célula beta pancreática, la glucosa es transportada por la isoforma 2 del transportador de glucosa (GLUT2) en los roedores, y por la isoforma 1 en humanos. La glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato por la glucocinasa. Esta enzima juega un papel crítico en la secreción de insulina en respuesta a glucosa y es considerada el sensor de glucosa de la célula beta pancreática. Debido a sus características cinéticas, la glucocinasa es un factor determinante para la fosforilación de la glucosa y para su metabolismo a través de la glucólisis (Matschinsky, 1996).

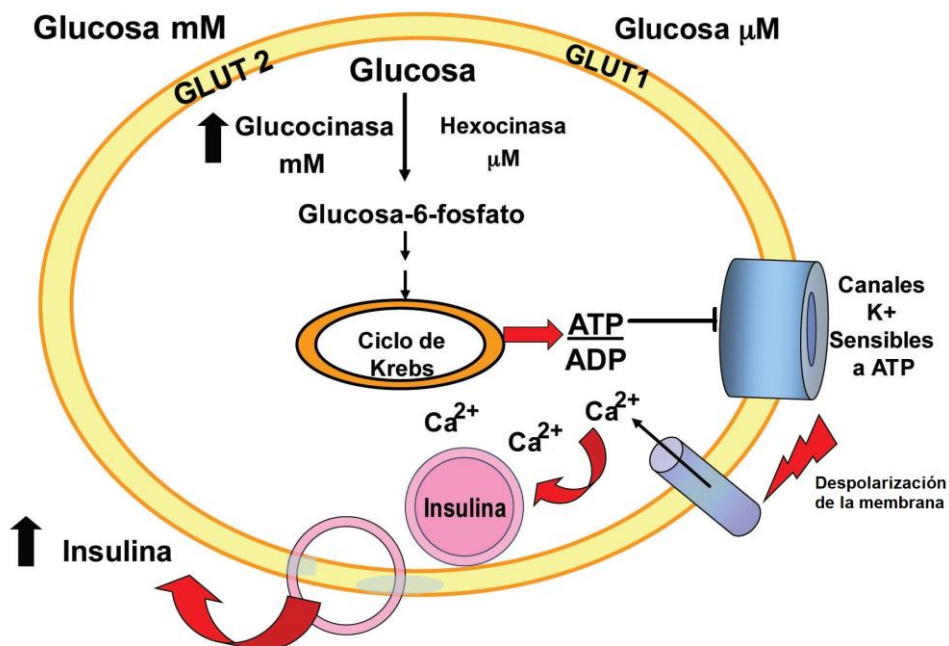


Figura 4. Mecanismos que participan en la secreción de la insulina en las células β pancreáticas. Modificado de Fernández Mejía. Bioquímica de Laguna. 7ª Edición.

La generación de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provoca el cierre de canales de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) – un hetero-octámero formado por cuatro subunidades de receptor a sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K^+ Kir6.2 (Aguilar-Bryan et al., 1998). El cierre de estos canales de potasio modifica el potencial de membrana en reposo, lo cual conduce a una despolarización de la membrana y la subsecuente apertura de canales de sodio (Na^+) y canales de calcio (Ca^{2+}) tipo T dependientes de voltaje. La entrada de sodio y calcio a la célula despolariza aún más a la membrana, ocasionando que se abran los canales de calcio tipo L, liberando calcio de los reservorios celulares (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). El incremento intracelular de calcio en el citosol, promueve la fusión de los gránulos secretorios que contienen insulina con la membrana plasmática y la liberación de la insulina hacia la circulación (Rorsman and Renstrom, 2003). Una vez secretada hacia la circulación portal, la insulina es transportada a los tejidos periféricos, sobre los cuales ejercerá acciones principalmente anabólicas.

Acción de la insulina

La insulina es una hormona con función hipoglucemiante y anabólica, que regula el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y los aminoácidos. La elevación de las concentraciones de glucosa sanguínea es el principal estímulo para su liberación de las células beta del páncreas. La insulina es la hormona más importante en el control de glucosa en la sangre cuya acción principal se produce en músculo, tejido adiposo e hígado; en los dos primeros facilita la entrada de glucosa sanguínea ya que estos tejidos expresan transportadores membranales de glucosa GLUT4, que son regulados positivamente por la insulina, resultando en un aumento en la captación de glucosa a las células. En el hígado reduce la liberación de glucosa. Además, en el tejido adiposo promueve la captación de ácidos grasos, por la activación de la lipoproteín lipasas cerca de los depósitos de grasa, estos ácidos grasos serán empleados como sustrato para aumentar la esterificación de triglicéridos, en un estado postprandial (Fernandez Mejia, 2013).

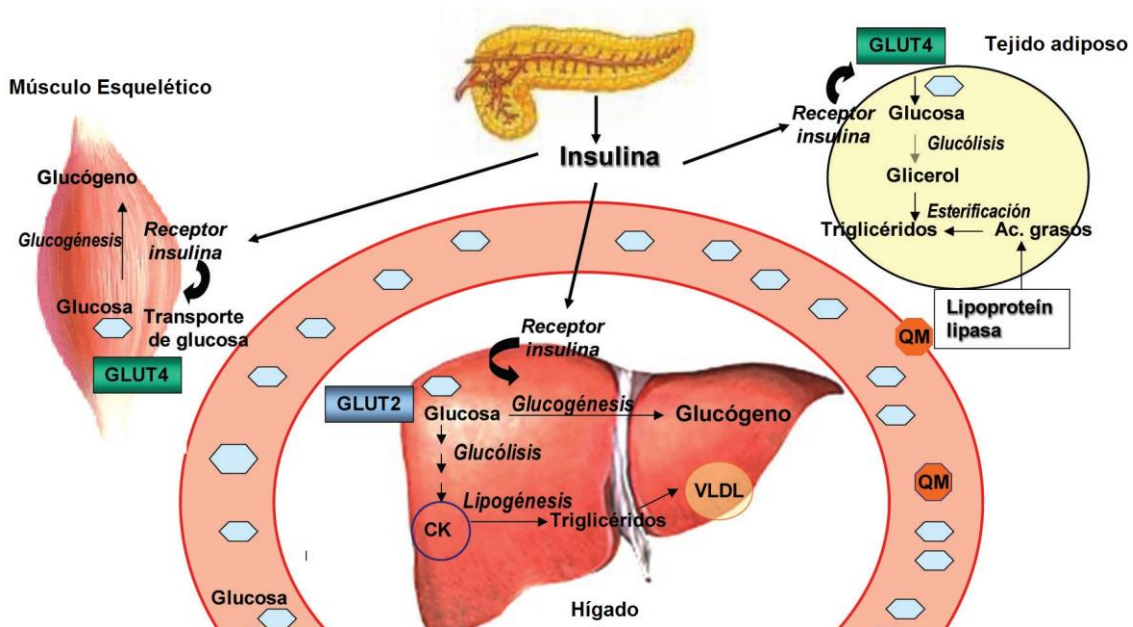


Figura 5. Acciones de la insulina en el periodo postprandial. Modificado de Fernández-Mejía.

Bioquímica de Laguna. 7ª Edición.

Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina

La insulina comienza su acción uniéndose al receptor de insulina (IR); esto provoca una cascada de eventos que involucra fosforilación de proteínas y fosfolípidos de membrana, proteínas de andamiaje y acoplamiento, así como actividad del citoesqueleto. El receptor de insulina pertenece a una subfamilia de receptores con una actividad cinasa de tirosina, el cual es una glicoproteína heterotetramérica de membrana que consiste en dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La insulina se une a la subunidad alfa extracelular del receptor e induce un cambio conformacional que acerca a las subunidades beta, ocasionando una autofosforilación rápida del receptor, principalmente en residuos de tirosina, y catalizando la fosforilación de proteínas intracelulares como: miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS-1 y 2) y Cb1. Estas proteínas actúan como sitios de anclaje para proteínas que contengan dominios SH2 (del inglés Src-homology-2), como la fosfatidilínositol 3-cinasa (PI3K), la GRB-2 y la SHP-2, lo cual resulta en una serie de diversas vías de señalización; la activación de la vía de PI3K, la activación de las MAP cinasas y la vía de Cb1 asociada a balsas lipídicas (Saltiel and Kahn, 2001). Estas vías actúan de manera concertada para transmitir la señal del receptor de insulina a blancos biológicos como el transporte de glucosa, la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno, diferenciación celular, mitogénesis y la expresión de genes (Withers et al., 1998).

Vía PI3K-AKT

La PI3K consta de cuatro clases (IA, IB, II y III). La insulina estimula la activación (por fosforilación) de la PI3K clase 1A, la cual está conformada por la unidad p85 y p110. Después de la unión de la insulina con su receptor y la fosforilación del IRS-1, se fosforila la subunidad p85 de la PI3K produciéndose un cambio conformacional que promueve la unión de la subunidad catalítica (p110) (Vara et al. 2004).

La PI3K, a través de p110, fosforila al fosfatidilínositol 4,5-difosfato (PIP2) presente en la membrana plasmática, produciendo fosfatidilínositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). La generación del PIP3 facilita la unión a la membrana plasmática de las cinasas dependientes de fosfatidilinositoles PDK-1 y PDK-2, así como AKT. Los dominios PH (dominio con homología a la Pleckstrina) de la región N-terminal de AKT interactúan con el PIP3, lo cual contribuye al reclutamiento de esta proteína a la membrana. Una vez ancladas a la membrana, las PDKs y mTORC2, fosforilan a AKT en la treonina 308 y la serina 473

(Chou et al., 1998). Además, las proteínas cinasas C atípicas (aPKC ζ y λ) son activadas a través de la vía de señalización de la insulina por la vía PI3K-AKT (Saltiel and Kahn, 2001). AKT es una cinasa responsable de los efectos de la activación de la vía PI3K-AKT. Una vez fosforilada AKT tiene múltiples blancos como: GSK3- β , mTORC1, FOXO1, SREBP-1c, entre otras.

Acciones de la insulina en el metabolismo de carbohidratos

En condiciones postprandiales el transporte de glucosa al interior de las células del músculo esquelético representa la principal vía de captación de glucosa (Shigematsu et al., 2002). El músculo esquelético y el tejido adiposo, tienen el transportador GLUT1 el cual permite el transporte basal de glucosa, mientras que GLUT4 es responsable del transporte de glucosa dependiente de insulina. En el estado basal, GLUT4 está principalmente de forma intracelular, en vesículas secretorias. La insulina estimula la translocación de las vesículas que contienen GLUT4 hacia la membrana plasmática, donde facilitan el transporte de glucosa al interior de la célula (Yin and Janmey, 2003).

Además la insulina estimula la acumulación de glucógeno a través de un aumento coordinado del transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno. La insulina activa la glucógeno sintasa (GS) a través de la inhibición de la GSK3 β (glucógeno sintasa cinasa 3 beta) (Foufelle and Ferre, 2002). La insulina, vía PI3K-AKT, fosforila en serina 9 e inactiva la GSK3 β . La GSK3 β , la cual es una cinasa serina/treonina, involucrada en inhibir el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno. Es importante señalar que la inactivación de la proteína GSK3 β , ocurre por la fosforilación de serina 9 en su estructura, lo que promueve un aumento en la actividad de la glucógeno sintasa (GS), aumentando la vía de la glucogénesis (Nakada et al., 2011).

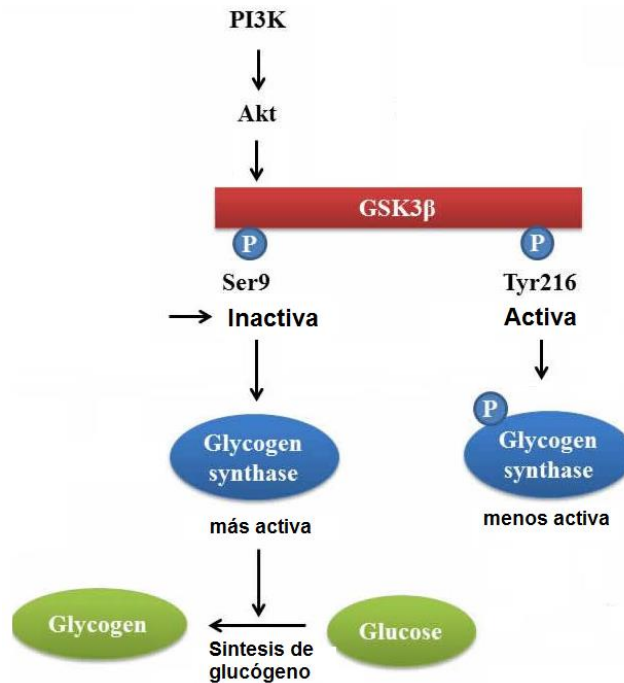


Figura 6. La vía de señalización PI3K-AKT promueve la síntesis de glucógeno.
Modificado de Nakada 2011.

Otra función de la insulina es inhibir la producción y la liberación de glucosa por el hígado bloqueando la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Esto ocurre a través de un efecto directo de la insulina sobre el hígado, así como por efectos indirectos de la insulina sobre la disponibilidad de sustrato, como ácidos grasos libres, lactato y aminoácidos (Puigserver et al., 2003). La insulina inhibe la transcripción del gen que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), enzima que cataliza el paso limitante en la velocidad de la gluconeogénesis (Rena et al., 1999). También disminuye la transcripción de genes que codifican para la fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa). Este mecanismo se produce vía PI3K a través de la fosforilación del factor de transcripción FOXO1. En el ayuno, FOXO1 se encuentra desfosforilado y localizado en el núcleo, donde se une al coactivador del receptor activado de proliferación de peroxisomas (PGC)-1 (Anthonsen et al., 1998) y a CBP/p300 (Kitamura et al., 1999) para promover la transcripción de la PEPCK y la G-6-Pasa. La fosforilación dependiente de insulina vía AKT disocia el complejo FOXO1/PGC-1 y provoca que FOXO1 se transloque fuera del núcleo y consecuentemente se inhiba la expresión de sus genes blanco (Cnop et al., 2005).

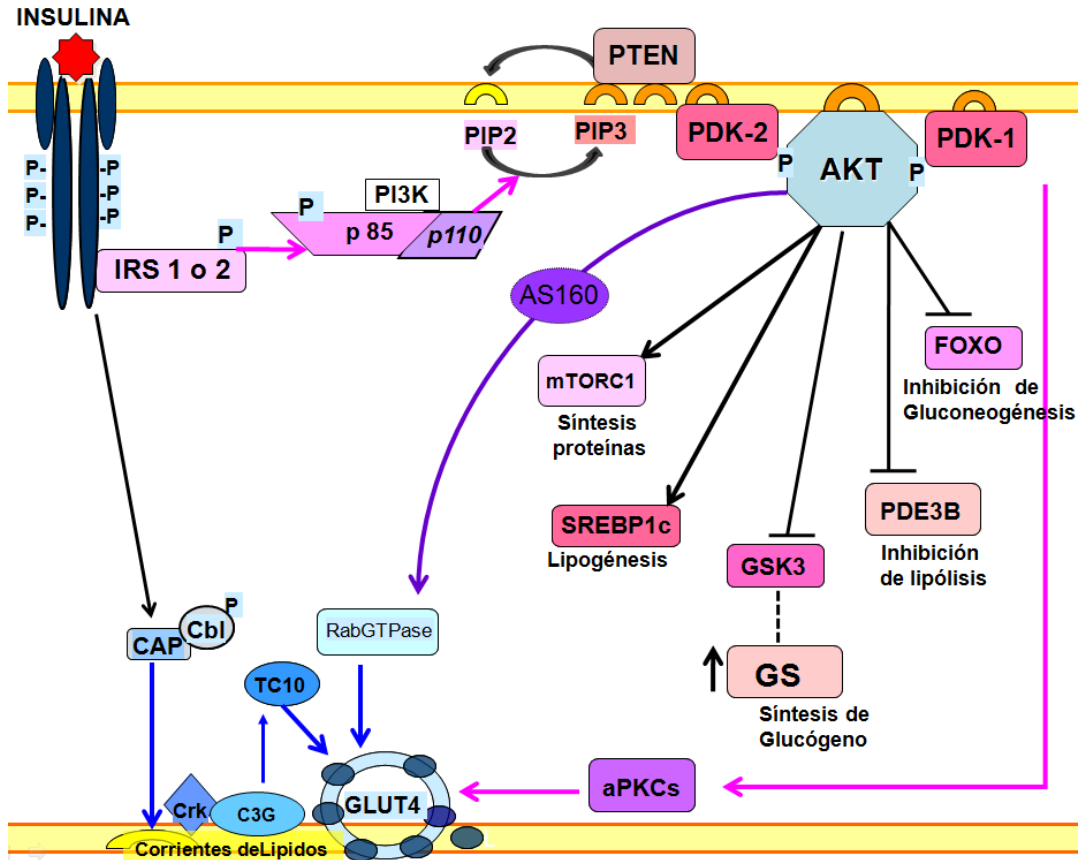


Figura 7. Vías de señalización metabólicas de la insulina.
 Modificado de Fernández-Mejía. Bioquímica de Laguna. 7ª Edición.

Acciones de la insulina en el metabolismo de lípidos

La insulina induce la transcripción de enzimas críticas para la síntesis de lípidos. El factor transcripcional SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador por esteroides 1c) posee un papel crucial en la expresión de genes lipogénicos (Foufelle and Ferre, 2002). La insulina estimula la activación del factor de transcripción SREBP-1c por la vía de PI3K, a la vez ocasiona el rompimiento proteolítico del precursor de SREBP-1c y la liberación de la forma activa que migrará al núcleo y transactivará los promotores de los genes de la glicólisis y la síntesis de ácidos grasos (como FAS y ACC) (Foufelle et al., 2005).

Además, la insulina inhibe fuertemente la lipólisis en los adipocitos, a través de la inhibición de la lipasa sensible a hormonas (Srikanta et al., 1983). La insulina inhibe la

actividad de esta lipasa a través de una reducción en los niveles de AMPc, debida a la activación de una fosfodiesterasa 3B específica para AMPc a través de la cinasa de serina/treonina AKT.

Mecanismos de regulación (inhibición) de la señalización de la insulina

La terminación de la señalización de la insulina es crítica para el mantenimiento del control metabólico. La cascada de la señalización de la insulina se inhibe por fosfatasas específicas. Éstas actúan a través de la activación de fosfatasas de proteínas o lípidos y a través de la inducción de cinasas serina/treonina que fosforilan y desacoplan varios elementos a lo largo de las vías de señalización de la insulina (Tordjman et al., 1989).

Por ejemplo, la desfosforilación del receptor de la insulina y sus sustratos (IRS1-2), lo llevan a cabo ciertas proteínas denominadas PTPasas. En el caso de la PTPasa intracelular PTP1B, la cual se ha demostrado que promueve la desfosforilación del receptor de la insulina (Goldstein, 2001).

Existe otro sitio de regulación negativa de la vía de señalización, la cual afecta a la proteína PI3K. Como se mencionó anteriormente, la PI3K es una proteína crítica en la transducción de señal de la insulina. La actividad de la ruta PI3K también está determinada por fosfatidilinositol 3-fosfatasas, tales como PTEN y el SHIP2. La sobreexpresión de estas fosfatasas de lípidos conduce a la disminución de los niveles de PIP3 en la célula, que podría frenar o terminar la señalización de insulina (Vinciguerra and Foti, 2006).

PTEN. El gen *Pten*, codifica para una proteína de 403 aminoácidos. Esta proteína se identificó y se clonó como un gen supresor de tumores mutado en muchos de los animales y los cánceres humanos. En cultivo celular, la sobreexpresión de la proteína PTEN inhibe la formación de fosfatidilinositoles trifosfato inducida por la insulina. Así esta proteína desfosforila al PI(3,4,5)P3 y produce PI(4,5)P2, disminuyendo el anclaje de AKT y PDKs a la membrana plasmática, por lo tanto, disminuye la captación de glucosa en células (Bermudez Brito et al., 2015).

También se demostró que al utilizar un oligonucleótido antisentido, inhibiendo específicamente la expresión de PTEN (reducción de 80% en el nivel de ARNm en el hígado y tejido adiposo) normaliza los niveles de glucosa en plasma en ratones db/db (diabéticos). Tomados en conjunto estos estudios indican que PTEN juega un papel

negativo en la señalización de la insulina y su inhibición mejora la sensibilidad a la insulina (Nakashima et al., 2000).

En otros estudios se ha determinado modificaciones interesantes en esta proteína las cuales llevan a resistencia a la insulina o a una mejora en la tolerancia a la glucosa. Por ejemplo, se evaluó el efecto que tiene la administración de progesterona, en ratas ovariectomizadas. Este tratamiento modifica los niveles de fosforilación de PTEN, presentándose una disminución en serina 380, en el hipotálamo y el hipocampo de la rata, comparado con el grupo control (Amorim et al., 2010), lo que repercute en la modulación de la PI3K en ciertas partes del cerebro.

Un trabajo de investigación muy interesante utilizó como modelo a una línea celular HepG2 y un cultivo primario de hepatocitos de rata, que fueron tratados con 4-hydroxynonenal (4-HNE). El resultado fue un aumento en la fosforilación de la proteína AKT, en serina 473 y treonina 308, promovido por un incremento en la síntesis de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) en la membrana plasmática, por un aumento en la señalización PI3K-AKT. El mecanismo que promovió este incremento en la actividad de AKT, es que este compuesto promueve la inhibición de la proteína PTEN, la cual actúa como un regulador negativo de la vía (Shearn et al., 2011). Así una disminución en la fosforilación de PTEN, lleva a una disminución en la fosforilación de AKT.

Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina se define como una respuesta insuficiente de los tejidos a la acción de esta hormona en las concentraciones en las que usualmente produce su efecto. Esta condición antecede frecuentemente el desarrollo de la diabetes tipo 2 y la diabetes gestacional. La resistencia a la insulina tiene diferentes etiologías, que pueden deberse a anomalías genéticas de los receptores de insulina, patologías como la obesidad, la producción de anticuerpos contra los receptores de insulina, interferencia de compuestos con la vía de señalización, el efecto de algunas hormonas o adipocinas, entre otras causas (Barbour et al., 2007).

