



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

---

---

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN LA  
EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES GLUT EN  
MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS CON *Candida  
albicans***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**CLAUDIA SUSANA CLEMENTE LÓPEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**/2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: José Pedraza Chaverri  
**VOCAL:** Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio  
**SECRETARIO:** Profesor: Octavio Rodríguez Cortés  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Gibrán Pérez Montesinos  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Gustavo Olvera García

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CELULAR I.  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. OCTAVIO RODRÍGUEZ CORTÉS**

---

Firma del asesor

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. RAÚL FLORES MEJÍA**

---

Firma del supervisor técnico

**SUSTENTANTE: CLAUDIA SUSANA CLEMENTE LÓPEZ**

---

Firma del sustentante

A MIS PADRES, POR EL APOYO QUE SIEMPRE ME HAN  
BRINDADO, POR SU CARIÑO, SUS CONSEJOS Y  
SU PACIENCIA, MUCHÍSIMAS GRACIAS POR TODO.

A MI HERMANO, EL REGALO MAS GRANDE QUE HE TENIDO.

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	9
<b>1.1. Transportadores GLUT</b> .....	10
<b>1.1.1. Mecanismos del transporte de glucosa a través de la membrana</b> .....	12
<b>1.1.2. Transportadores de difusión facilitada clase I</b> .....	14
<b>1.1.3. Transportadores de difusión facilitada clase II</b> .....	16
<b>1.1.4. Transportadores de difusión facilitada clase III</b> .....	16
<b>1.2. Alteraciones en la captación de glucosa: Diabetes</b> .....	18
<b>1.2.1. Complicaciones de la Diabetes mellitus</b> .....	19
<b>1.2.2. Infecciones en pacientes diabéticos</b> .....	20
<b>1.2.3. Infecciones por <i>Candida albicans</i></b> .....	21
<b>1.2.4. Respuesta inmunológica innata contra <i>Candida albicans</i>: el papel del macrófago</b> .....	22
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	24
<b>2.1. Expresión de los transportadores GLUT en leucocitos</b> .....	24
<b>2.2. Efecto de la insulina en células del sistema inmunológico innato</b> .....	25

<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>6.1. Línea celular THP-1.....</b>	<b>28</b>
<b>6.2. Maduración de los monocitos THP-1 a macrófagos y determinación de CD14 posterior a la maduración.....</b>	<b>28</b>
<b>6.2.1. Determinación de la viabilidad y porcentaje de adhesión.....</b>	<b>29</b>
<b>6.3. Titulación de los anticuerpos anti-GLUT.....</b>	<b>29</b>
<b>6.4 Tinción para citometría de flujo de transportadores GLUT en las células THP-1 maduras .....</b>	<b>30</b>
<b>6.5 Cultivo de macrófagos THP-1 a diferentes concentraciones de insulina.....</b>	<b>30</b>
<b>6.6 Infección de macrófagos THP-1 con <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>6.7 Ensayo de incorporación del análogo fluorescente de glucosa 6-NBDG.....</b>	<b>31</b>
<b>6.8 Análisis estadístico.....</b>	<b>32</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>7.1. Maduración de los monocitos THP-1 a macrófagos y determinación de la expresión de CD14.....</b>	<b>33</b>

<b>7.2. Determinación de la viabilidad y porcentaje de adhesión de las células THP-1 posterior a la maduración.....</b>	<b>35</b>
<b>7.3. Titulación de los anticuerpos GLUT.....</b>	<b>37</b>
<b>7.4. Expresión basal de los transportadores GLUT en las células THP-1 en ausencia de insulina.....</b>	<b>37</b>
<b>7.5. Expresión de los transportadores GLUT en presencia de insulina a concentración fisiológica.....</b>	<b>40</b>
<b>7.6. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración fisiológica de insulina.....</b>	<b>41</b>
<b>7.7. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración alta de insulina.....</b>	<b>43</b>
<b>7.8. Incorporación del análogo de glucosa 6-NBDG.....</b>	<b>47</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>

## ABREVIATURAS

6-NBDG	6-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol-4-il) amino)-desoxiglucosa
ADP	Adenosín difosfato
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATP	Adenosín trifosfato
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CAF	Control de autofluorescencia
CI	Control de isotipo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONH <sub>2</sub>	Carbamido
CR3	Receptor de complemento 3
DCs	Célula dendríticas
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ROS	Especie reactiva de oxígeno
RNI	Especie reactiva de nitrógeno
GLUT	Transportador de glucosa
GM-CSF	Factor estimulante de colonia granulocito-macrófago
HMIT	Transportador mio-inositol-acoplado-H
ICAM	Molécula de adhesión celular-1
IL	Interleucina
IR	Resistencia a insulina
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina-1
Km	Constante de Michaelis-Menten
LPS	Lipopolisacárido
MAPcinastas	Cinastas activadas por mitógenos



MCP-1	Proteína-1 quimiotáctica de monocitos
MIF	Mediana de la intensidad de fluorescencia
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MOI	Índice de multiplicidad de infección
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras <i>kappa</i> de las células <i>B</i> activadas
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógeno
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehído
PHA	Fitohemaglutinina
Pi	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3, 4,5-trisfosfato
PKB	Protein cinasa B
PKC	Protein cinasa C
PMA	Forbol-12 miristato 13-acetato
PMNs	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SFB	Suero fetal bovino
SGLT	Transportadores sodio/glucosa
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UI	Unidades Internacionales
VD <sub>3</sub>	1, 2, 5-dihidroxitamina D3