La resistencia a la insulina se caracteriza por presentar altos niveles de insulina en sangre (hiperinsulinemia), un aumento en los niveles de glucosa sanguínea (hiperglucemia), altos niveles de leptina (hiperleptinemia) y un incremento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres. A pesar de todas estas alteraciones, las personas que presentan resistencia a la insulina mantienen sus niveles de glucosa normales debido a una sobreproducción de

insulina por parte de las células β -pancreáticas, lo cual es un mecanismo compensatorio para el control normal de glucosa (Zavalza-Gomez et al., 2008).

La resistencia a la insulina generalmente se relaciona con un estado fisiopatológico y pre-diabético, sin embargo, existe un proceso fisiológico muy importante en el cual se desarrolla resistencia a la insulina: la gestación. En condiciones normales, se presenta resistencia a la insulina en la etapa final de la gestación, con la finalidad de aportar la mayor cantidad de nutrientes al feto en crecimiento (Catalano et al., 1991).

Cambios metabólicos y fisiológicos en la gestación

Durante la gestación, la unidad feto-placentaria secreta proteínas y hormonas esteroideas en la madre, alterando el estado endocrino de la misma. Estas hormonas se encargan de producir adaptaciones metabólicas en la gestación, las cuales están diseñadas para apoyar las demandas del desarrollo fetal y el subsecuente desarrollo (O'Tierney-Ginn et al., 2015).

Se ha demostrado que los cambios hormonales en la gestación inducen un cambio adaptativo en el hipotálamo, estimulando una mayor ingesta de alimento, como resultado un incremento en los depósitos de grasa, los cuales servirán de reserva para las necesidades metabólicas que el cuerpo tendrá al final de la gestación y en el periodo de la lactancia (Augustine et al., 2008). También existe un aumento del metabolismo oxidativo principalmente de las tasas de consumo de energía (metabolismo basal y el metabolismo durante el sueño), además del uso preferencial de carbohidratos, los cuales son evidentes al inicio de la gestación (Butte et al., 1999). Por lo tanto, la sensibilidad a la insulina al inicio de la gestación en los tejidos es normal o se encuentra aumentada, pero el consumo de glucosa por la placenta y el crecimiento fetal, hace que la madre se encuentre predispuesta a la hipoglucemia en el ayuno. Además, los niveles de lípidos y del factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) se ven reducidos al inicio de la gestación (Rojas-Rodriguez et al., 2015).

A la mitad de la gestación, el metabolismo materno se dirige todavía más hacia el almacenamiento de energía y al desarrollo útero-placentario. Existe un aumento en la fase 1 de la secreción de insulina (hiperinsulinemia), mientras la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de glucosa en el ayuno no sufren modificaciones importantes (Sonagra et al., 2014). Sin embargo, la hiperinsulinemia que surge promueve un estado de lipogénesis constante y se limita la oxidación de ácidos grasos, facilitando las reservas de

grasa en la madre (Butte, 2000). Además, existen altas concentraciones de leptina (hiperleptinemia), provenientes del tejido adiposo y la placenta, promoviendo el almacenamiento de tejido adiposo (Augustine et al., 2008)

Por otra parte, en el intestino la absorción de calcio aumenta en el segundo trimestre del gestación, promoviendo el reservorio de calcio para la demanda fetal que se presentará para el desarrollo de los huesos (Freemark, 2006). También se conoce que la gluconeogénesis hepática durante esta etapa del gestación incrementa de manera significativa, 16 al 30%, cuando el suministro de nutrientes por parte de la madre no es suficiente o en un estado de ayuno, además la utilización de glucosa por parte del músculo y el tejido adiposo decrece (Bell and Bauman, 1997).

En un estado de ayuno, la madre tiene sistemas compensatorios para suministrar al feto de energía, por ejemplo, el sistema simpático-adrenal promueve la gluconeogénesis hepática y la movilización de las reservas de grasa de la madre, provocando una cetogénesis y un aumento de ácidos grasos libres (Butte et al., 2004). Además, los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se encuentran aumentadas al final de la gestación, debido a una baja en la actividad de la lipasa hepática (LH) y de la lipoproteín-lipasa en el tejido adiposo. Sin embargo, las lipasas que se encuentran en la placenta están activas y promueven la degradación de triglicéridos hacia el feto, así la captación rápida y eficiente es facilitada por el tamaño de la placenta (Sivan and Boden, 2003).

En la gestación normal, la glucosa y los nutrientes son suministrados al feto de una manera bien regulada. La transferencia de glucosa al feto se realiza por difusión facilitada, principalmente por el transportador GLUT1, determinada por el gradiente materno fetal de la misma; el nivel de glucemia fetal suele ser 10 a 20 miligramos menor que el materno (Reyna and Torres, 2005). Estos cambios que sufre la madre en su metabolismo debido al desarrollo del feto y sus anexos, principalmente afectan al metabolismo de los hidratos de carbono, ya que se le ha dedicado una especial atención dado que es considerado un factor diabetogénico en potencia en la gestación.

Al final de la gestación, el metabolismo de los lípidos también se encuentra modificado; diversos estudios demuestran que las concentraciones de triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y fosfolípidos se ven aumentados en el gestación, promoviendo un estado de hipertrigliceridemia (Ryckman et al., 2015). Este cambio de un estado anabólico a catabólico, promueve el uso de lípidos como fuente de energía para la madre preservando la glucosa y aminoácidos para el feto. En el tercer trimestre, una de las

adaptaciones metabólicas que sufre la madre, es una disminución en la captación de glucosa, por lo tanto, se desarrolla un estado de insulinoresistencia donde la sensibilidad decrece más del 40% (Catalano et al., 2003). Las acciones que acontecen en esta etapa se describen más adelante.

Metabolismo nitrogenado en la gestación

Además de las alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de carbohidratos en la gestación, existen modificaciones importantes en el metabolismo de proteínas donde la síntesis de éstas es esencial para el crecimiento del feto. Por lo tanto, la retención de nitrógeno se aumenta en la gestación, tanto en la madre como en el feto, así los aminoácidos son otros de los nutrientes que pasan por la placenta. Se estima que hay un aumento de 500 gramos en la acumulación de proteínas a las 30 semanas de gestación y existe una diferencia significativa en la mayoría de las concentraciones de aminoácidos en estado de ayuno, esto comparado entre mujeres gestantes y no gestantes (Metzger, 1997).

En un estudio durante la gestación, demostró que la síntesis de proteínas es similar entre mujeres embarazadas y no embarazadas en el primer trimestre. Sin embargo, un aumento del 15% se produce en el segundo trimestre y un aumento adicional de aproximadamente 25% se produce en el tercer trimestre. En este mismo estudio se determinó que las madres que habían aumentado la ingesta de proteínas a la mitad de la gestación, tenían bebés con un aumento en la masa corporal magra (Duggleby and Jackson, 2002).

Los aminoácidos se pueden utilizar ya sea para la acumulación de proteína o como fuente oxidativa de energía en la gestación. En un estudio, demostró que era necesario que se produjeran las modificaciones metabólicas en la madre al inicio de la gestación para observar el incremento en la acumulación de proteínas por parte del feto en su etapa de desarrollo. A través de isótopos estables demostraron que había una disminución en la síntesis de urea en el segundo y tercer trimestre de la gestación. Además encontraron un decremento en la tasa de transaminación de la leucina al final de la gestación y especularon que los bajos niveles de transaminación de aminoácidos de cadena ramificada eran por la poca disponibilidad de aceptores de nitrógeno, como el α -cetoglutarato, debido al estado de resistencia a insulina evidente en la gestación (Kalhan et al., 1998). Por otra parte, también se determinó que la disminución en la sensibilidad a

la insulina al final del gestación, correlaciona con bajo recambio (síntesis y degradación) de la leucina (Catalano et al., 2003). Con estos antecedentes podemos pensar que el ciclo de la urea sufre modificaciones, posiblemente en algunas de las enzimas de este ciclo, con la finalidad de aumentar las reservas de moléculas nitrogenadas, las cuales sirven de sustrato para la síntesis de proteínas en el feto.

Insulinorresistencia: tercer trimestre de la gestación

Durante el tercer trimestre de la gestación, la sensibilidad de los tejidos maternos a la insulina disminuye, produciéndose una resistencia a la insulina de origen fisiológico, que genera hiperglucemia. Ésta hiperglucemia promueve un aumento de la producción y la secreción de insulina en el páncreas. La resistencia a la insulina causa un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y como consecuencia cetonemia en un estado de ayuno. Todo lo anterior produce mayor disponibilidad de nutrientes para el feto.

Uno de los primeros estudios que demostró que la acción de la insulina se ve disminuida entre un 50 y 70%, al final del gestación con respecto a mujeres no embarazadas, a través de la técnica de fijación (en inglés clamp) hiperinsulinémico y la prueba de tolerancia a la glucosa (vía intravenosa) (Ryan et al., 1985). También se demostró que al final del gestación, las reservas de tejido adiposo en ciertas regiones empiezan a decrecer, así los niveles de ácidos grasos libres incrementan en un estado postprandial y la captación de glucosa estimulada por la insulina decrece (Catalano et al., 1999).

Un estudio reciente en humanos, evaluó el grado de resistencia a la insulina durante cada uno de los 3 trimestres del gestación en mujeres, comparándolo con un grupo de no gestación. Ellos demostraron a través de diversas técnicas y modelos matemáticos para determinar resistencia a la insulina, como el índice HOMA-IR (Evaluación del modelo homeostático-Resistencia a la insulina) y el índice QUICKI (Índice cuantitativo de control de la sensibilidad a la insulina), así como los niveles de insulina en ayuno se ven alterados tanto en el segundo como en el tercer trimestre de la gestación, con respecto al primer trimestre y el grupo control (no gestante). Esto demuestra que en humanos, desde el segundo trimestre comienza a bajar la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la relación glucosa/insulina en el ayuno únicamente es menor en el tercer trimestre del gestación, donde el grado de resistencia incrementa significativamente (Sonagra et al., 2014). Por otra parte, en un estudio en mujeres embarazadas, determinó que el espesor del tejido adiposo subcutáneo correlaciona con marcadores de inflamación y hemoglobina

glucosilada alta. Por lo tanto, pudieron relacionar los altos niveles de tejido adiposo subcutáneo con el desarrollo de enfermedades metabólicas en la gestación (Kosus et al., 2014).

La mayoría de las gestantes responden a estos cambios produciendo la debida cantidad de insulina. Sin embargo, aquellas que no logran realizar esta compensación, entre el 3 y 7%, se transforman en intolerantes a la glucosa en grados variables, haciéndolo evidente entre las 26 y 30 semanas de gestación, lo cual puede desencadenar una patología, denominada como diabetes gestacional.

La diabetes gestacional es una de las más comunes complicaciones médicas en la gestación, la cual puede tener repercusiones muy importantes en la salud de la madre y del feto. Esta patología es definida como una intolerancia a la glucosa con inicio o etología durante la gestación (Catalano et al., 2003).

Por otra parte, se conoce que la resistencia a la insulina presente al final de la gestación, es mediada por una serie de factores tales como el incremento en los niveles de estrógeno, progesterona, el lactógeno placentario humano (hPL), entre otras hormonas. Por lo tanto, los cambios en los niveles de hormonas al tercer trimestre de la gestación, son correlacionados con el decremento en la sensibilidad a la insulina, tanto en humanos como en animales.

Hormonas de la gestación y su relación con resistencia a insulina

La aparición de la resistencia a insulina en la gestación es multifactorial, pero como ya se dijo anteriormente los altos niveles de hormonas características del gestación, han sido objeto de estudio para el entendimiento de este fenómeno al final de la gestación (Freemark, 2006; Vejrazkova et al., 2014).

Hormona de crecimiento placentaria. La hormona de crecimiento placentaria humana (hPGH) es producida por el sincitiotrofoblasto, incrementando su concentración de manera considerable al inicio de la vigésima semana de gestación. Esta hormona, es el producto de la variante del gen de la hormona de crecimiento humana, la cual no está regulada por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH).

La sobreexpresión de esta hormona placentaria en ratones transgénicos, estimula un aumento en el peso corporal (84%) y en las concentraciones de IGF-1 (56%), pero reduce grasa en el individuo (Barbour et al., 2002). Además, la sensibilidad a la insulina es

marcadamente reducida, a consecuencia de un decremento en IRS-1 y reduce la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática en las células de músculo esquelético (Barbour et al., 2004). Por lo tanto, la hormona de crecimiento placentario humana (hPGH), puede tener efectos diabéticos, tales como producir hiperinsulinemia y la disminución de la síntesis de glucógeno, así como el deterioro de la capacidad de la insulina para suprimir la gluconeogénesis hepática. Un estudio en humanos, demostró la capacidad que tiene esta hormona para producir resistencia a la insulina, aumentando la expresión de la subunidad p85 α de la PI3K, esto promueve que p85 α actúe como dominio competitivo negativo para la formación del heterodímero con la subunidad p110, provocando la inhibición de la actividad de la PI3K e interrumpiendo la vía de señalización en el músculo esquelético (Barbour et al., 2005).

Lactógeno Placentario. Otra hormona relacionada con la resistencia a insulina en la gestación, es el Lactógeno Placentario humano (hPL), la cual tiene concentraciones que se detectan en suero a las 4 o 5 semanas de gestación. Se demostró en modelos *in vitro* que el lactógeno placentario humano (hPL), aumenta la lipólisis y los ácidos grasos libres en los adipocitos (Handwerger and Freemark, 2000). Además aumenta alrededor de 30 veces su concentración a través de la gestación. Esta hormona promueve de manera muy importante el crecimiento del islote pancreático, la producción de insulina y su liberación aumentando de esta manera los niveles séricos de esta hormona (Brelje et al., 1993).

Progesterona. La progesterona es otra de las hormonas relacionadas con la aparición de resistencia a la insulina. Estudios iniciales en adipocitos de rata demostraron que esta hormona produce una disminución de la fosforilación de la glucosa a través de la hexocinasa (Sutter-Dub, 1986). Un estudio más reciente, identificó que la progesterona inhibe la captación de la glucosa, afectando varios pasos de la vía de la señalización de la glucosa en una línea celular de adipocito 3T3-L1. Una concentración de progesterona 10⁻⁴ M, disminuye la expresión de la proteína IRS-1, así como la translocación de GLUT4, lo cual fue comprobado a través de un ensayo de incorporación de 2-[3H]-desoxiglucosa estimulada con insulina (Wada et al., 2010).

Cortisol. También las concentraciones de cortisol libres han sido vinculadas con la resistencia a la insulina, debido a que sus niveles en el tercer trimestre de la gestación

son casi del doble con respecto al no gestante. Éste proceso es estimulado por la hormona de liberación placentaria de corticotropina y por un aumento en la actividad del eje hipotalámico-adrenocortical. El cortisol estimula la gluconeogénesis hepática (Mastorakos and Ilias, 2003) y aumenta la fosforilación de AKT y de GSK3 β en el hígado de ratones al final del gestación (Vaughan et al., 2015).

Otras hormonas que han sido relacionadas con el fenómeno de resistencia a insulina en la gestación son: la hormona gonadotropina coriónica humana, la cual disminuye la sensibilidad a la insulina y promueven inflamación en una línea celular de adipocitos (Ma et al., 2015); la prolactina, que reduce la actividad de las lipoproteinlipasas en tejido adiposo y modifica la sensibilidad a la insulina en la gestación (Ramos-Roman, 2011); así como las altas concentraciones de estrógenos al final del gestación, especialmente del 17 β -estradiol, el cual se ha determinado que disminuye la sensibilidad a la insulina (Vejrazkova et al., 2014).

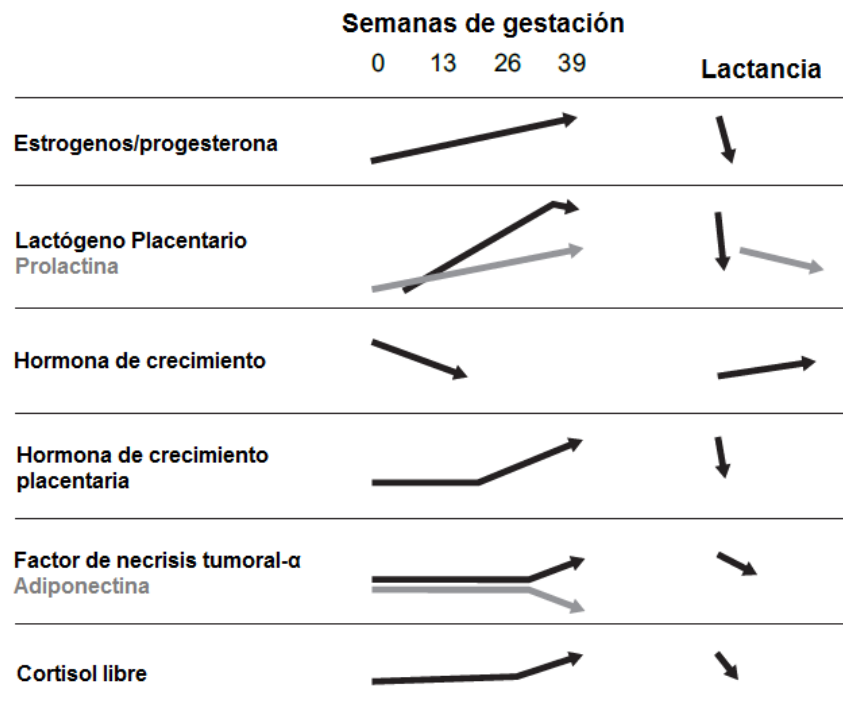


Figura 8. Principales cambios en hormonas y adipocinas durante la gestación. Tomado de Freemark 2006.

Adipocinas en la gestación

Algunos estudios han demostrado el rol que pudieran tener las adipocinas, producidas por el tejido adiposo, en la aparición de resistencia a la insulina en la etapa final de la gestación, así como la subsecuente aparición de diabetes gestacional. (Fasshauer et al., 2014). Entre ellas se encuentran involucradas la leptina, el TNF- α , resistina, adiponectina solo por mencionar las más relevantes y estudiadas (Noureldeen et al., 2014).

El aumento del tejido adiposo puede estar dado por un aumento en el contenido de triglicéridos en el adipocito o por un aumento en el número de éstos. Los adipocitos de gran tamaño poseen una mayor síntesis y liberación de productos de secreción del tejido adiposo (adipocinas) que pueden interferir en la cascada de señalización de la insulina, provocando resistencia a esta hormona, entre las que destacan la leptina, resistina, TNF- α , entre otras (Korkmazer and Solak, 2015).

Un estudio pone de manifiesto, que después de las 30 semanas de gestación, las concentraciones en plasma del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) se ven aumentadas. Tanto el tejido adiposo como la placenta contribuyen al aumento de esta citocina, la cual inhibe la captación de glucosa estimulada por insulina en músculo esquelético y estimula la lipólisis en el tejido adiposo blanco (Al-Badri et al., 2015). Estos efectos son mediados, por una reducción en la fosforilación del receptor a la insulina y los sustratos IRS-1, IRS-2. Los efectos de TNF- α , promueven un decremento en adiponectina, lo cual exacerba un estado postprandial hiperinsulinémico (Kirwan et al., 2002). Otras de las adipocinas que más se les ha relacionado y caracterizado en la gestación son la adiponectina y la leptina, sintetizadas principalmente por el tejido adiposo. En la gestación los niveles de leptina se ven aumentados (hiperleptinemia), la cual es una característica de la resistencia a la insulina. En cambio, las concentraciones de adiponectina se ven disminuidas (Lihn et al., 2005). En un estudio realizado en el 2013, evaluó la relación adiponectina/leptina y la resistencia a insulina en la gestación a través del índice HOMA-IR. Ellos reportan una correlación positiva entre los niveles de leptina con este índice. En cambio esta relación no se encontró entre el índice HOMA-IR y las concentraciones de adiponectina; al contrario, la relación era inversamente proporcional: a mayor concentración de adiponectina, menor grado de resistencia a insulina (Skvarca et al., 2013). Durante varios años se buscó aumentar las concentraciones de adiponectina en personas con diabetes tipo II y en diabetes gestacional como posible tratamiento para estas patologías.

Alteraciones en las proteínas de señalización de la insulina en el gestación

Algunos estudios han determinado alteraciones en la vía de señalización de la insulina, en la etapa final de la gestación en humanos, principalmente en biopsias de músculo esquelético y tejido adiposo, en el hígado no se tienen reportes. Sin embargo, estos estudios principalmente se realizaron en pacientes embarazadas con obesidad o diabetes gestacional. Además, ante lo complicado de obtener biopsias de tejidos en humano durante el periodo gestacional, para entender las modificaciones en la vía de señalización de la insulina, se han utilizado preferentemente modelos animales, principalmente rata y ratón, entre otras especies. Es importante entender que las diferentes concentraciones de hormonas y adipocinas en la gestación, hacen que cada tejido responda de manera diferente, por lo tanto, los mecanismos de resistencia a insulina al final de la gestación son diversos en los principales tejidos sensibilidad a la insulina: hígado, tejido adiposo y músculo esquelético (Gonzalez et al., 2002).

Músculo

Algunos estudios trataron de determinar las alteraciones en la vía de señalización de la insulina en el músculo esquelético, en pacientes con diabetes gestacional. Por ejemplo, se analizaron los niveles de IRS-1 en biopsias de músculo en mujeres obesas en gestación y en mujeres con diabetes gestacional, en las cuales se encontraron una disminución en la abundancia de la proteína total en ambos grupos, entre 30 y 50% respectivamente, comparado contra obesas no gestantes (Friedman et al., 1999).

Un año después, estudios en humanos en la etapa final de la gestación, obtuvieron muestras de músculo esquelético con el objetivo de medir los sitios de fosforilación en residuos de tirosina en el receptor de insulina. Las pacientes con diabetes gestacional tienen una reducción significativa en la fosforilación de estos residuos a diferencia de personas obesas en gestación (Shao et al., 2000). Posteriormente, se demostró que los niveles de p85 α en el músculo recto del abdomen se encontraron elevados de 1.5 hasta 2 veces más en pacientes obesas embarazadas con respecto a mujeres obesas no embarazadas (Catalano et al., 2002).

Un mecanismo que trata de explicar la resistencia a insulina en el músculo, es la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina. Esto se debe a que la fosforilación en estos sitios disminuye la fosforilación de residuos de tirosina en IRS-1, y por lo tanto, disminuye

la actividad de la PI3K (Stuart et al., 2014). De hecho, se detectó que la fosforilación de serina 307/312 (ratón/humano) ocurren principalmente en gestantes con diabetes gestacional a diferencia de una gestante normal (Moeschel et al., 2004).

Dos estudios realizados en población asiática, analizaron los cambios en las proteínas de señalización de la insulina en la etapa final de la gestación. En el primero, midieron los niveles de expresión del ARNm y de las proteínas: PI3K, AKT y GSK3 β , en biopsias de músculo esquelético (*fectus abdominus*) en pacientes con diabetes gestacional y gestación normal. Sus resultados mostraron un incremento significativo en la expresión de la unidad p85, de la PI3K, mientras que reportan bajos niveles de fosforilación en residuos de serina en AKT y la GSK3 β , en el grupo de pacientes con esta patología con respecto al grupo control (Zhang et al., 2014). En el segundo estudio, se demostró una disminución en los niveles de fosforilación en residuos de tirosina en el receptor a la insulina en pacientes con diabetes gestacional, comparados con un grupo control de gestación, además de mostrar una correlación positiva con el índice HOMA-IR (Chu et al., 2014).

Tejido Adiposo

Con respecto al tejido adiposo, se conocen que existen cambios moleculares durante la etapa final de la gestación entre los que se incluyen una reducción en el factor transcripcional PPAR1- γ (Zeghari et al., 2000), el cual es responsable de activar genes adipogénicos. Por lo tanto, disminuye la adipogénesis y se favorece la lipólisis, como ya se dijo previamente.

En un estudio se analizaron biopsias de tejido adiposo de la pared abdominal en pacientes al final de la gestación, con diabetes y sin diabetes, en el cual se confirmó que solo IRS-1 se ve disminuido en un estado de diabetes gestacional (Catalano et al., 2002). Interesantemente, las embarazadas sanas (grupo control), con resistencia a la insulina fisiológica, no muestran ningún efecto adverso en esta proteína (IRS-1). Esto nos habla de la diferencia de padecer una patología como es la diabetes gestacional, al compararla con una gestación normal.

Uno de los estudios más recientes usando un modelo animal, trató de caracterizar el mecanismo molecular de la insulinoresistencia en el tejido adiposo al final de la gestación en ratas. Tomaron tejido adiposo localizado en la región lumbar en gestantes (día 20) y no gestantes, tras una estimulación con insulina por 90 segundos vía portal. Los resultados no muestran cambios significativos en la proteína total del receptor a insulina (IR), IRS-1,

PI3K y PTEN. Sin embargo, encontraron un decremento en los niveles de la fosforilación de residuos de tirosina en receptor a insulina (IR) y IRS-1, así como de AKT en serina 473. Esta alteración en el IRS-1, ocurre en conjunto con un incremento en la fosforilación del IRS-1 en serina 307 (Sevillano et al., 2007).

Hígado

En el caso del hígado, a pesar de ser uno de los órganos más importantes en el almacenamiento de la glucosa a través de glucógeno (glucogénesis) y de la síntesis de la glucosa (gluconeogénesis) existen pocos trabajos que hayan estudiado este órgano en la gestación. Un estudio realizado en perros sugirió el papel del hígado al final de la gestación, donde reportan un “retardo” en la respuesta de este órgano tras un estado postprandial, ya que la síntesis de glucógeno hepático se ve ligeramente disminuida. Además, demuestran un aumento en la intolerancia a la glucosa que correlaciona con resultados perinatales adversos, resaltando la importancia de la normoglicemia en el gestación (Coate et al., 2013). Sin embargo, no exploran la vía de señalización de la insulina.

PTEN y su relación con resistencia a la insulina en el gestación

Recientemente se publicó que las pacientes con diabetes gestacional tienen un mayor grado de resistencia a insulina que un grupo de embarazadas sin esta patología, entre las 24-28 semanas de gestación. Además, encontraron una correlación positiva entre los niveles de resistencia a la insulina y las concentraciones de la proteína PTEN en plasma, en pacientes con diabetes gestacional (Li et al., 2015). Por lo tanto, se volvió de nuestro interés saber el papel de la proteína PTEN, en la resistencia a la insulina en la gestación.

GSK3 y su relación con resistencia a la insulina en el gestación

Algunos estudios determinaron un incremento en la actividad de GSK3 en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, en animales con susceptibilidad a la obesidad y alimentados con una dieta alta en grasa (Eldar-Finkelman et al., 1999) y en pacientes con resistencia a la insulina (Nikoulina et al., 2000). Sin embargo, se desconocía el papel de esta proteína en la gestación.

En 2010, se determinó en pacientes con diabetes gestacional, un cambio importante en la abundancia del ARNm de GSK3: aumenta en el tejido adiposo, pero disminuye en el músculo. A pesar de esto, no se evaluaron cambios a nivel proteico (Colomiere et al., 2010). Posteriormente este mismo grupo, encontró que la fosforilación de GSK3 β en serina 9, es menor en pacientes con diabetes gestacional, en muestras de tejido adiposo visceral y músculo esquelético. Ellos llegan a la conclusión, que la actividad exacerbada de GSK3- β , en estos tejidos es crucial para el desarrollo de diabetes gestacional, promovido por un aumento en el estado inflamatorio de estos pacientes (Lappas, 2014). Sin embargo, se carece de estudios donde se determine qué sucede con esta proteína en la etapa final de la gestación.

Antecedentes específicos

En el laboratorio se efectuaron curvas de tolerancia a la insulina en ratones gestantes y no gestantes de la cepa C57BL/6J, con el objetivo de evaluar el grado de resistencia a insulina en la etapa final del gestación. Para lo cual, se utilizaron ratones hembra al día 14 y 17 de gestación, más un grupo de ratones no gestantes. A todos los grupos experimentales se les administró insulina regular humana, a una concentración de 1 UI/Kg (Datos no publicados, Canul-Medina 2014). Los resultados encontraron un cambio significativo en la curva de tolerancia a la insulina entre el día 17 gestación con respecto al día 14 gestacional y no gestante (Figura 9). Con base en estos estudios, se propuso analizar la vía de señalización de la insulina al día 17 gestacional en la cepa de ratones C57BL/6J en los tres principales tejidos sensibles a esta hormona.

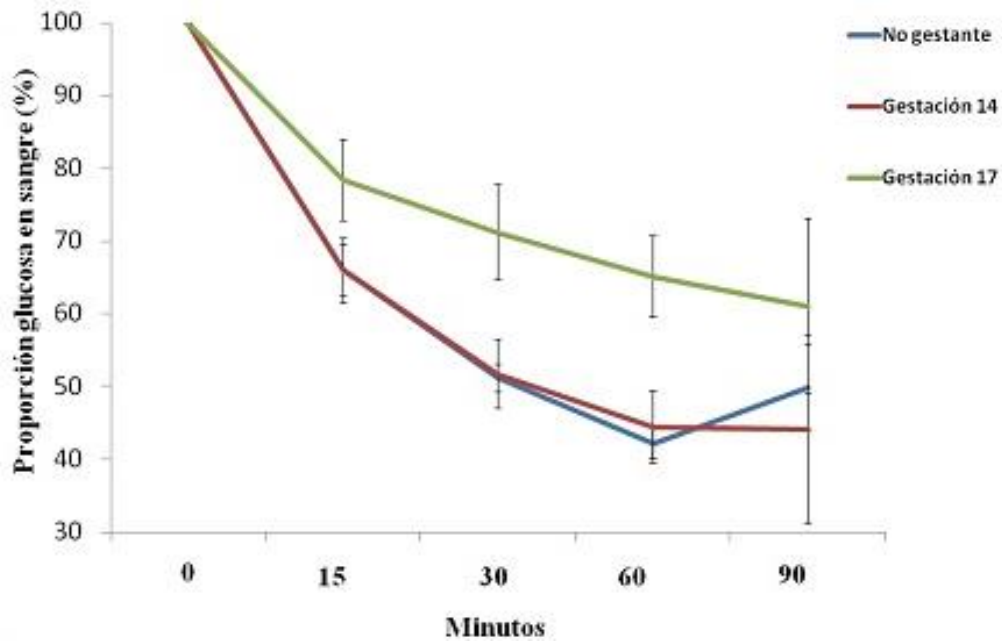
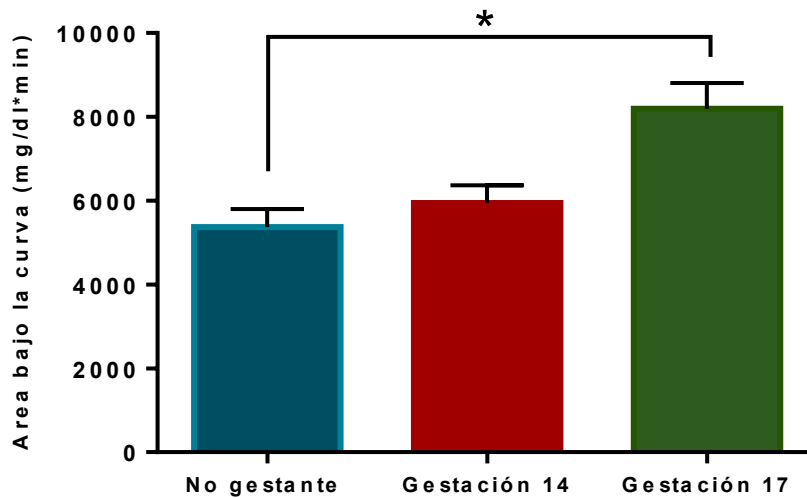
A**B**

Figura 9. A. Curvas de tolerancia a la insulina (1 UI/Kg) en el periodo gestacional y no gestante en ratones de la cepa C57BL/6J. Vía de administración intraperitoneal, grupo de gestación al día 14 (n=5), gestación al día 17 (n=9), grupo no gestante (n=11). **B.** Representación grafica del área bajo la curva (ABC) para cada grupo experimental. Prueba estadística t-student (No gestante contra Gestación 17), $p < 0.05$.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a la insulina se caracteriza por una disminución en la capacidad de la insulina de llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Esta afecta de manera específica a los órganos participantes en la homeostasis metabólica. Las causas moleculares de la resistencia a la insulina están dadas por cambios en la expresión de proteínas que participan en la señalización de la insulina.

La resistencia a la insulina es una condición que se presenta de manera normal en la etapa final de la gestación en los mamíferos. Diversos estudios han determinado el efecto que tienen las hormonas y las adipocinas en la producción de la resistencia a insulina al final de la gestación. Sin embargo, las alteraciones en la vía de señalización de la insulina en los tejidos sensibles a esta hormona, han sido poco estudiadas. La gran mayoría de los estudios se han realizado en condiciones no fisiológicas, principalmente, en gestantes obesas o con diabetes gestacional. Existen pocos estudios analizando los mecanismos moleculares que acontecen en la resistencia a la insulina en la gestación en condiciones fisiológicas. Los estudios existentes analizan de manera parcial sólo algunas proteínas de la vía de señalización enfocándose en un solo tejido. En este trabajo, proponemos determinar las modificaciones en proteínas de la vía de señalización de la insulina en la etapa final de la gestación en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, tejidos sensibles a esta hormona que regulan la homeostasis de la glucosa.

HIPÓTESIS

Existe una expresión y fosforilación diferencial en las proteínas de la vía de señalización de la insulina en los tejidos sensibles a esta hormona, en la etapa final de la gestación.

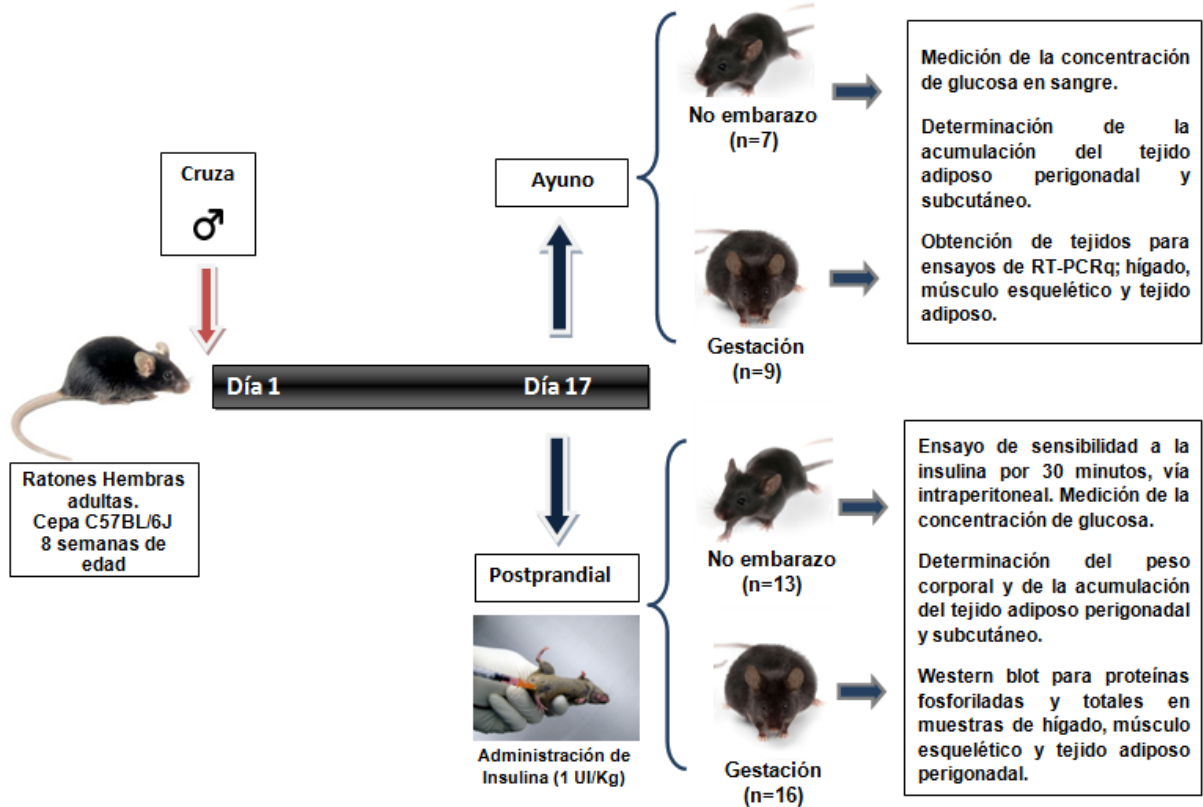
OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios de expresión y fosforilación que se producen sobre las proteínas de la vía de señalización de la insulina en la etapa final de la gestación, en ratones de la cepa C57BL/6J, comparado con no gestantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto de la gestación (día 17) sobre los niveles de glucosa en sangre.
- Medir los cambios en las concentraciones de glucosa sanguínea en respuesta a la insulina (1 UI/Kg) en el día 17 de gestación y en ratones no gestantes.
- Evaluar si la resistencia a la insulina en la gestación se encuentra correlacionada con el peso corporal.
- Determinar los cambios que produce el embarazo en el peso de diferentes depósitos de grasa (tejido adiposo perigonadal y subcutáneo), al día 17 gestacional con respecto al grupo no gestante.
- Analizar los cambios que se producen al final del embarazo en la expresión del ARNm de PTEN, los niveles de expresión de proteínas totales de AKT y PTEN, así como los niveles de fosforilación de la proteína AKT (T308), PDK-1 (S241), GSK-3 β (S9) y PTEN (S380) en el hígado, músculo y tejido adiposo.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo animal

Para este estudio se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa C57BL/6J de siete semanas de edad, los cuales fueron comprados a la empresa Harlan Laboratories S.A. DE C.V. Estos ratones se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, con libre acceso de agua y alimento durante todo el periodo experimental. Los ratones que se utilizaron para este estudio, fueron las hembras que resultaron preñadas y no preñadas de cruza entre machos y hembras de ocho semanas de edad.

Experimento de sensibilidad a la insulina

Al día 17 de gestación a las 10 a.m. (en estado postprandial), tanto a ratones gestantes y no gestantes (control) se les administró insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly) a una concentración de 1 UI/Kg, vía intraperitoneal. Después de 30 minutos, cada animal fue anestesiado con Sevoflurano (Sevorane, Abbott México) y sacrificada para la obtención de tejidos de interés; hígado (lóbulo frontal), músculo esquelético (cuádriceps femoral) y tejido adiposo inguinal subcutáneo y perigonadal. Los tejidos obtenidos se guardaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se conservaron en nitrógeno líquido. Al finalizar el sacrificio todas las muestras se guardaron a -70 °C. Estos tejidos fueron utilizados para la extracción de proteína total y para evaluar los niveles de fosforilación de proteínas de la vía de señalización de la insulina. Durante este experimento se midieron las concentraciones de glucosa en sangre, mediante un pequeño corte en la cola a cada ratón, antes de la inyección intraperitoneal de insulina (tiempo 0) y previo al sacrificio del animal (30 minutos). Las concentraciones de glucosa se determinaron usando un glucómetro (Precision QID, MediSense, Abbott Laboratories) y tiras reactivas de glucosa en sangre (FreeStyle, Optium, Abbott).

Animales en ayuno

Adicionalmente, se manejó un lote para la medir la abundancia del ARNm de proteínas implicadas en la vía de señalización a la insulina en un estado de ayuno. Para lo cual se realizaron las cruza correspondientes y después fueron separadas las hembras preñadas y no preñadas. Al día 17 gestacional, ambos grupos experimentales fueron

sometidos a restricción de alimento por 8 horas, iniciado a las 7:00 a.m. y finalizado a las 3:00 p.m. Después de ese tiempo, se procedió al sacrificio de cada animal. Se extrajeron los tejidos de interés ya mencionados los cuales fueron guardados en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían 1 mL de Trizol Reagent (Ambion/RNA, Life Technologies). Al terminar el experimento, todas las muestras se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas muestras fueron destinadas para la extracción de ARN total y para medir la abundancia del ARNm, por la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-PCRq).

Previo al sacrificio, también fueron determinadas las concentraciones de glucosa después de las 8 horas de ayuno, en muestras de sangre obtenidas mediante un pequeño corte en la cola, como se describió previamente.

Homogenización de tejidos para la extracción de RNA total

Se realizó la extracción de RNA total de las muestras previamente almacenadas con 1 mL del reactivo trizol, únicamente las biopsias de hígado y tejido adiposo perigonadal fueron procesadas. Las muestras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se colocaron en hielo y se dejaron descongelar durante 10 minutos. Para el proceso de homogenización se utilizaron tubos cilíndricos donde fueron colocadas y homogenizadas con ayuda del polytron (PT-1035, POLYTRON); 12 segundos para el caso del tejido hepático y 30 segundos para el tejido adiposo. Entre cada muestra se realizaron lavados para limpiar la punta del equipo con agua desionizada estéril que contenía DEPC (dietil-pirocarbonato, Sigma-aldrich) al 0.1%. Una vez disgregado cada uno de los tejidos de los 2 grupos experimentales (control y gestación), se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó 200 μL de cloroformo (Sigma-aldrich), y se dejaron en reposo por 5 minutos. Después las muestras se centrifugaron (Centifuge 5804R, Eppendorf) a 12500 rpm por 15 minutos ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tras este paso, se obtuvieron 3 fases y se recuperó el sobrenadante sin tocar la fase media. Posteriormente, agregamos 700 μL de Isopropanol grado biología molecular (Sigma-aldrich) para cada muestra y se dejaron reposar por 10 minutos en hielo, después se centrifugaron a 12500 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En el siguiente paso se decantó cada uno de los sobrenadantes, quedándonos con el pellet o pastilla. Después lavamos cada uno de estos pellets con 1 mL de etanol de grado biología molecular (Millipore Corporation) al 75%, previamente refrigerado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e inmediatamente se centrifugó a 8500 rpm por 5 minutos. Este paso se repitió 5 veces para

el caso del tejido hepático y 3 veces para el tejido adiposo perigonadal, se utilizaron 800 μ L de etanol frío al 75% para cada lavado.

En el último lavado, se retiró por completo el exceso de etanol y se dejó secar el pellet por 45 minutos a temperatura ambiente, en campana de flujo laminar. Una vez pasado este tiempo, se resuspendió cada pellet en 200 μ L de agua desionizada con 0.1% de DEPC para el tejido hepático, y 50 μ L para las muestras del tejido adiposo. Las muestras se congelaron a menos -70 °C.

Cuantificación de RNA total

La cantidad y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría a través del equipo Take3 (BioTeck Instruments) y se utilizó el programa Gen 5 (BioTeck Instruments). Se evaluaron las muestras por duplicado y se midieron a una absorbancia de 280 nm y 260 nm. Únicamente se consideraron muestras con un cociente mayor a 1.8 hasta 2, en la relación 280/260, así como una concentración de ARN mayor a 100 μ g/ μ L.

RT-PCR en tiempo real

Posteriormente, se evaluó la expresión relativa de ARNm para los genes de interés por medio de RT-PCR en tiempo real. La RT (Reverse Transcription) se llevó a cabo empleando el kit Reverse Transcription (Invitrogen) para lo cual se realizó el procedimiento sugerido por el fabricante. A partir de los datos obtenidos de la concentración del ARN purificado, se prepararon tubos de reacción de 20 μ L. Se utilizaron los siguientes reactivos para cada una de las reacciones de RT (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos utilizados en la RT

Reactivo	Cantidad
Buffer RT 5X (Invitrogen)	4 μ l
10 mM dNTP Mix (Invitrogen)	1 μ l
Oligo dT (Invitrogen)	1 μ l
Transcriptasa reversa MuLV (Invitrogen)	1 μ l
0.1 M de DTT (Invitrogen)	1 μ l
ARN (1000 ng) + Agua DEPC 0.1%	13 μ l
Volumen final de reacción	20μl

Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador (GeneAmp PCR System 2400, AppliedBiosystems) y se aplicó el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 37°C, 10 minutos a 85° y 30 minutos a 4°C. Cada tubo de reacción tuvo una concentración final de 50 ng/μL de ADN complementario (ADNc).

Finalizada la RT, se procedió a realizar la PCR en tiempo real. La Tabla 2, muestra las características de los oligonucleótidos que se emplearon en el presente trabajo. Los oligonucleótidos se mandaron a sintetizar a la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Las reacciones de PCR, con un volumen final de 10 μl, se prepararon de la siguiente manera: 5 μL del SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems), 0.5 μL del oligonucleótido sentido (5μM), 0.5 μL del oligonucleótido anti-sentido (5μM), 3 μL de agua desionizada estéril con DEPC 0.1% y 1 μl de ADNc de cada condición experimental.

Tabla 2. Características de los iniciadores utilizados para la RT-PCRq.

ARNm GenBank	Iniciadores	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)
<i>Pten</i> NM_008960	Sentido	GTTAGCCTCTTGATGTGTGCAT	58.99	101
	Anti-sentido	GGTAGCCAAACGGAACCTCA	58.11	
<i>Akt</i> NM_009652	Sentido	TACGAGATGATGTGTGGCCG	59.90	70
	Anti-sentido	TGAGGATCAGCTCGAACAGC	59.83	
<i>Cps-1</i> NM_001080809	Sentido	CATTGTGGGCGAATGCAACA	60.04	83
	Anti-sentido	ACAGCCTGGCATTCACTTCA	59.89	
<i>β-Actina</i> NM_007393	Sentido	CCA CCA TGT ACC CAG GCA TT	62.00	92
	Anti-sentido	AGG GTG TAA AAC GCA GCT CA	60.02	

El número de ciclos que se utilizó fue de 40, con la finalidad de obtener millones de copias del fragmento de nuestro interés. Para esto, se utilizó el equipo 7300 Real-Time PCR (AppliedBiosystems) y se determinó el ciclo umbral para cada gen de manera automática con ayuda del software. Las muestras se analizaron por triplicado para cada condición experimental y la expresión relativa de los genes de interés se analizó con el método $\Delta\Delta Ct$ (doble delta Ct), usando la abundancia de la proteína *β-Actina* como control interno.

Homogenización de tejidos para extracción de proteína

Los tejidos obtenidos se homogenizaron con ayuda del Polytron (PT-1035, POLYTRON) y la solución o buffer de lisis, la cual contenía los siguientes compuestos: HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, fluoruro de sodio 25 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, Tritón X-100 0.1% e inhibidores de proteasas y fosfatasa (MiniComplete, Roche Diagnostics), se utilizó una tableta de este inhibidor por cada 10 mL.

Cada tejido se homogenizó por 30 segundos a potencia #2 del Polytron, en hielo (4°C). Después cada homogenizado se centrifugó (Centrifuge 5804R, Eppendorf) a 12,500 rpm durante 45 minutos y se recuperó el sobrenadante (almacenado a -70°C).

La cantidad de solución de lisis dependió de cada tejido; para el lóbulo frontal del hígado se utilizaron 900 µL, el músculo esquelético (unilateral) 300 µL y para el tejido adiposo perigonadal 250 µL. Para este último tejido, a la solución de lisis se le adicionó desoxicolato 0.1 % (Sigma-Aldrich). Este compuesto se utilizó para emulsificar la grasa de este tejido y obtener una mayor cantidad de proteína.

Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford

La determinación de la concentración de proteína para cada tejido se realizó por el método de Bradford. Para lo cual se utilizó el kit Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva estándar a partir de una solución de albúmina bovina sérica (BSA, Sigma-Aldrich) en un rango de 0-20 µg/mL.

Después, 1 µL de cada muestra se diluyó en 799 µL de agua desionizada, a cada tubo se agregó 200 µL del reactivo de Bradford y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 595 nm, utilizando un lector de microplacas Sinergy HT (BioTeck Instruments, Inc). Se realizó una regresión lineal para calcular la concentración de proteína de cada una de las muestras, en relación a los puntos de la curva estándar de albúmina (BSA).

Electroforesis en geles de poliacrilamida e Inmunotransferencia (Western Blot).

Para determinar los niveles de expresión relativa y fosforilación de las proteínas involucradas en la señalización de la insulina; AKT (T308), PDK1 (S241), GSK3β (S9), PTEN (S380), AKT y PTEN (totales), se utilizó la técnica de *Western-Blot* para cada uno de los tejidos de interés. Primero, se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (solución

de bis-acrilamida 30%, SDS 10%, Tris 1.5M pH 8.8, persulfato de amonio 10%, TEMED), en los cuales se cargaron 50 µg de proteína previamente cuantificados por el método de Bradford para cada tejido y condición experimental. Las muestras se resuspendieron en buffer LEAMLI 4X (62.5 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 10% glicerol, 1% SDS y 0.005 de Azul de Bromefenol) y agua desionizada, con un volumen final de 30 µL. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.), usando 3 µL en el primer carril de cada gel. Se realizó el corrimiento electroforético a 60 V durante 30 minutos y después se dejó a 100 V durante tres horas y media, usando la solución de corrida 1X (Tris -base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 10%) en el sistema de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Posteriormente, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc.) de 8X6 centímetros, se aplicó una corriente constante de 100 V durante 1 hora y media usando la solución de transferencia 1X (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 10%, metanol 20%) en el sistema de electrotransferencia Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Al terminar las membranas se lavaron con TBS-Tween (Tris-base 50 mM, NaCl, Tween 0.1%, pH 7.4) durante 5 minutos y después se incubaron con solución de tinción rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich), de esta manera se confirmó la transferencia de proteínas a la membrana.

Después las membranas se lavaron con solución TBS-Tween 0.1% hasta que desaparecieron las bandas teñidas. Las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (Tris-base 50 mM, Tween 0.1% pH 7.4, leche Svelty baja en grasa 5%) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se incubaron los siguientes anticuerpos primarios para cada una de las membranas: anti-fosfo AKT (T308), anti-fosfo PDK-1 (S241), anti-fosfo GSK3β (S9), anti-fosfo PTEN (S380), anti-AKT y anti-PTEN (Cell signaling, Technology), anti-α-Tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CPS1 (Abcam). La incubación fue a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron con solución TBS-Tween 0.1% durante 10 minutos dos veces y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente: anti-conejo IgG-HRP (Cell signaling, Technology), anti-mouse IgG-HRP 0.02 µg/mL (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con solución TBS-Tween 0.1% durante 10 minutos dos veces. La detección de las bandas se realizó con el kit Immobilon

Western (Millipore Corporation) por reacción de quimioluminiscencia y se empleó el equipo Fusion FX (Vilber Lourmat).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la técnica de Western blot

Anticuerpos primarios			
Nombre del Anticuerpo	Marca	Dilución	Peso molecular
Phospho-Akt (T 308)	Cell Signaling, Technology	1:1000	60 kDa
Akt (pan) (C67E7)		1:2000	60 kDa
Phospho-GSK3β (Ser 9)		1:750	46 kDa
Phospho-PTEN (Ser 380)		1:1000	54 kDa
Phospho-PDK1 (Ser241)		1:1000	64 kDa
PTEN antibody		1:500	54 kDa
Anti-CPS1 antibody	Abcam	1:10000	165 kDa
α-Tubulin (B-7)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:5000	55 kDa
Anticuerpos secundarios			
Anti-rabbit IgG, HRP	Cell signaling, Technology	1:4000	
Anti-mouse IgG, HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:5000	

La densitometría de las bandas se realizó por medio del software Image J, el cual es proporcionado los Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH).

Inmunoprecipitación de proteína

Con el objetivo de identificar una proteína detectada por la inespecificidad del anticuerpo PTEN (S380) mediante la técnica de Western Blot, se realizó una inmunoprecipitación de proteína para aislar y concentrar una banda de interés con un peso aproximado de 170 kDa, usando el anticuerpo mencionado.

Se realizó esta técnica en 2 días consecutivos, en el primer día se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford (descrito previamente), 500 µg de proteína de un extracto de hígado en una muestra control. Después se utilizó Proteína G acoplada a agarosa de alta afinidad (Abcam), la cual fue homogenizada con ayuda de un vortex. Adicionamos 20 µL de la proteína G en tubos eppendorf, se realizó por triplicado. Después se adicionó el anticuerpo de PTEN (S380), dilución 1:100, y dejamos incubar por 2 horas en hielo. Después de este tiempo, se adicionó 500 µg de extracto proteico de hígado previamente cuantificado y se llevó a un volumen final de 250 µL con PBS 1X (previamente filtrado) para cada reacción, todas las reacciones se mantuvieron en hielo durante todo el ensayo. Finalmente, se colocaron cada uno de los tubos eppendorf en los orificios de la esponja del equipo vortex (Fisher Vortex). Se llevó el equipo vortex con las muestras al cuarto frío (4°C) y se dejó en agitación constante por 16 horas a una velocidad intermedia.

Durante el segundo día y después de las 16 horas, se colocaron cada uno de los tubos en hielo y se centrifugaron a 12500 rpm por 15 minutos a 4° C. Después, se retiró el sobrenadante y se adicionó 200 µL de PBS 1X filtrado y se centrifugó cada muestra a 12500 rpm, por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se volvió a retirar el sobrenadante, sin tocar el pellet con la punta de la pipeta y se repitió este procedimiento 2 veces más.

Terminando estos lavados, se conservó el pellet en hielo y se resuspendió cada muestra en 20 µL del amortiguador Leammli 2X. Después, se calentó cada muestra, a 94 °C, por 5 minutos y se cargaron de manera inmediata en geles de poliacrilamida al 10%. En el carril 1, se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se corrió la electroforesis a 100 Volts por 3 horas y media.

Por último, se tiñeron los geles de acrilamida con azul de Coomassie 250 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), por 10 minutos y se dejó toda la noche destiñendo con una solución de ácido acético, metanol y agua desionizada (4:1:5).

Al otro día, se observaron las bandas de interés, con un peso molecular aproximado de 160 kDa, estas bandas se recortaron con ayuda de un bisturí y se coloraron en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Identificación de la proteína aislada

Las muestras se trasladaron a la unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México. En ese laboratorio se realizó la identificación de la proteína de interés siguiendo el protocolo para la identificación de proteína que a continuación se describen.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (Sigma-Aldrich), alquiladas con iodoacetamido (Sigma-Aldrich) y digerida "in gel" con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin) Grade (Roche).

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore) y aplicados en un sistema LC-MS (Espectrofotometría de masas-cromatografía líquida) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo "en línea" se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 110 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μ m y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de

colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos.

El análisis para la identificación automática de proteínas se realizó a través el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) y los parámetros utilizados para la búsqueda fueron:

Motor de búsqueda: Sequest HT

Base de datos: uniprot-mus+muscululus

Modificación constante: Carbamidomethyl (Cisteinas)

Modificaciones variables: Oxidation (M) y Deamidated (NQ)

Enzima proteolítica: Trypsin

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prim Version 6.0 (GraphPad Software, Inc. USA). Los datos de las graficas se presentaron como la media \pm error estándar (EE) y se analizaron mediante una Prueba t-Student (datos paramétricos) o la prueba U de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Además, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró una significancia estadística con un valor de p menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Basándonos en los antecedentes específicos de nuestro grupo de investigación, en los cuales se determinó una disminución en la sensibilidad a la insulina al día 17 gestacional, a través de curvas de tolerancia a la insulina (1 UI/Kg) en la cepa C57BL/6J, con respecto al grupo no gestante. Decidimos evaluar qué ocurría en el día 17 gestacional, en las proteínas de la vía de señalización de la insulina en los tres principales tejidos sensibles a la insulina, con respecto a una condición de no gestación.

Niveles de glucosa en ayuno

Como primer objetivo nos planteamos determinar los niveles de glucosa en sangre, después de 8 horas de ayuno al día 17 gestacional y no gestante (control). Encontramos que el promedio de los niveles de glucosa en ambos grupos fueron similares; grupo no gestante 115 ± 13 , grupo gestacional 117 ± 12 mg/dL (Figura 10).

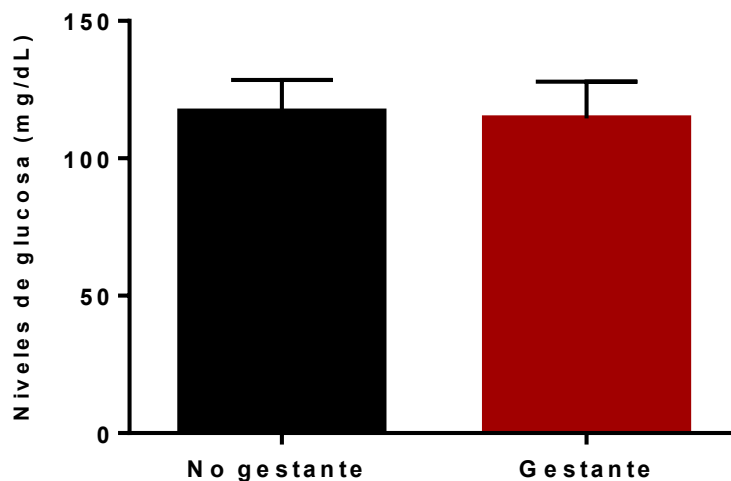


Figura 10. En la etapa final de la gestación no se modifican los niveles de glucosa en sangre, después de 8 horas de ayuno. Concentraciones de glucosa en sangre (mg/dL) \pm EE. Grupo gestante (día 17) (n=9). Grupo no gestante (n=7). Prueba estadística t-student, $p < 0.69$.

Sensibilidad a la insulina en el día 17 de gestación

Para evaluar los cambios en la sensibilidad de insulina durante en la gestación, se determinó el efecto de la administración de la hormona sobre la disminución de la glucosa sanguínea. Para lo cual se administró insulina (1 UI/Kg), vía intraperitoneal y después de 30 minutos se midieron las concentraciones de glucosa sanguíneas. En la tabla 4, podemos observar los valores de las concentraciones de glucosa a dichos tiempos para cada animal. Para el grupo control (no gestante) el promedio al tiempo 0 fue de 151 ± 4 mg/dL, después de 30 minutos el nivel de glucosa bajó en promedio a 83 ± 2 mg/dL. En el grupo gestante, el promedio al tiempo 0 fue de 148 ± 5 mg/dL y después de 30 minutos el promedio fue 118 ± 7 mg/dL. Para las hembras que se les administró solución fisiológica no se modificaron los niveles de glucosa, lo cual era esperado.

Estos resultados también se expresan de manera porcentual en la Figura 11. Como puede observarse, en el grupo no gestante (barras de color negro) los niveles de glucosa en sangre pasaron de un 100% a un $55\% \pm 2$, lo que representa una disminución del 45% en promedio. En cambio, el grupo gestante (barras de color rojo) los niveles de glucosa pasaron del 100% a un promedio de $81\% \pm 3$, lo cual resulta únicamente una disminución promedio del 20%. Al aplicar la prueba estadística *t*-student, para comparar estos dos grupos, muestra un valor de $p < 0.001$. Esto nos demuestra la presencia de resistencia a la insulina en la etapa final de la gestación en ratones de la cepa C57BL/6J.

Tabla 4. Valores absolutos obtenidos para cada ratón de las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dL) para cada grupo experimental

N°	No Gestante		Gestante		Peso (gr)	Disminución glucosa %	No Gestante	
	Insulina (1 UI/Kg)		Insulina (1 UI/Kg)				Sol. Fisiológica	
	0 min	30 min	0 min	30 min			0 min	30 min
#1	158	66	134	119	35	12	114	109
#2	152	77	165	143	31.7	14	118	115
#3	146	83	142	102	34.1	29	174	184
#4	149	84	146	85	33.5	42		
#5	181	78	167	149	32.1	11		
#6	155	82	184	167	32.2	10		
#7	159	78	150	85	33.3	44		
#8	130	82	168	128	35.9	24		
#9	137	90	166	145	33.1	11		
#10	166	97	119	95	33.6	20		
#11	145	91	155	139	36.8	10		
#12	152	89	151	132	35.6	13		
#13	140	86	116	82	31.1	29		
#14			126	108	37.8	14		
#15			148	136	38.3	8		
#16			136	72	37.9	47		
=	151 ±4	83 ±2	148 ±5	118 ±7	34.5± 0.5	21.1 ±3.3	135± 19	136 ±24

Se muestran las concentraciones de glucosa al tiempo 0 y a los 30 minutos ± EE. Además, se muestra el peso corporal (gr) y la disminución porcentual de glucosa en sangre después de los 30 minutos, únicamente para el grupo de gestación al día 17.

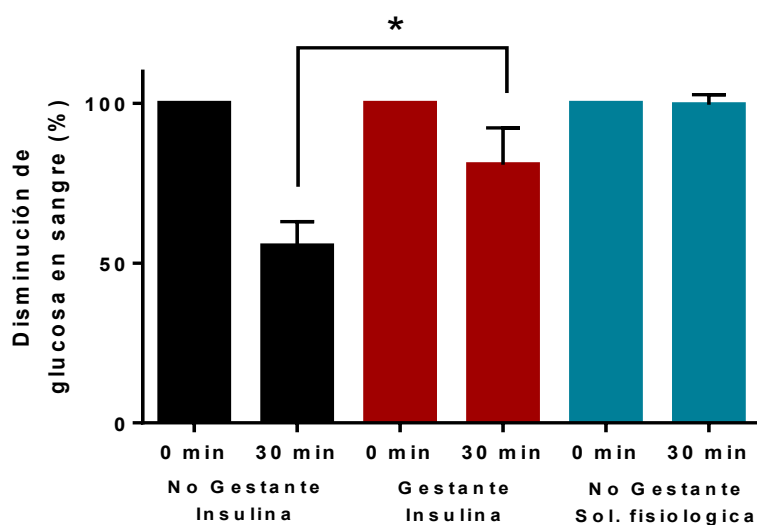


Figura 11. Disminución de la concentración de glucosa sanguínea representada de manera porcentual (%) en los 3 grupos de experimentación. Los datos de la gráfica representan el promedio porcentual, ± EE, No Gestante con insulina (n=13), Gestante día 17 con insulina (n=16), No gestante con solución fisiológica (n=3), Prueba t-student, p< 0.001.

Relación del peso corporal contra la disminución de glucosa en sangre al día 17 gestacional

Debido a que, como se observa en la Tabla 4, tres de las hembras gestantes mostraron una sensibilidad a la insulina similar al grupo no gestante, lo que indica que no todos los animales desarrollan resistencia a la insulina en esta etapa. Con base en ello nos planteamos que este efecto estuviese dado por el peso corporal de los animales. Para probar esta hipótesis realizamos una prueba estadística denominada coeficiente de correlación de Pearson, la cual es una medida de la relación lineal entre dos variables cuantitativas. En la Figura 12, no se observa una correlación entre las dos variables, obteniéndose un valor de correlación $r = -0.05$. Así descartamos que el aumento de peso, característico de la gestación, sea un factor para la aparición de resistencia a la insulina.

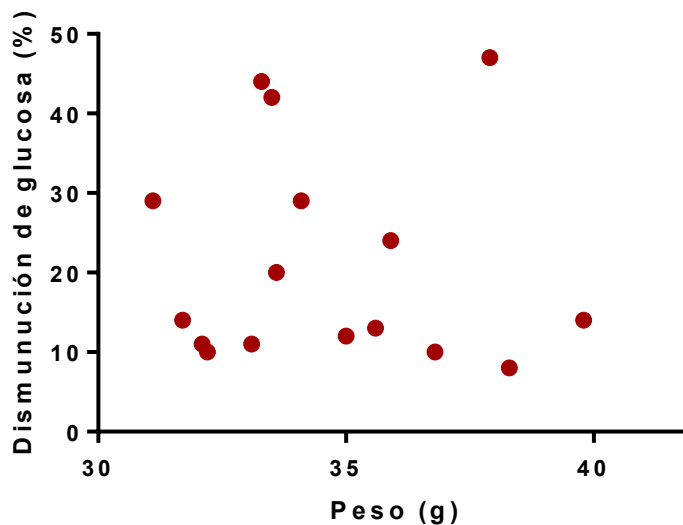


Figura 12. En la etapa final de la gestación no existe relación entre el peso corporal y la disminución de glucosa en sangre estimulada por insulina. Se realizó un diagrama de dispersión de 2 variables cuantitativas, peso corporal (gr) de cada individuo contra la disminución de glucosa (%), después de la administración de insulina (1 UI/Kg). Se evaluó ambas variables a través del Coeficiente de correlación de Pearson, $r = -0.05$, $p < 0.84$.

Distribución del tejido adiposo durante la etapa final de la gestación

Se determinó la cantidad de tejido adiposo presente en la región perigonadal (cercano al útero y ovarios), así como el tejido adiposo subcutáneo inguinal, con el objetivo de determinar si existe una diferencia en la acumulación de tejido adiposo en estas regiones. Como se observa en la Figura 13, no encontramos una diferencia en la acumulación del tejido adiposo en región perigonadal, al comparar ambos grupos, ya que los promedios de peso son muy similares. Sin embargo, encontramos diferencias significativas ($p < 0.001$) en el tejido subcutáneo de la región inguinal, (Figura 14A) con un promedio de 138 ± 13 mg en la gestación, contra un promedio de 47 ± 5 mg del grupo control. Además, en la Figura 14B podemos observar la acumulación del tejido adiposo subcutáneo al día 17 gestacional, con respecto al presente en no gestantes.

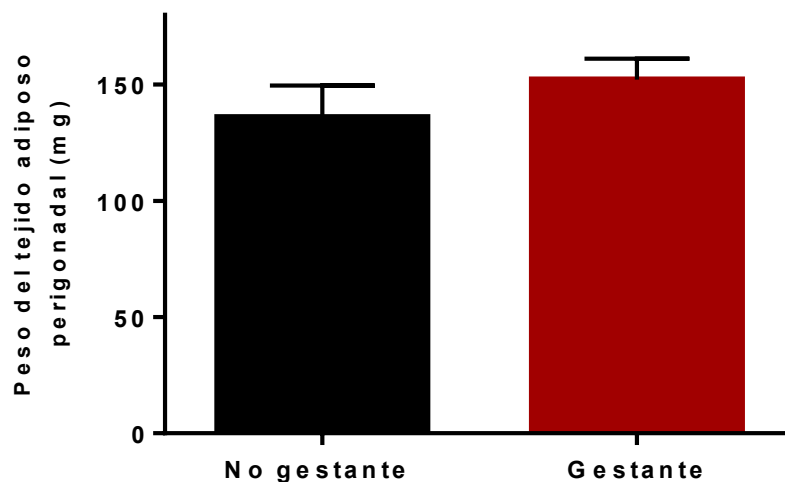


Figura 13. El día 17 gestacional no existe una acumulación de tejido adiposo perigonadal. Los datos en la gráfica representan el promedio en miligramos (mg), \pm EE. No gestante= 11, Gestante= 16, para cada grupo. Prueba t-student, $p < 0.98$.

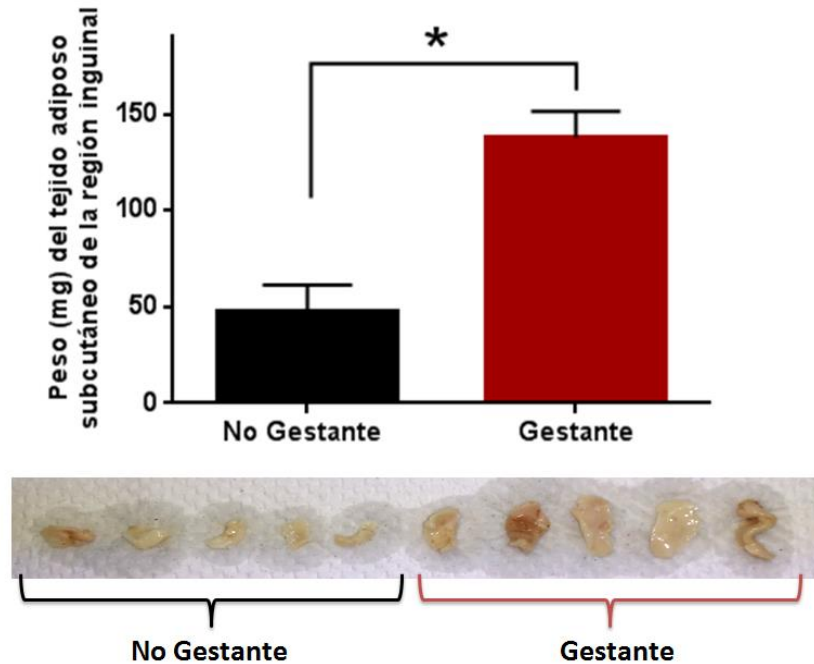


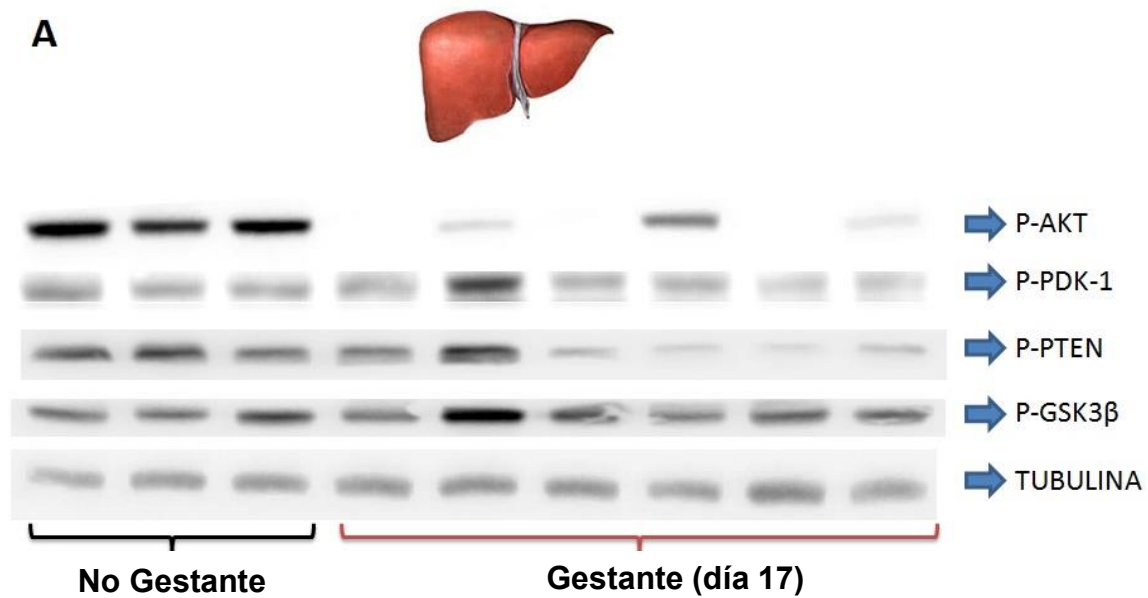
Figura 14. Acumulación de tejido adiposo subcutáneo en la región inguinal al final de la gestación. A. Los datos de la gráfica representan el promedio en miligramos (mg), \pm EE. No Gestante=7 y Gestante=9. Prueba t-student, $p < 0.001$. **B.** Imagen representativa de la acumulación de tejido adiposo subcutáneo en ambos grupos experimentales.

Niveles de proteínas totales y fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina; AKT, PDK1, GSK3 β y PTEN

Evaluamos los niveles de fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina al día 17 gestacional en tres importantes tejidos sensibles a esta hormona, en las siguientes proteínas: AKT (T308), PDK-1 (S241), GSK3 β (S9) y PTEN (S380) con respecto al grupo control a través de la técnica de Western blot. Además de los niveles de proteínas totales de AKT y PTEN en cada uno de los tejidos.

Hígado

En la Figura 15A, se muestra una imagen representativa de los niveles de fosforilación de proteínas después de un estímulo con insulina (1 UI/Kg), en los animales gestantes y no gestantes. Como podemos observar la fosforilación de las proteínas AKT (T308) y PTEN (S380) son menores al día 17 gestacional y estadísticamente significativos, con respecto al control (Figura 15B). No se encontraron diferencias entre los grupos en el nivel de fosforilación de la proteína PDK-1 (S241) (Figura 15). En tanto que la proteína GSK3 β en serina 9 se encuentra aumentada significativamente al día 17 gestacional (Figura 15B). El análisis densitométrico reveló que el grupo no gestante los niveles de fosforilación para GSK3 β fueron de 0.40 ± 0.02 UA y en el grupo gestante fue de 0.53 ± 0.04 UA. Es importante destacar que esta fosforilación en serina 9 es inhibitoria para la GSK3 β , por lo tanto, este aumento en la fosforilación sugiere que la actividad de la glucógeno sintasa (GS) pudiera estar elevada, promoviendo la formación de glucógeno en el hígado.



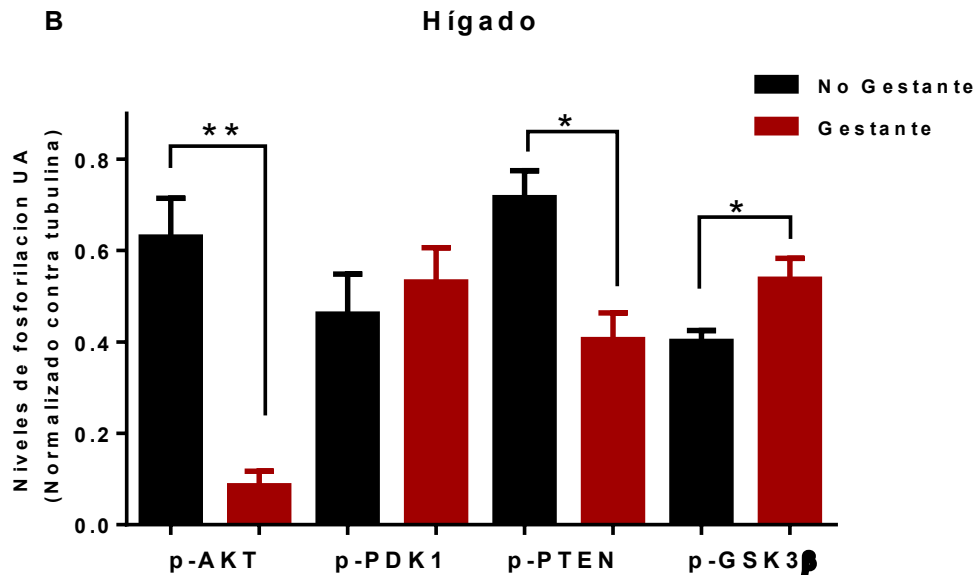


Figura 15. Alteraciones en la fosforilación de proteínas implicadas en la señalización de la insulina en el hígado de embarazadas. A. Western blot representativo de los niveles de fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina; AKT (T-308), PDK-1 (S-241), GSK-3β (S-9) y PTEN (S-380), después de la administración de insulina en muestras de hígado en gestación y no gestante. **B.** Análisis densitométrico para cada una de las proteínas analizadas, en extracto de hígado de ratón. Los niveles de fosforilación fueron normalizados con respecto a Tubulina. No gestante=12 y Gestante=15. Prueba estadística t-student, p-AKT $p < 0.001$, p-PDK1 $p < 0.557$, p-PTEN $p < 0.001$ y p-GSK3β $p < 0.040$.

Con estos resultados podemos determinar que el hígado es resistente a la acción de la insulina en el día 17 de gestación en la cepa C57BL/6J. Probablemente la participación de la proteína PTEN sea crucial para este fenómeno de resistencia a insulina en el hígado.

Igualmente determinamos los cambios en la expresión relativa de la proteína total de AKT y PTEN. En la Figura 16A, encontramos un incremento en la expresión de la proteína PTEN al día 17 gestacional, con respecto al grupo control no gestante. El análisis densitométrico y estadístico, en el grupo de no gestación muestra un valor de 42.16 ± 3.81 UA, en cambio, el valor para el grupo de gestación fue de 66.70 ± 6.17 UA. Además el análisis estadístico, a través de prueba t-student, reveló un valor de $p < 0.009$ (Figura 16C). Por otra parte, al realizar esta misma evaluación para la proteína AKT total, no encontramos cambios en la expresión relativa de esta proteína entre los 2 grupos (Figura 16B), el análisis densitométrico indicó que los valores son similares 50.59 ± 3.94 UA para el grupo gestante y de 50.40 ± 3.72 UA para el grupo control (Figura 16C).

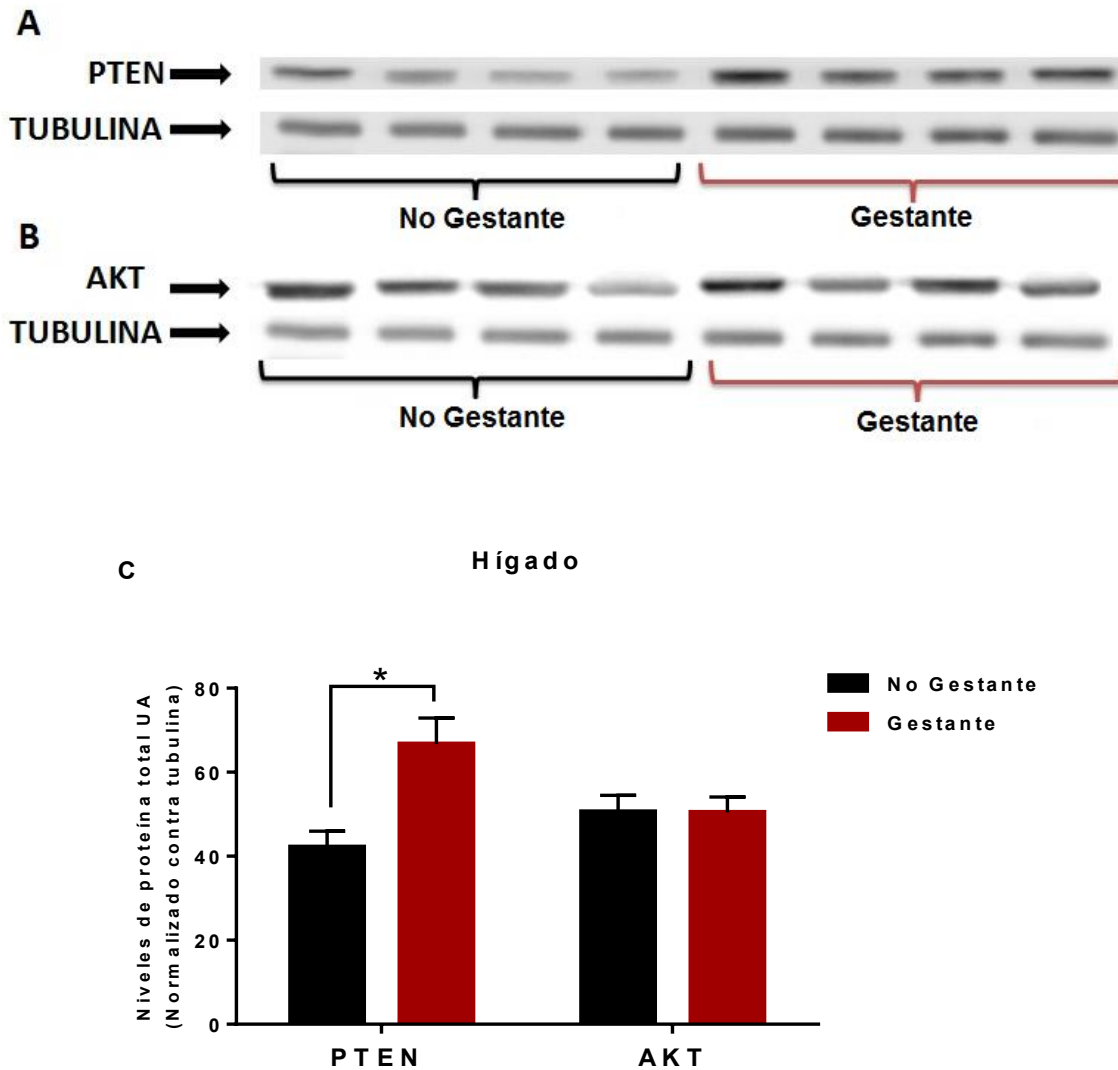


Figura 16. Expresión relativa de las proteínas PTEN y AKT en muestras de hígado al final gestación. **A.** Western blot representativo de la abundancia de la proteína PTEN, en muestras de hígado al día 17 gestacional y no gestante. **B.** Western blot representativo de los niveles de expresión de la proteína AKT, en muestras de hígado en ambos grupos experimentales. **C.** Análisis densitométrico de la proteína PTEN y AKT. No gestante=12 y Gestante=15. Se realizó la Prueba estadística t-student para PTEN $p < 0.009$ y AKT $p < 0.973$.

Una vez determinado el aumento significativo en los niveles de expresión de la proteína PTEN, en el hígado al día 17 del gestación, decidimos evaluar por la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-PCRq), si existe un aumento en el ARNm de Pten, en concordancia con el aumento observado en la proteína, se encontro que existe un incremento

significativo para el ARNm de Pten, el cual podemos observar en la Figura 17 (grupo control: 1.08 ± 0.17 UA; grupo gestante 3.91 ± 0.34 UA). Esto representó 4 veces lo determinado en el control.

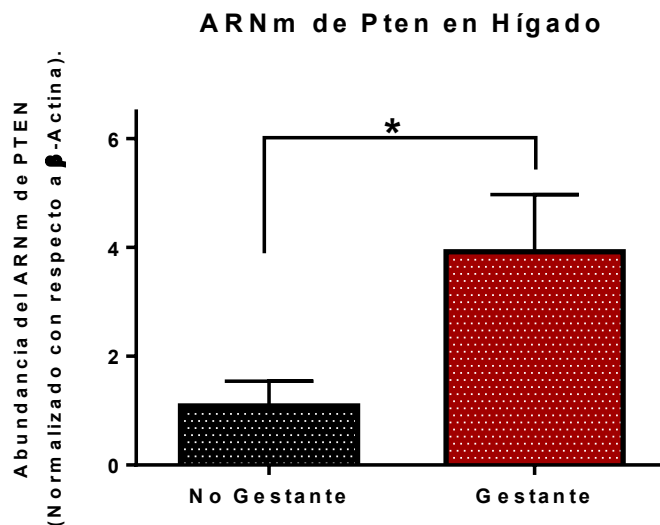


Figura 17. Aumento en la abundancia del ARNm de Pten en el hígado, al día 17 gestacional. Se determinó la abundancia del RNAm para Pten, por PCR en tiempo real, en muestras de hígado al día 17 gestacional (n=9) y no gestante (n=7). Los niveles de expresión se muestran en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm EE. Prueba estadística t-student, $p < 0.001$.

Músculo esquelético

Otro de los órganos más importantes y sensibles a la acción de la insulina es el músculo esquelético. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar las alteraciones en las proteínas de señalización de la insulina. Encontramos una disminución significativa de los niveles de fosforilación en las proteínas AKT y GSK3 β , con respecto al grupo no gestante (Figura 18A). Para el caso de AKT (T308), el análisis densitométrico revela un valor promedio de 0.54 ± 0.11 UA en los niveles de fosforilación de esta proteína en el grupo control, en cambio, el grupo gestante el promedio fue 0.15 ± 0.06 UA, lo cual representó tres veces menos (Figura 18B).

Para la fosforilación de la proteína GSK3 β (S9), encontramos un resultado diferente al observado en el hígado, ya que se observó un decremento de la fosforilación en serina 9, con un valor promedio para el grupo gestante de 0.70 ± 0.06 UA y el grupo no gestante el valor fue de 0.45 ± 0.03 UA. Esto nos lleva a pensar que la actividad de la glucógeno sintasa es inhibida por la GSK3 β permanentemente en el músculo en la etapa final de la

gestación, lo cual lleva a un bajo almacenamiento de glucógeno en el músculo esquelético y tener mayor cantidad de nutrientes en circulación para el feto. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas en la fosforilación de PDK-1 (S241) y PTEN (S380), entre ambos grupos (Figura 18B).

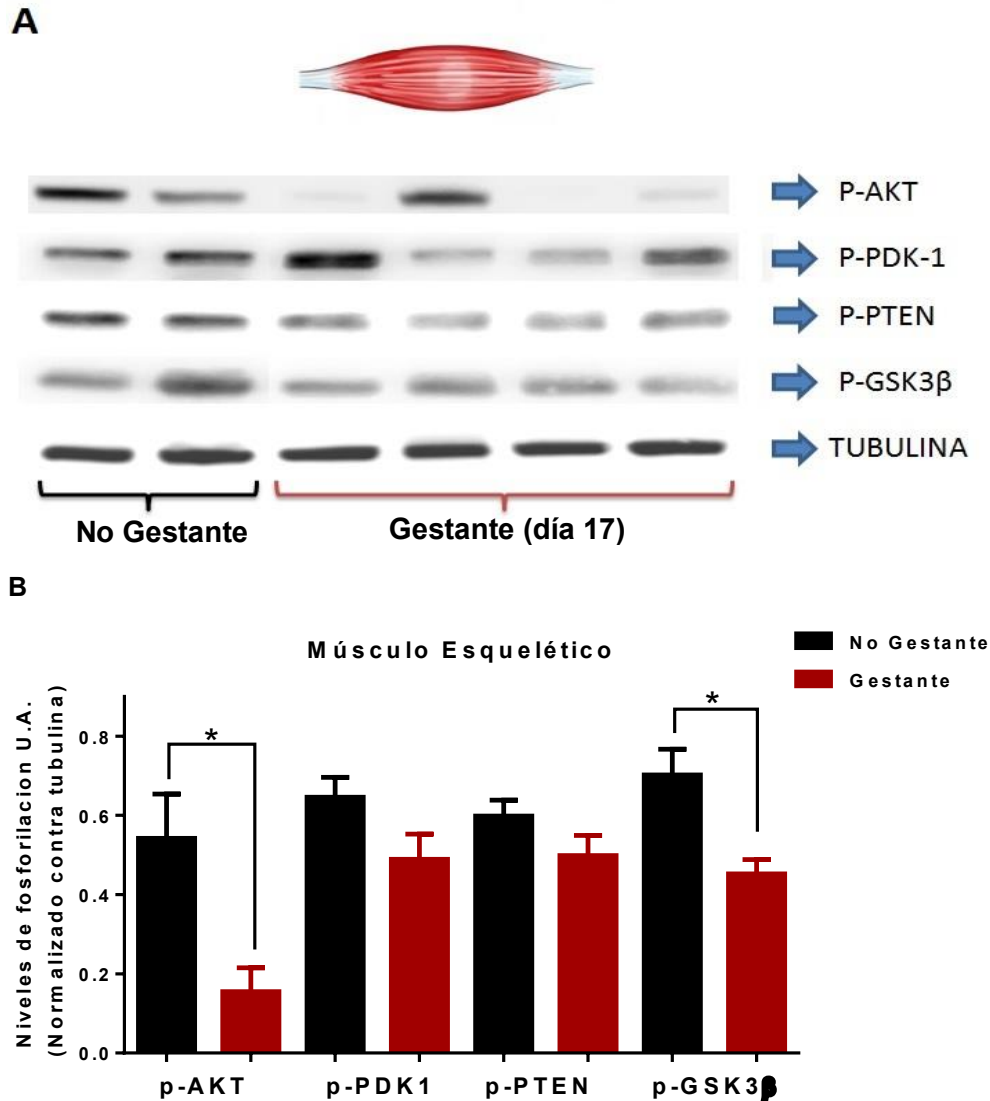


Figura 18. Alteraciones en la fosforilación de AKT y GSK3β en el músculo esquelético al final de la gestación. **A.** Western blot representativo de los niveles de fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina en muestras de músculo esquelético; AKT (T-308), PDK-1 (S-241), GSK-3β (S-9) y PTEN (S-380), después de 30 minutos previos a la administración de insulina en ambos grupos experimentales. **B.** Análisis densitométrico para cada una de las proteínas evaluadas, en músculo esquelético de ratón. Los niveles de fosforilación fueron normalizados con respecto a tubulina. No gestante=10 y Gestante=12. Prueba estadística t-student, p-AKT $p < 0.003$, p-PDK1 $p < 0.101$, p-PTEN $p < 0.179$ y p-GSK3β $p < 0.001$.

El análisis de los niveles de expresión de las proteínas AKT total reveló un incremento en la abundancia de esta proteína al día 17 gestacional. Para el grupo no gestante; 58.91 ± 4.18 UA y gestante 73.69 ± 3.90 UA (Figura 19C). En la evaluación de la abundancia de la proteína total para PTEN (Figura 19B), no se encontraron cambios significativos de esta proteína entre los 2 grupos experimentales ($p < 0.553$), Figura 19C.

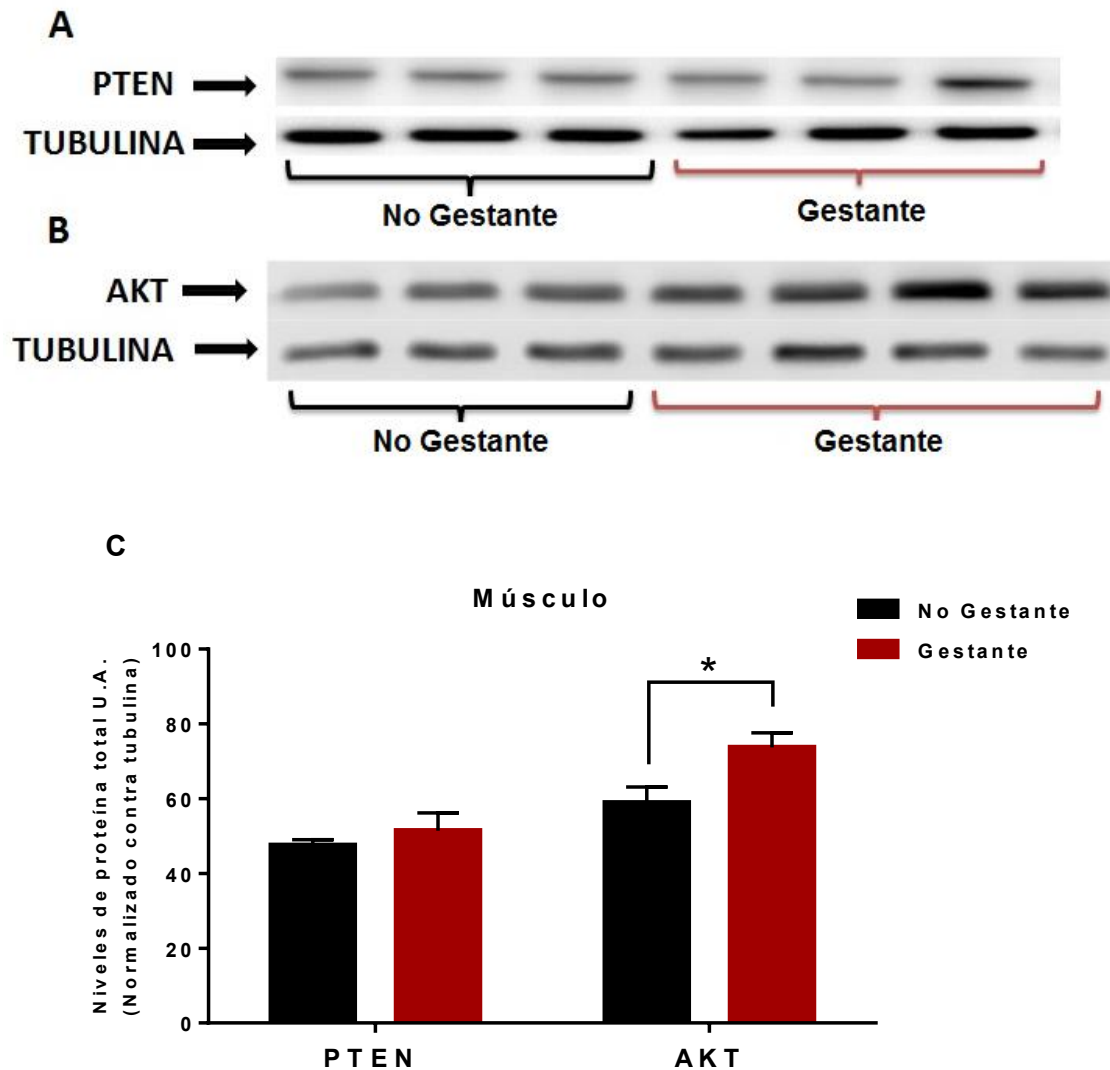


Figura 19. Expresión relativa de las proteínas PTEN y AKT en músculo esquelético al final de la gestación. **A.** Western blot representativo de la abundancia de la proteína PTEN en músculo, al día 17 gestacional y no gestante. **B.** Western blot representativo de los niveles de expresión de la proteína AKT, en muestras de músculo esquelético en ambos grupos experimentales. **C.** Análisis densitométrico de la proteína evaluadas. No gestante=10 y Gestante=15. Se realizó la Prueba estadística t-student, PTEN $p < 0.553$ y AKT $p < 0.019$.

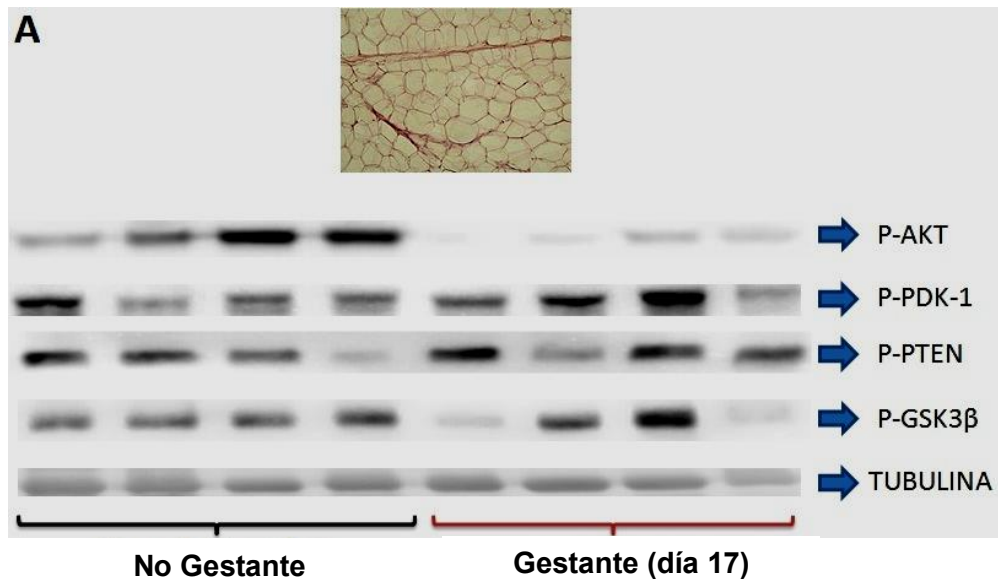
Tejido adiposo

Por último, medimos los niveles de fosforilación en las proteínas previamente evaluadas en hígado y músculo, con el objetivo de comparar lo que sucedía en el tejido adiposo. En la Figura 20A, se muestran los Western blot representativos para cada una de las proteínas fosforiladas de la vía de señalización de la insulina, las cuales fueron evaluadas en el tejido adiposo.

El resultado después de hacer el análisis densitométrico y estadístico, muestra que la única proteína que disminuye significativamente en su fosforilación es AKT en treonina 308 al día 17 gestacional, con respecto al grupo no gestante (Figura 20B). Los datos obtenidos de los niveles de fosforilación relativa fueron de 0.61 ± 0.07 UA para el grupo no gestante y de 0.33 ± 0.11 UA en el gestante, lo que represento la mitad con respecto al control.

Esto nos refleja que la principal proteína efectora de la vía de señalización de la insulina también se encuentra afectada en este tejido. Además, es de resaltar que la fosforilación de AKT en treonina 308, es la única que se ve afectada en los 3 tejidos evaluados en este proyecto.

Por otra parte, las demás proteínas evaluadas; GSK-3 β (S9), PDK1 (S241) y PTEN (S380), no mostraron cambios significativos en la fosforilación de las proteínas (Figura 20B). Es importante señalar que la proteína GSK3 β , muestra una tendencia a estar disminuida en algunos animales gestantes, a pesar de la proteína AKT (T308) se encuentra disminuida de manera en la mayoría (Figura 20A).



B

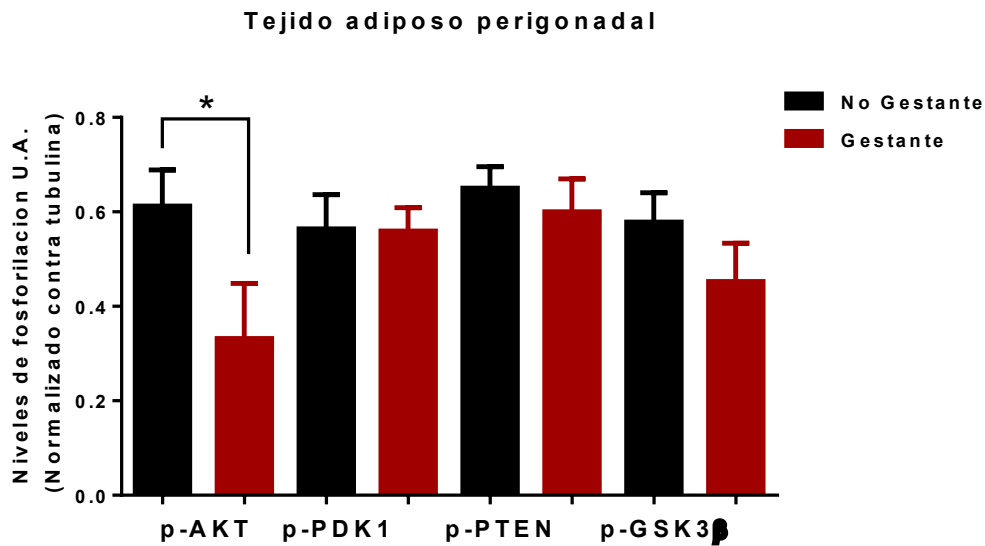


Figura 20. Disminución de la fosforilación de AKT en treonina 308 en el tejido adiposo, al día 17 gestacional. **A.** Western blot representativo de los niveles de fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina, AKT (T308), PDK-1 (S241), GSK3β (S9) y PTEN (S380), previo a una estimulación de insulina. En muestras de tejido adiposo perigonadal al día 17 gestacional y no gestante. **B.** Análisis densitométrico para cada una de las proteínas analizadas, en tejido adiposo perigonadal de ratón. No Gestante=10 y Gestante=15. Prueba estadística U de Mann Whitney, p-AKT $p < 0.025$ y p-PTEN $p < 0.108$. Prueba estadística t-student, p-PDK-1 $p < 0.956$ y p-GSK3β $p < 0.289$.

En el tejido adiposo perigonadal también determinamos los cambios en los niveles de abundancia de las proteínas AKT y PTEN, como previamente evaluamos en músculo e hígado. Realizamos el Western blot correspondiente para cada una de las proteínas, como se observa en la Figura 21 A y B, un incremento significativo en la expresión tanto de la proteína total de AKT, como de la proteína total para PTEN (Figura 21C) al día 17 gestacional, con respecto al grupo no gestante.

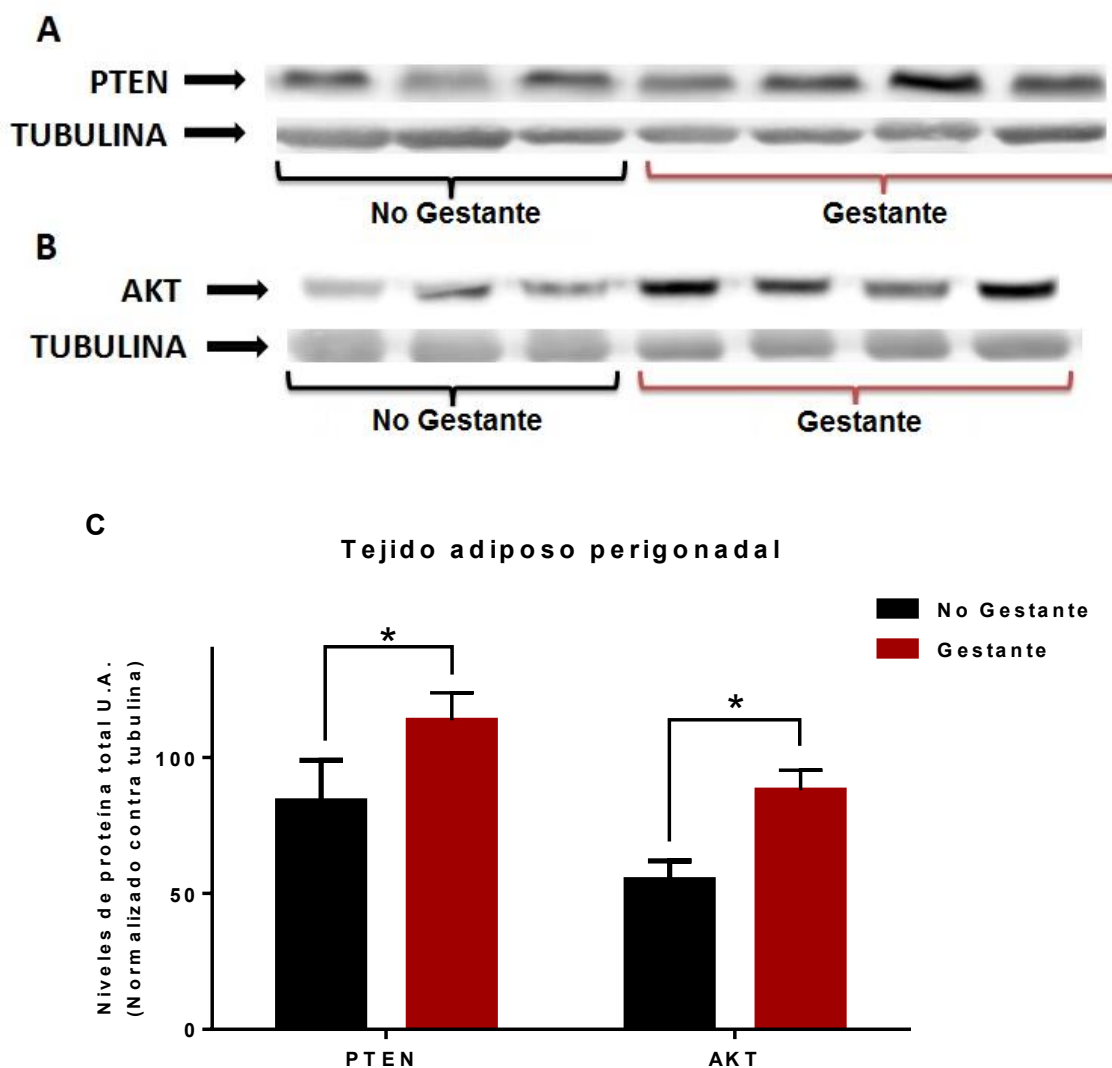


Figura 21. Determinación de los niveles de expresión de las proteínas PTEN y AKT, en muestras de tejido adiposo perigonadal en la gestación. A. Western blot representativo de la abundancia de la proteína PTEN, al día 17 gestacional y no gestante. **B.** Imagen representativa de los niveles de expresión de la proteína AKT, en ambos grupos experimentales. **C.** Análisis densitométrico de ambas proteínas. No gestante=10 y Gestante=12. Prueba estadística U de Mann Whitney, PTEN $p < 0.046$. Prueba estadística t-student, AKT $p < 0.004$.

Analizamos por la técnica de RT-PCR en tiempo real, la abundancia del ARNm de Pten al final del gestación en muestras de tejido adiposo perigonadal. Se encontró un promedio de 1.04 ± 0.11 UA en el grupo control y un promedio de 1.51 ± 0.13 UA, en el grupo gestante. El análisis estadístico reveló que este aumento fue significativo ($p < 0.040$) (Figura 22). El cambio que existe a nivel de mensajero y de proteína, para PTEN, sugiere que en el gestación se aumenta la expresión de PTEN, como un probable mecanismo para interferir con la vía de señalización de la insulina.

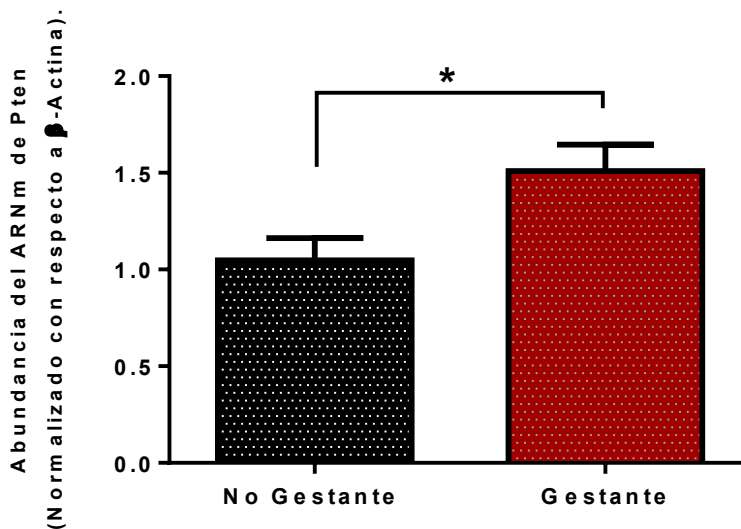


Figura 22. En la etapa final del gestación se presenta un incremento en la abundancia del ARNm de Pten en el tejido adiposo. Se determinó la abundancia del ARNm de Pten, a través de PCR en tiempo real, en muestras de tejido adiposo perigonadal al día 17 gestacional y no gestante. Los niveles de abundancia se presentan en unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm EE. Prueba estadística U de Mann Whitney $p < 0.040$.

Carbamoil fosfato sintasa (CPS-1); una proteína del metabolismo nitrogenado alterada en gestación

Al momento de realizar Western blot para identificar la fosforilación de PTEN en Serina 380, en muestras de hígado de ratón de ambos grupos experimentales, encontramos que el anticuerpo utilizado se unía a 2 proteínas de distinto peso molecular, las cuales observamos por quimioluminiscencia; la primera correspondía a nuestra proteína de interés PTEN con un peso molecular de 54 kDa, en cambio, la segunda proteína tenía un peso mayor a 150 kDa. La importancia de esta última, es porque mostraba un patrón de expresión bajo en el grupo gestante, con respecto al no gestante. Este hallazgo se repitió en los diferentes lotes analizados al revelar con el anticuerpo mencionado. Por lo tanto, decidimos determinar la identidad de esta proteína detectada por Western Blot. Para lo cual realizamos una inmunoprecipitación de proteína en extracto de hígado utilizando el anticuerpo para PTEN (S380) (Figura 23). El objetivo de la inmunoprecipitación fue aislar y concentrar esta proteína de interés, entre las miles de proteínas presentes en el hígado. Una vez que se realizó la inmunoprecipitación de esta proteína, se procedió a su identificación, la cual fue realizada por la unidad de Proteómica del IBT/UNAM.

De acuerdo con los resultados proporcionados por la unidad de Proteómica, la proteína fue identificada a través de la técnica de MS-CL (espectrofotometría de masas-cromatografía líquida) y con ayuda de la base de datos "FASTA".

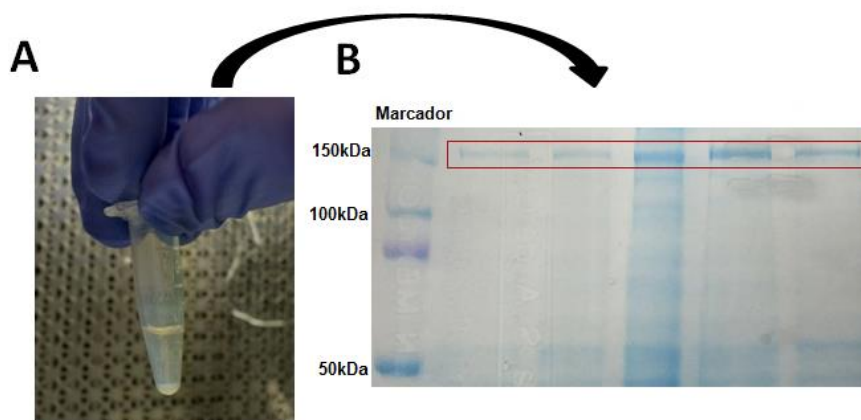


Figura 23. Inmunoprecipitación de la proteína de interés, la cual mostraba una disminución en su expresión en el gestación. A. Imagen representativa de la inmunoprecipitación de la proteína, empleando el anticuerpo primario fosfo-anti-PTEN (S380) **B.** Separación electroforética y tinción con azul de Coomassie 250. Se observan las bandas de interés que se mandaron para la identificación de la proteína (rectángulo en rojo).

El resultado proporcionado por la unidad de Proteómica, reveló que la proteína correspondía a la proteína Carbamoil-Fosfato sintasa [amonio], de localización mitocondrial. También denominada como Carbamoil-fosfato sintasa-1 (CPS-1).

En el reporte, se describe que la calificación de la proteína fue de 609.19, lo que representa la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales plenamente identificados. Además se muestra que la identificación de la proteína de manera porcentual fue del 71.67% y el peso molecular de esta proteína es de 164.5 kDa (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados proporcionados por la Unidad de Proteómica del IBT, sobre las características determinadas en la identificación de de la CPS-1.

Acceso	Descripción	Calificación	Cobertura	# Péptidos	Peso Molecular [kDa]
Q8C196	Carbamoyl-phosphate synthase [amonio], mitochondrial OS=Mus musculus GN=Cps1 PE=1 SV=2 – [CPSM_MOUSE]	609.19	71.67	82	164.5

Además en el reporte se muestran la secuencia de aminoácidos completa de la proteína. En la cual fueron marcados con color verde, los aminoácidos que fueron determinados con una alta identidad, así como en color rojo los residuos de aminoácidos con baja identidad (Figura 24).

MTRILTACKV **V**TKLRSQGF **A**NVTKRQWD FSRPGIRLLS VKAK**T**AHIVL **E**DGTR**M**RGYS **F**GHFSSVAGE **V**VFNTGLGGY **P**EALTDPAYK **G**QILTMANPI **I**GNGGAPDTT
ARDELGLNKY **M**ESDGIK**V**AG **L**LVLNYSNDY **N**HWLATSLSG **Q**WLQEEK**V**PA **I**YGVDT**M**L**T** KIIRDKG**T**ML **G**K**E**FE**G**QSV **D**FVDPNK**Q**NL **I**AEV**S**T**K**DVK **V**FG**K**EN**P**TK**V**
VAVDCG**I**KNN **V**IR**L**LV**K**RGA **E**VHLP**V**PNHD **F**TQ**M**EYDGLL **I**AGGPG**N**PAL **A**Q**L**IQ**N**V**K**R **I**LES**D**RKEPL **F**GISTG**N**IIT **G**LAAGAN**S**YK **M**SMAN**R**GQ**N**Q **P**VLN**I**T**R**Q**A**
FITA**Q**NHG**Y**A **L**DNT**L**PAG**K** **P**LFV**N**VND**Q**T **N**EGIM**H**ES**K**P **F**FV**Q**F**H**EV **S**P**G**PT**D**E**Y**L **F**DS**F**FS**L**IK**K** **G**K**S**T**I**T**S**V**L** **P**K**P**AL**V**AS**V** **E**V**S**K**V**IL**L**G**S** **G**G**L**S**I**G**Q**AG**E**
FD**S**G**S**Q**A**V**R** **A**M**K**E**E**N**V**K**T**V **L**M**N**P**N**I**A**S**V**Q **T**N**E**V**L**G**K**Q**A**D **A**V**F**L**E**I**T**P**Q** **F**V**T**E**V**I**K**A**E**R **P**D**G**L**I**L**G**M**G**G **Q**T**A**L**N**C**G**V**E**L **F**R**G**V**L**K**E****Y**G **V**K**V**L**G**T**S**V**E**S **I**M**A**T**E**D**R**Q**L**E
SD**K**L**N**E**I**N**E**K **I**A**P**S**F**A**V**E**S**M **E**D**A**L**E**A**A**D**T**I **G**Y**P**V**M**I**R****S**A**Y** **A**L**G**L**G**S**G**S**G**I**C** **P**N**K**E**T**L**I**D**L**G **T**K**A**F**A**M**T**N**Q**I **L**V**E**R**S**V**T**G**W**K **E**I**E**Y**E**V**V**R**D**A **D**D**N**C**V**T**V**C**N**M **E**N**V**D**A**M**G**V**H**T
GS**V**V**V**A**P**A**Q** **T**L**S**N**A**E**F**Q**M**L **R**R**T**S**V**N**V**R**H** **L**G**I**V**G**E**C**N**I**Q **F**A**L**H**P**T**S**M**E**Y **C**I**E**V**N**A**R**L**S** **R**S**S**A**L**A**S**K**A**T **G**Y**L**A**F**I**A**A**K** **I**A**L**G**I**P**L**P**E**I **K**N**V**S**G**K**T**S**A** **C**F**E**P**S**L**D**Y**M**
TR**I**P**R**W**D**L**D**R **F**H**G**T**S**S**R****I**G**S** **S**M**S**V**G**E**V**M**A** **I**G**R**T**F**E**E**S**F**Q **K**A**L**R**M**C**H**P**S**V **D**G**F**T**R**L**P**M**N** **K**E**P**A**N**L**D**L**K** **R**E**L**S**E**P**S**S**T**R **I**Y**A**I**A**K**A**L**E**N **N**M**S**L**D**E**I**V**R** **L** **T**S**I**D**K**W**E**L**Y**K
MR**D**I**L**N**M**D**K**T **L**K**G**L**N**S**D**S**V**T **E**E**T**L**R**K**A**E**I** **G**F**S**D**K**Q**I**S**K**C **L**G**L**T**E**A**Q**T**R**E **L**R**L**K**K****N**I**H**E**W** **V**R**Q**I**D**T**L**A**E** **Y**P**S**V**T**N**Y**L**V** **T**Y**N**G**Q**E**H**D**I**K **F**D**E**H**G**I**M**V**L**G **C**G**P**Y**H**I**G**S**S**V
EF**D**W**A**C**V**S**S**I **R**T**L**R**Q**L**G**K**K**T **V**V**V**N**C**N**P**E**T**V **S**T**D**F**E**C**D**C**L**K **Y**F**E**L**S**L**E**R**I** **L**D**I**Y**H**Q**E**A**C**N **G**C**I**I**S**V**G**Q**I** **P**N**N**L**A**V**L**P**L**Y**K** **N**G**V**K**I**M**G**T**S**P **L**Q**I**D**R**A**E**D**R**S **I**F**S**A**V**L**D**E**L**K
VA**Q**A**P**W**K****A**V**N** **T**L**N**E**A**L**E**F**A**N **S**V**G**Y**P**C**L**L**R**P **S**V**L**S**G**S**A**M**N** **V**F**S**E**D**E**M**K**R** **F**L**E**E**A**T**R****V**S**Q** **E**R**F**V**L**T**R****E**V **E**G**A**R**E**V**E**M**D**A **V**G**K**E**G**R**V**I**S**H **A**I**S**E**H**V**E**D**A**G **V**H**S**G**D**A**T**I**M**I
FT**Q**T**I**S**Q**G**A**I **E**R**V**K**D**A**T****K**I **A**K**A**F**A**I**S**G**P**F **N**V**Q**F**L**V**R****G**N**D** **V**L**V**I**E**C**N**L**R**A **S**R**S**F**F**V**S**K**T** **L**G**V**D**F**I**D**V**A**T **K**V**M**I**G**E**S**I**D**E **R**L**P**T**L**E**Q**P**I** **I**P**S**D**Y**V**A**I**K**A **P**M**F**S**W**P**R**L**R**D
AD**P**I**R**C**E**M**A** **S**T**E**V**A**C**F**G**E** **G**I**H**T**A**F**L**K**A**M **L**S**T**G**F**K**I**P**Q**K **S**I**L**I**G**I**Q**Q**S**F **R**R**R**F**L**G**V**A**E**Q **L**H**N**E**G**F**R**L**E**A **T**E**A**T**S**D**W**L**N**A **N**N**V**P**A**T**P**V**A**W **P**S**Q**E**G**Q**N**P**S**L **S**S**I**R**K**L**I**R**D**
SI**D**I**V**I**N**L**P**N **N**N**T**K**F**V**H**D**N**Y **V**I**R**R**T**A**V**D**S**G **I**A**L**L**T**N**F**Q**V**T **K**L**F**A**E**A**V**Q**K**S **R**T**V**D**S**K**S**L**F**H **Y**R**Q**Y**S**A**G**K**A**A

Figura 24. Secuencia completa de aminoácidos de la CPS-1. Los aminoácidos en verde, fueron los que se determinaron con una alta identidad y en color rojo mostraron baja identidad durante la identificación de la proteína (datos proporcionados por UP-IBT/UNAM).

La CPS-1, es una enzima mitocondrial de 1500 aminoácidos, que se encarga de producir carbamoil fosfato a partir de dióxido de carbono (CO₂) y amonio (NH₄). La cual se le conoce como la primera reacción del ciclo de la urea y es importante para el metabolismo nitrogenado.

Posteriormente, decidimos validar este resultado a través de dos técnicas; RT-PCR en tiempo real, con el objetivo de medir la abundancia del ARNm de la Cps-1, y por la técnica de Western blot, para analizar la expresión de esta proteína, en ambos grupos experimentales. En la Figura 25, demostramos por RT-PCRq, una disminución significativa en la abundancia del ARNm para la carbamoil-fosfato sintasa-1 (Cps-1), en el grupo gestante con respecto al grupo control.

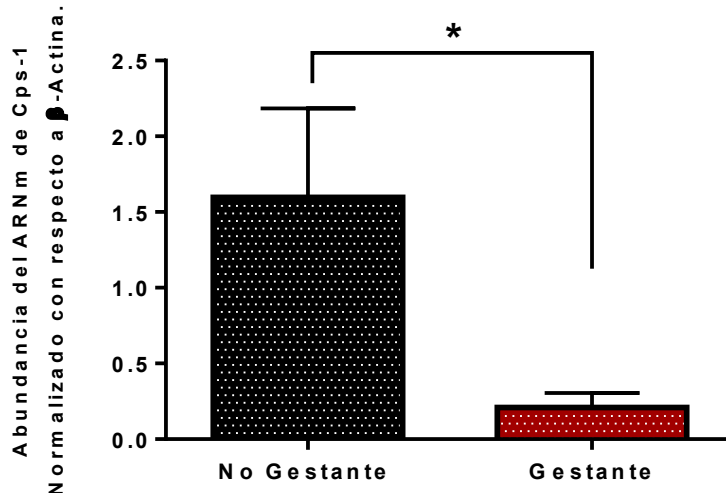


Figura 25. Disminución en la abundancia del ARNm del gen de Cps-1 al día 17 gestacional. La abundancia relativa del mensajero de Cps-1 fue normalizada con el ARNm de β -actina (control endógeno). No Gestante=7 y Gestante=9. Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.001$.

Por último, determinamos la expresión relativa de la CPS-1, en muestras de hígado de ratón en ambos grupos experimentales. Al realizar la inmunodetección y el análisis estadístico, hallamos una disminución significativa al día 17 gestacional de la CPS-1, con respecto al no gestante (Figura 26).

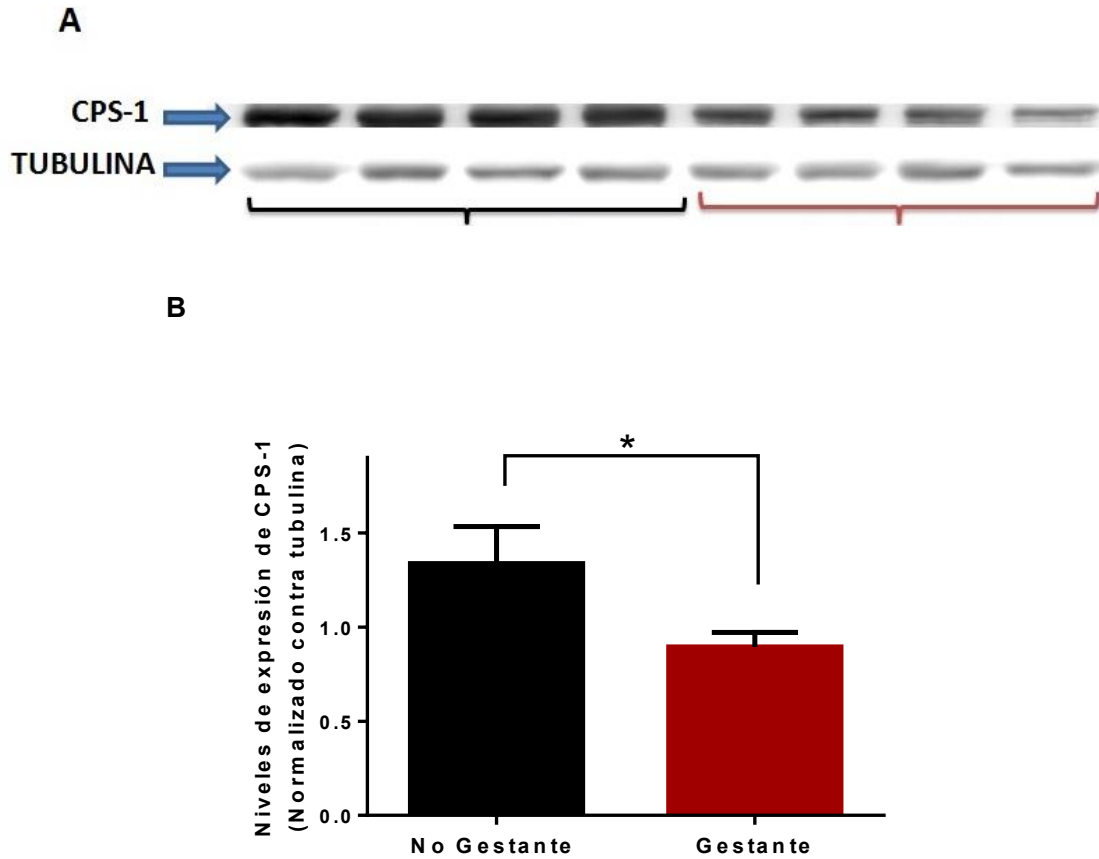


Figura 26. Expresión relativa de la proteína CPS-1 en muestras de hígado. **A.** Western blot representativo de la abundancia de la proteína CPS-1, en ambos grupos experimentales. **B.** Grafica representativa de los niveles de expresión relativa de CPS-1. No Gestante= 4 y Gestante= 5. Prueba t-student $p < 0.042$.

DISCUSIÓN

En este proyecto determinamos que existe una disminución en la sensibilidad a la insulina al día 17 gestacional en la cepa de ratones C57BJL6, con respecto a hembras de la misma cepa no gestantes. Los resultados mostraron que la aplicación de 1UI/Kg de insulina produjo una ligera disminución (20%) en el grupo de embarazadas en comparación con el grupo de ratones no gestantes (50%), después de 30 minutos. Estudios recientes también han encontrado en ratones gestantes disminución en la sensibilidad a la insulina a través de curvas de tolerancia a la insulina (0.75 UI/Kg) (Bowe et al., 2014) y por clamp hiperinsulinémico-euglucémico (Musial et al., 2016). Estos últimos lo evaluaron al día 16 de gestación en tanto que nuestros estudios se realizaron al día 17. En el estudio de Musial y colaboradores también demostró que hay un incremento en características de la resistencia a la insulina como hiperinsulinemia en estado postprandial, altos niveles de leptina, además de un incremento en el IGF-1, y que el uso de glucosa en el músculo disminuye (Musial et al., 2016).

Nuestros resultados muestran que los niveles de glucosa en sangre tras un ayuno de 8 horas no se ven modificados al día 17 gestacional con respecto al grupo no gestante. Lo que demuestra que el ratón gestante mantiene los niveles de glucosa en ayuno a pesar de las demandas metabólicas de la gestación. Este mismo resultado fue observado en ratones al día 16 gestacional, pero con solo 6 horas de ayuno (Musial et al., 2016).

La evaluación de los niveles de proteína total y fosforilaciones en las proteínas de la vía de señalización de la insulina como: PTEN, PDK-1, AKT y GSK3 β , después de una estimulación con insulina, reveló que los tres tejidos disminuyen la expresión de AKT fosforilada, proteína transductora maestra en los cambios que produce la insulina en las diferentes vías metabólicas reguladas por esta hormona. Este efecto apoya el papel central de AKT en la vía de señalización. En contraste, se observaron diferencias entre los tejidos en la expresión de la proteína total de AKT, no observándose cambios en la proteína total en el hígado, en tanto que hubo un aumento en el músculo y el tejido adiposo perigonadal. Resulta interesante señalar que, si bien la disminución de la fosforilación de AKT se dio en los tres tejidos, en el tejido adiposo se observó mayor variación entre los individuos, este efecto puede estar dado por la heterogeneidad del tejido adiposo y su estrecha relación con otros tejidos celulares en la región perigonadal; como el epidídimo, el tejido vascular y linfoide.

A diferencia de la similitud que existe con respecto a la fosforilación de AKT, la expresión de proteínas río arriba de AKT difirió entre los tejidos, lo que indica que el mecanismo molecular mediante el cual se produce resistencia a la insulina en el gestación se realiza a través de diferentes proteínas de la vía de señalización y que es específica de cada tejido. En el hígado hubo un notorio efecto tanto en los niveles de fosforilación de PTEN (S380) en donde se encontró una disminución del 43%, así como un aumento del 58% en la expresión de la proteína total y de casi 300% en la abundancia del ARNm de *Pten*. En divergencia con estos resultados, la fosforilación de PTEN y la proteína total no se vio modificada en el músculo, en tanto que en el tejido adiposo no se observó en la proteína fosforilada, pero sí en la proteína total y en el ARNm, que se incrementaron 35% y 50%, respectivamente. PTEN es una proteína de acción inhibitoria en la vía de señalización de la insulina, cuando esta proteína se encuentra fosforilada en serina 380 se produce una disminución en su actividad (Cho et al., 2004; Vinciguerra and Foti, 2006). El aumento observado en la proteína total y en el mensajero de PTEN en el hígado y en el tejido adiposo sugiere fuertemente que el apagamiento de la vía PI3K-AKT en la gestación se encuentra ligado a un aumento en esta proteína. Sin embargo, la intensidad del porcentaje de cambio sugiere que en el hígado este mecanismo es más pronunciado que en el tejido adiposo.

Además, el hecho de que en el hígado la forma activa se encuentre fuertemente aumentada sustenta el papel de esta proteína en la resistencia a la insulina hepática. Resulta interesante señalar que en ratas ovariectomizadas y tratadas con progesterona los niveles de fosforilación de la proteína PTEN se encuentran disminuidos en serina 380, en el hipotálamo y el hipocampo, con respecto al control (Amorim et al., 2010). Dado que al final de la gestación se caracteriza por altos niveles de progesterona, es posible que esta acción hormonal sobre PTEN participe en la resistencia a la insulina en el tejido adiposo y en hígado. Este es el primer estudio donde se determinaron cambios importantes en la proteína PTEN en el hígado y el tejido adiposo al final de la gestación, acompañado de una disminución en la fosforilación de AKT en treonina 308 en el hígado. Otra diferencia importante entre los tres tejidos la encontramos en la proteína río debajo de AKT, la GSK3 β . Esta proteína en su forma desfosforilada tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de glucógeno, en tanto que la enzima fosforilada en serina 9 representa la forma inactiva. En el hígado encontramos un incremento significativo en la fosforilación de la proteína GSK3 β (S9), en tanto que en el músculo se observó una disminución. Este

resultado indica que esta proteína inhibe la activación de la glucógeno sintasa en el músculo, y por ende, disminuye el almacenamiento de glucógeno en este tejido. En tanto que, dado que el hígado tiene un papel crítico en el mantenimiento de la glucemia en ayuno, no se afecta esta función, permitiendo de esta manera la síntesis de glucógeno para su posterior liberación de glucosa para cubrir las necesidades del feto en caso de un estado energético bajo, y evitar episodios hipoglucémicos en la madre. Estos resultados apoyan estudios por Davidson y colaboradores (1984), que encuentran que la incorporación de glucosa al glucógeno hepático se mantiene durante la gestación. Dado que en el tejido adiposo el metabolismo del glucógeno es de poca importancia fisiológica, resulta igualmente congruente, que no se encontrasen cambios en GSK3 β . Estos resultados son un excelente ejemplo de la regulación molecular en la homeostasis de la glucosa en la gestación.

Por otra parte, nuestros resultados no se muestran diferencias en la fosforilación de la proteína PDK-1 en serina 241 en ninguno de los tejidos estudiados, estos datos indican que esta proteína no está jugando un papel en la resistencia a la insulina en la gestación.

Una pregunta que queda por contestar es por cuál mecanismo se produce la disminución de AKT-fosforilada en el músculo. Un estudio en ratas encontró que la autofosforilación del receptor en respuesta a la insulina disminuyó 30% en el músculo en el día 20 de gestación (Saad et al., 1997). En la gestación en ratas, se determinó que existe una disminución significativa en la fosforilación del IRS-1 en residuos de tirosina en el músculo (Gonzalez et al., 2003). En pacientes con diabetes gestacional el receptor a insulina muestra una reducción en la fosforilación en residuos de tirosina en el músculo esquelético (Chu et al., 2014; Shao et al., 2000). Sin embargo, estudios piloto en el laboratorio no han encontrado cambios en la fosforilación del IRS-1 en tirosina 632 promovida por la insulina.

La fosforilación del IRS-1 en residuos de serina han sido implicados como un mecanismo que atenúa o altera la vía de señalización de la insulina, (Moeschel et al., 2004; Qiao et al., 2002; Stuart et al., 2014). En el periodo gestacional se identificaron fosforilaciones del IRS-1 en residuos de serina o bajos niveles del IRS-1, en pacientes obesas durante la gestación, así como en pacientes con diabetes gestacional en músculo esquelético (Barbour et al., 2007; Friedman et al., 1999). Por lo tanto, sería interesante determinar los niveles de fosforilación del IRS-1, en residuos de serina, utilizando un anticuerpo anti-serina contra el IRS-1. Es difícil establecer qué residuo de serina pudiese estar modificado

en la gestación ya que existen más de 30 sitios de fosforilación de serina en el IRS-1 en ratón (Copps and White, 2012), además de que las cinasas responsables de estas fosforilaciones son diferentes. Sin embargo, en el tejido adiposo se encontró al final de la gestación una disminución en la fosforilación del IRS-1, en residuos de tirosina, acompañado de un incremento específico de la fosforilación de serina 307 (Sevillano et al., 2007). Esto nos lleva a proponer como perspectiva de nuestro trabajo, medir específicamente esta fosforilación.




Por otra parte, se conoce que la acumulación de tejido adiposo es normal en la gestación, pero nosotros demostramos que difiere dependiendo de la región. Nuestros resultados muestran que en la región perigonadal no existe una acumulación de tejido adiposo, en cambio, se presenta un incremento significativo de la acumulación de tejido adiposo subcutáneo en la región inguinal, sugiriendo que esta zona podría cumplir una función fisiológica importante. Otros estudios han determinado que la acumulación de grasa subcutánea está asociada con la aparición de resistencia a la insulina, debido a que este tipo de tejido produce mayor secreción de adipocinas (Tritos and Mantzoros, 1997). Además, se demostró una correlación entre el grosor del tejido adiposo subcutáneo de la región abdominal con un aumento de marcadores de inflamación, lo cual promueve la aparición de complicaciones metabólicas durante el gestación (Kosus et al., 2014) y nos lleva a plantearnos si la sensibilidad a la insulina es igual en estas dos regiones del tejido adiposo durante el gestación.

Por último, demostramos que la proteína Carbamil-fostato sintasa-1 (CPS-1) presenta bajos niveles de expresión al final de la gestación. Lo cual refleja que el metabolismo nitrogenado también sufre modificaciones importantes en la gestación. Se conoce que el balance nitrogenado es positivo, lo que indica que el organismo retiene nitrógeno, disminuyen la pérdida de moléculas nitrogenadas con la finalidad de apartarlas como nutrientes al feto (Metzger, 1997). Estas reservas de nitrógeno son utilizadas para el desarrollo del embrión, el incremento de los eritrocitos, el tamaño del útero, las glándulas mamarias, etc., (Duggleby and Jackson, 2002). Esto ha sido demostrado en humanos, donde se sabe que existen cambios en la transaminación de aminoácidos y el ciclo de la urea en el periodo gestacional (Kalhan et al., 1998). Por lo tanto, la maquinaria que se utiliza para la degradación de residuos nitrogenados debe estar regulada para mantener aumentada la cantidad de aminoácidos y elementos nitrogenados para ser absorbidos por la placenta. Este es el primer trabajo donde se demuestra que la CPS-1, enzima

importante para iniciar el ciclo de la urea, tienen disminución en la su expresión en el hígado al final del gestación.

En resumen:

Tabla 6. Cambios en las proteínas de señalización de la insulina por tejido, al día 17 gestacional comparado contra no gestante.

Tejido	AKT total	PTEN total	AKT-P	PDK1-P	PTEN-P	GSK3 β -P
	=	↑	↓	=	↓	↑
	↑	=	↓	=	=	↓
	↑	↑	↓	=	=	=

CONCLUSIONES

1. Mediante curvas de tolerancia a la insulina se demostró que al día 17 de gestación en la cepa de ratones C57BL/6J se presenta resistencia a la insulina
2. No existe una relación entre el peso corporal y la resistencia a la insulina observada al final de la gestación.
3. En la gestación, el peso de tejido adiposo perigonadal no se modifica en tanto que hay un aumento en el tejido adiposo subcutáneo en la región inguinal.
4. De acuerdo con nuestra hipótesis, la expresión y fosforilación de las proteínas de la vía de señalización de la insulina, en la vía PI3K-AKT difiere entre tejidos.
5. En los tres tejidos evaluados se encontró una disminución significativa en la fosforilación de AKT (T308).
6. Los cambios en la proteína PTEN, tanto la disminución de su fosforilación en serina 380 y el incremento de la proteína total (activa), participan como un mecanismo de resistencia a la insulina en el hígado y el tejido adiposo al final de la gestación, pero no en el músculo esquelético.
7. La fosforilación de GSK3 β (S9) se encuentra aumentada en el hígado, disminuye en el músculo y no se modifica en el tejido adiposo. El aumento en la fosforilación de GSK3 β (S9) en el hígado, sugiere que este órgano es capaz de sintetizar glucógeno independientemente de la vía de señalización de la insulina.
8. No encontramos diferencias en la fosforilación de la proteína PDK-1 (S241), en ninguno de los tres tejidos evaluados al día 17 gestacional. Por lo tanto, esta proteína no juega un papel importante en la resistencia a la insulina gestacional.

7. Por último, demostramos que la Carbamoil fosfato sintasa-1 (CPS-1), enzima importante en el ciclo de la urea, sufre una disminución en la expresión de su ARNm y proteína total. Lo cual lleva a pensar que la maquinaria de síntesis y degradación de aminoácidos es modificada en la etapa final de la gestación.

REFERENCIAS

- Aguilar-Bryan, L., J.P.t. Clement, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko, and J. Bryan. 1998. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev.* 78:227-245.
- Al-Badri, M.R., M.S. Zantout, and S.T. Azar. 2015. The role of adipokines in gestational diabetes mellitus. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism.* 6:103-108.
- Amorim, M.A., C. Guerra-Araiza, O. Pernia, E.F. da Cruz e Silva, and L.M. Garcia-Segura. 2010. Progesterone regulates the phosphorylation of protein phosphatases in the brain. *Journal of neuroscience research.* 88:2826-2832.
- Andrali, S.S., M.L. Sampley, N.L. Vanderford, and S. Ozcan. 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J.* 415:1-10.
- Anthonsen, M.W., L. Ronnstrand, C. Wernstedt, E. Degerman, and C. Holm. 1998. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem.* 273:215-221.
- Artner, I., and R. Stein. 2008. Transcriptional Regulation of Insulin Gene Expression. In *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease.* S. Seino and I.B. Graeme, editors. Springer, Japan.
- Augustine, R.A., S.R. Ladyman, and D.R. Grattan. 2008. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *The Journal of physiology.* 586:387-397.
- Baillyes EM, G.P.H.J. 1992. Insulin synthesis. In *Insulin: Molecular Biology to Pathology.* IRL Press, Oxford.
- Barbour, L.A., C.E. McCurdy, T.L. Hernandez, J.P. Kirwan, P.M. Catalano, and J.E. Friedman. 2007. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes care.* 30 Suppl 2:S112-119.
- Barbour, L.A., S. Mizanoor Rahman, I. Gurevich, J.W. Leitner, S.J. Fischer, M.D. Roper, T.A. Knotts, Y. Vo, C.E. McCurdy, S. Yakar, D. Leroith, C.R. Kahn, L.C. Cantley, J.E. Friedman, and B. Draznin. 2005. Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *The Journal of biological chemistry.* 280:37489-37494.
- Barbour, L.A., J. Shao, L. Qiao, W. Leitner, M. Anderson, J.E. Friedman, and B. Draznin. 2004. Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology.* 145:1144-1150.
- Barbour, L.A., J. Shao, L. Qiao, L.K. Pulawa, D.R. Jensen, A. Bartke, M. Garrity, B. Draznin, and J.E. Friedman. 2002. Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *American journal of obstetrics and gynecology.* 186:512-517.
- Barrett, E.J. 2005. *The Endocrine Pancreas.* in *Medical Physiology. A cellular and molecular approach.* Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
- Bell, A.W., and D.E. Bauman. 1997. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2:265-278.
- Bermudez Brito, M., E. Goulielmaki, and E.A. Papakonstanti. 2015. Focus on PTEN Regulation. *Frontiers in oncology.* 5:166.

- Bowe, J.E., Z.J. Franklin, A.C. Hauge-Evans, A.J. King, S.J. Persaud, and P.M. Jones. 2014. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *The Journal of endocrinology*. 222:G13-25.
- Brelje, T.C., D.W. Scharp, P.E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H.G. Friesen, and R.L. Sorenson. 1993. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 132:879-887.
- Butte, N.F. 2000. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 71:1256S-1261S.
- Butte, N.F., J.M. Hopkinson, N. Mehta, J.K. Moon, and E.O. Smith. 1999. Adjustments in energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*. 69:299-307.
- Butte, N.F., W.W. Wong, M.S. Treuth, K.J. Ellis, and E. O'Brian Smith. 2004. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition. *The American journal of clinical nutrition*. 79:1078-1087.
- Catalano, P.M., L. Huston, S.B. Amini, and S.C. Kalhan. 1999. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 180:903-916.
- Catalano, P.M., J.P. Kirwan, S. Haugel-de Mouzon, and J. King. 2003. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *The Journal of nutrition*. 133:1674S-1683S.
- Catalano, P.M., S.E. Nizielski, J. Shao, L. Preston, L. Qiao, and J.E. Friedman. 2002. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 282:E522-533.
- Catalano, P.M., E.D. Tyzbit, N.M. Roman, S.B. Amini, and E.A. Sims. 1991. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 165:1667-1672.
- Cnop, M., N. Welsh, J.C. Jonas, A. Jorns, S. Lenzen, and D.L. Eizirik. 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 54 Suppl 2:S97-107.
- Coate, K.C., M.S. Smith, M. Shiota, J.M. Irimia, P.J. Roach, B. Farmer, P.E. Williams, and M.C. Moore. 2013. Hepatic glucose metabolism in late pregnancy: normal versus high-fat and -fructose diet. *Diabetes*. 62:753-761.
- Colomiere, M., M. Permezel, and M. Lappas. 2010. Diabetes and obesity during pregnancy alter insulin signalling and glucose transporter expression in maternal skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Journal of molecular endocrinology*. 44:213-223.
- Copps, K.D., and M.F. White. 2012. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 55:2565-2582.
- Cho, S.H., C.H. Lee, Y. Ahn, H. Kim, C.Y. Ahn, K.S. Yang, and S.R. Lee. 2004. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H(2)O(2) mediated cell signaling. *FEBS Lett*. 560:7-13.
- Chou, M.M., W. Hou, J. Johnson, L.K. Graham, M.H. Lee, C.S. Chen, A.C. Newton, B.S. Schaffhausen, and A. Toker. 1998. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*. 8:1069-1077.

- Chu, Y.L., Y.D. Gong, Z.H. Su, H.N. Yu, Q. Cui, H.Y. Jiang, and H.M. Qu. 2014. Relationship between tyrosine phosphorylation and protein expression of insulin receptor and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban.* 34:393-397.
- Duggleby, S.L., and A.A. Jackson. 2002. Protein, amino acid and nitrogen metabolism during pregnancy: how might the mother meet the needs of her fetus? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5:503-509.
- Eldar-Finkelman, H., S.A. Schreyer, M.M. Shinohara, R.C. LeBoeuf, and E.G. Krebs. 1999. Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes.* 48:1662-1666.
- Eliasson, L., F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M.B. Hoppa, and P. Rorsman. 2008. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol.* 586:3313-3324.
- Engelking, L.R. 1997. Physiology of the endocrine pancreas. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 12:224-229.
- Fasshauer, M., M. Bluher, and M. Stumvoll. 2014. Adipokines in gestational diabetes. *The lancet. Diabetes & endocrinology.* 2:488-499.
- Fernandez Mejia, C. 2013. Diabetes Mellitus y síndrome metabólico. In *Bioquímica de Laguna*. Vol. 7. E.P. José Laguna, Federico Martínez Montes, and H.R.R. Juan P. Pardo Vázquez, editors. El manual Moderno, Mexico City.
- Foufelle, F., and P. Ferre. 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 366:377-391.
- Foufelle, F., B. Hegarty, A. Bobard, I. Hainault, P. Bossard, and P. Ferre. 2005. [A new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver]. *Med Sci (Paris).* 21:569-571.
- Freemark, M. 2006. Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming. *Hormone research.* 65 Suppl 3:41-49.
- Friedman, J.E., T. Ishizuka, J. Shao, L. Huston, T. Highman, and P. Catalano. 1999. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes.* 48:1807-1814.
- Goldstein, B.J. 2001. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B): a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus, obesity and related states of insulin resistance. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders.* 1:265-275.
- Gonzalez, C., A. Alonso, R. Fernandez, and A.M. Patterson. 2003. Regulation of insulin receptor substrate-1 in the liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats throughout pregnancy. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology.* 17:187-197.
- Gonzalez, C.G., A. Alonso, M. Balbin, F. Diaz, S. Fernandez, and A.M. Patterson. 2002. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology.* 16:193-205.
- Handwerger, S., and M. Freemark. 2000. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM.* 13:343-356.
- Henquin, J.C. 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 52:739-751.

- Hiriart, M., and L. Aguilar-Bryan. 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E1298-1306.
- Kalhan, S.C., K.Q. Rossi, L.L. Gruca, D.M. Super, and S.M. Savin. 1998. Relation between transamination of branched-chain amino acids and urea synthesis: evidence from human pregnancy. *The American journal of physiology.* 275:E423-431.
- Kirwan, J.P., S. Hauguel-De Mouzon, J. Lepercq, J.C. Challier, L. Huston-Presley, J.E. Friedman, S.C. Kalhan, and P.M. Catalano. 2002. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes.* 51:2207-2213.
- Kitamura, T., Y. Kitamura, S. Kuroda, Y. Hino, M. Ando, K. Kotani, H. Konishi, H. Matsuzaki, U. Kikkawa, W. Ogawa, and M. Kasuga. 1999. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 19:6286-6296.
- Korkmazer, E., and N. Solak. 2015. Correlation between inflammatory markers and insulin resistance in pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology.* 35:142-145.
- Kosus, N., A. Kosus, and N. Turhan. 2014. Relation between abdominal subcutaneous fat tissue thickness and inflammatory markers during pregnancy. *Archives of medical science : AMS.* 10:739-745.
- Lappas, M. 2014. GSK3beta is increased in adipose tissue and skeletal muscle from women with gestational diabetes where it regulates the inflammatory response. *PLoS ONE.* 9:e115854.
- Li, Y.Y., R. Xiao, C.P. Li, J. Huangfu, and J.F. Mao. 2015. Increased plasma levels of FABP4 and PTEN is associated with more severe insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 21:426-431.
- Lihn, A.S., S.B. Pedersen, and B. Richelsen. 2005. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev.* 6:13-21.
- Ma, Q., J. Fan, J. Wang, S. Yang, Q. Cong, R. Wang, Q. Lv, R. Liu, and G. Ning. 2015. High levels of chorionic gonadotrophin attenuate insulin sensitivity and promote inflammation in adipocytes. *J Mol Endocrinol.* 54:161-170.
- Mastorakos, G., and I. Ilias. 2003. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci.* 997:136-149.
- Matschinsky, F.M. 1996. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45:223-241.
- Metzger, B.D., Unger, R. H. & Freinkel, N. 1997. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XIV. Relationships between circulation glucagon, insulin, glucose and amino acids in response to a "mixed meal" in late pregnancy. *Metabolism* 26:151–156.
- Moeschel, K., A. Beck, C. Weigert, R. Lammers, H. Kalbacher, W. Voelter, E.D. Schleicher, H.U. Haring, and R. Lehmann. 2004. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *The Journal of biological chemistry.* 279:25157-25163.
- Musial, B., D.S. Fernandez-Twinn, O.R. Vaughan, S.E. Ozanne, P. Voshol, A.N. Sferruzzi-Perri, and A.L. Fowden. 2016. Proximity to Delivery Alters Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Pregnant Mice. *Diabetes.* 65:851-860.
- Nakada, M., T. Minamoto, I.V. Pyko, Y. Hayashi, and J.-i. Hamada. 2011. The Pivotal Roles of GSK3 β in Glioma Biology.

- Nakashima, N., P.M. Sharma, T. Imamura, R. Bookstein, and J.M. Olefsky. 2000. The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 275:12889-12895.
- Nikoulina, S.E., T.P. Ciaraldi, S. Mudaliar, P. Mohideen, L. Carter, and R.R. Henry. 2000. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes*. 49:263-271.
- Noureldeen, A.F., S.Y. Qusti, M.N. Al-Seeni, and M.H. Bagais. 2014. Maternal leptin, adiponectin, resistin, visfatin and tumor necrosis factor-alpha in normal and gestational diabetes. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 29:462-470.
- O'Tierney-Ginn, P., L. Presley, S. Myers, and P. Catalano. 2015. Placental growth response to maternal insulin in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 100:159-165.
- Oyer, P.E., S. Cho, J.D. Peterson, and D.F. Steiner. 1971. Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *The Journal of biological chemistry*. 246:1375-1386.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C.J. Walkey, J.C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili, and B.M. Spiegelman. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 423:550-555.
- Qiao, L.Y., R. Zhande, T.L. Jetton, G. Zhou, and X.J. Sun. 2002. In vivo phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *The Journal of biological chemistry*. 277:26530-26539.
- Ramos-Roman, M.A. 2011. Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes. *Horm Metab Res*. 43:593-600.
- Rena, G., S. Guo, S.C. Cichy, T.G. Unterman, and P. Cohen. 1999. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem*. 274:17179-17183.
- Reyna, E., and M. Torres. 2005. Transportadores de glucosa en el embarazo: Revisión. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 65:81-88.
- Rojas-Rodriguez, R., L.M. Lifshitz, K.D. Bellve, S.Y. Min, J. Pires, K. Leung, C. Boeras, A. Sert, J.T. Draper, S. Corvera, and T.A. Moore Simas. 2015. Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 58:2106-2114.
- Rorsman, P., and E. Renstrom. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 46:1029-1045.
- Ryan, E.A., M.J. O'Sullivan, and J.S. Skyler. 1985. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes*. 34:380-389.
- Saad, M.J., L. Maeda, S.L. Brenelli, C.R. Carvalho, R.S. Paiva, and L.A. Velloso. 1997. Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia*. 40:179-186.
- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799-806.
- Sevillano, J., J. de Castro, C. Bocos, E. Herrera, and M.P. Ramos. 2007. Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology*. 148:5933-5942.
- Shao, J., P.M. Catalano, H. Yamashita, T. Ishizuka, and J.E. Friedman. 2000. Vanadate enhances but does not normalize glucose transport and insulin receptor phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*. 183:1263-1270.

- Shearn, C.T., R.L. Smathers, B.J. Stewart, K.S. Fritz, J.J. Galligan, N. Hail, Jr., and D.R. Petersen. 2011. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) inhibition by 4-hydroxynonenal leads to increased Akt activation in hepatocytes. *Molecular pharmacology*. 79:941-952.
- Shigematsu, S., A.H. Khan, M. Kanzaki, and J.E. Pessin. 2002. Intracellular insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) distribution but not insulin-stimulated GLUT4 exocytosis and recycling are microtubule dependent. *Mol Endocrinol*. 16:1060-1068.
- Sivan, E., and G. Boden. 2003. Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep*. 3:319-322.
- Skvarca, A., M. Tomazic, R. Blagus, B. Krhin, and A. Janez. 2013. Adiponectin/leptin ratio and insulin resistance in pregnancy. *The Journal of international medical research*. 41:123-128.
- Sonagra, A.D., S.M. Biradar, D. K, and D.S.J. Murthy. 2014. Normal pregnancy- a state of insulin resistance. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 8:CC01-03.
- Srikanta, S., O.P. Ganda, R.A. Jackson, R.E. Gleason, A. Kaldany, M.R. Garovoy, E.L. Milford, C.B. Carpenter, J.S. Soeldner, and G.S. Eisenbarth. 1983. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Ann Intern Med*. 99:320-326.
- Stagner, J.I., E. Samols, and G.C. Weir. 1980. Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest*. 65:939-942.
- Stuart, C.A., M.E. Howell, B.M. Cartwright, M.P. McCurry, M.L. Lee, M.W. Ramsey, and M.H. Stone. 2014. Insulin resistance and muscle insulin receptor substrate-1 serine hyperphosphorylation. *Physiological reports*. 2.
- Sutter-Dub, M.T. 1986. Carbohydrate metabolism of female rat adipocytes: effects and mechanisms of action of progesterone. *Diabete & metabolisme*. 12:329-336.
- Tordjman, K.M., K.A. Leingang, D.E. James, and M.M. Mueckler. 1989. Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:7761-7765.
- Tritos, N.A., and C.S. Mantzoros. 1997. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 40:1371-1379.
- Vara, J.Á.F., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, and M. González-Barón. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 30:193-204.
- Vaughan, O.R., H.M. Fisher, K.N. Dionelis, E.C. Jefferies, J.S. Higgins, B. Musial, A.N. Sferruzzi-Perri, and A.L. Fowden. 2015. Corticosterone alters materno-fetal glucose partitioning and insulin signalling in pregnant mice. *J Physiol*. 593:1307-1321.
- Vejrazkova, D., J. Vcelak, M. Vankova, P. Lukasova, O. Bradnova, T. Halkova, R. Kancheva, and B. Bendlova. 2014. Steroids and insulin resistance in pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 139:122-129.
- Vinciguerra, M., and M. Foti. 2006. PTEN and SHIP2 phosphoinositide phosphatases as negative regulators of insulin signalling. *Archives of physiology and biochemistry*. 112:89-104.
- Wada, T., S. Hori, M. Sugiyama, E. Fujisawa, T. Nakano, H. Tsuneki, K. Nagira, S. Saito, and T. Sasaoka. 2010. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 298:E881-888.
- Withers, D.J., J.S. Gutierrez, H. Towery, D.J. Burks, J.M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G.I. Shulman, S. Bonner-Weir, and M.F. White. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 391:900-904.

- Yin, H.L., and P.A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol.* 65:761-789.
- Zavalza-Gomez, A.B., R. Anaya-Prado, A.R. Rincon-Sanchez, and J.M. Mora-Martinez. 2008. Adipokines and insulin resistance during pregnancy. *Diabetes research and clinical practice.* 80:8-15.
- Zhang, T., M. Fang, Z.-M. Fu, H.-C. Du, H. Yuan, G.-Y. Xia, J. Feng, and G.-Y. Yin. 2014. Expression of PI3-K, PKB and GSK-3 β in the skeletal muscle tissue of gestational diabetes mellitus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 7:309-312.