## RESUMEN

La glucosa es la principal fuente de energía para las células del sistema inmunológico, el transporte facilitado de esta hexosa es mediado por la familia de transportadores GLUT, los cuales exhiben diferente afinidad y especificidad por la glucosa y otros sustratos, así como una distribución tejido específica. El metabolismo de la glucosa está limitado por la velocidad de captación de esta hexosa por las células. En la historia natural del desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), las células  $\beta$  pancreáticas incrementan la secreción de insulina en respuesta a la resistencia a esta hormona en los órganos blanco. Cuando la producción de insulina es insuficiente para superar esta resistencia, los niveles plasmáticos de glucosa aumentan, dando lugar al desarrollo de hiperglicemia estableciéndose así la DMT2. La DMT2 está asociada con diversas comorbilidades micro y macro angiopáticas. Adicionalmente, los pacientes diabéticos desarrollan con mayor frecuencia enfermedades infecciosas y cáncer respecto a los no diabéticos, lo cual sugiere alteraciones en el sistema inmunológico de estos pacientes. Por otra parte, se ha demostrado que la insulina afecta la función de las células del sistema inmunológico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración elevada de insulina en la expresión de los transportadores GLUT y el consumo de glucosa en los macrófagos THP-1 en condiciones basales y de infección con *Candida albicans*. Se usaron seis grupos de trabajo, los cuales fueron macrófagos infectados y no infectados; a su vez en cada uno de estos dos grupos se dividieron en tres grupos cultivados: en ausencia de insulina, 10  $\mu$ UI/mL y 45  $\mu$ UI/mL de esta hormona. Posteriormente se determinó por citometría de flujo la expresión de los transportadores GLUT1-5, así como la captación de glucosa a los 20, 40 y 60 minutos. Se encontró que los macrófagos THP-1 expresan basalmente los transportadores GLUT1, GLUT3, GLUT4 y GLUT5, esta expresión se incrementa en presencia de insulina para los receptores GLUT 4 y GLUT5, mientras que el efecto de la infección incrementa la expresión en membrana de los transportadores GLUT3 y GLUT5. También se observó que la expresión de los transportadores GLUT3 y GLUT5 así como la captación de glucosa por parte de los macrófagos THP-1 infectados disminuye en presencia de una alta concentración de insulina comparada con el grupo tratado con insulina a concentración fisiológica. Este trabajo pone de manifiesto que una concentración elevada de insulina puede disminuir la captación de glucosa en los macrófagos infectados, lo cual podría alterar la actividad microbicida de los macrófagos.

## 1. MARCO TEÓRICO

El metabolismo es fundamental para la función de los macrófagos y otras células del sistema inmunitario. Actualmente existe un gran interés en el entendimiento de cómo las vías metabólicas influyen en la respuesta inmunológica y finalmente cómo participan en la resolución o progresión de una enfermedad infecciosa (Wolowczuk *et al.*, 2008). El metabolismo refiere una compleja red de reacciones bioquímicas involucradas con la producción y biosíntesis de macromoléculas (Nelson y Cox, 2009). Esta demanda de energía puede ser diferente para cada una de las células del sistema inmunitario y la naturaleza de la respuesta requerida (Pearce *et al.*, 2013).

En todas las células eucariotas se requiere un suministro continuo de energía libre para mantener su estructura altamente organizada, el transporte activo de iones y moléculas, la síntesis de macromoléculas a partir de precursores sencillos, entre muchas otras funciones. Las células del sistema inmunológico utilizan el carbono de moléculas combustibles tales como la glucosa y ácidos grasos, las cuales se oxidan hasta dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y la energía liberada se utiliza para generar adenosín trifosfato (ATP) a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Calder, 1995).

La glucosa es la principal fuente de energía y es un sustrato importante para la síntesis de lípidos y proteínas en las células, provee energía en forma de ATP a través de la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y mediante la fosforilación oxidativa. Es también utilizada en la síntesis de glicerol para la producción de triglicéridos, además provee intermediarios para la síntesis de aminoácidos no esenciales. Este carbohidrato es obtenido directamente de la dieta, principalmente después de un proceso de hidrólisis de los disacáridos y polisacáridos, y mediante su síntesis en órganos como el hígado a partir de otros sustratos. La glucosa derivada de la dieta es transferida del lumen intestinal, posteriormente alcanza torrente sanguíneo y es transportada de la circulación al interior de las células blanco (Stryer *et al.*, 2012; Feng y Keating, 2007).

## 1.1. Transportadores GLUT

Para poder llevar a cabo funciones importantes como la oxidación, generación de energía y almacenaje en forma del polímero conocido como glucógeno, la glucosa debe ingresar a la célula para incorporarse a las vías metabólicas ya mencionadas. Sin embargo, la glucosa es incapaz de difundir directamente a través de las membranas celulares debido a su naturaleza polar, por tanto requiere de proteínas transportadoras transmembranales que formen “poros” que comuniquen el exterior con el interior celular, permitiendo el transporte específico de la glucosa y otros monosacáridos al citosol de la célula (Díaz y Burgos, 2002; Devlin, 2006).

Estos transportadores comprenden dos grupos estructural y funcionalmente diferentes:

I. Co-transportadores de glucosa dependientes de  $\text{Na}^+$  (SGLT), del inglés *Sodium/Glucose Transporters*.

II. Transportadores de difusión facilitada uniportes para hexosas independiente de  $\text{Na}^+$ , familia GLUT, por sus siglas en inglés *Glucose Transporters* (Bermúdez *et al.*, 2007; Augustin, 2010).

### I. Familia de los co-transportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT).

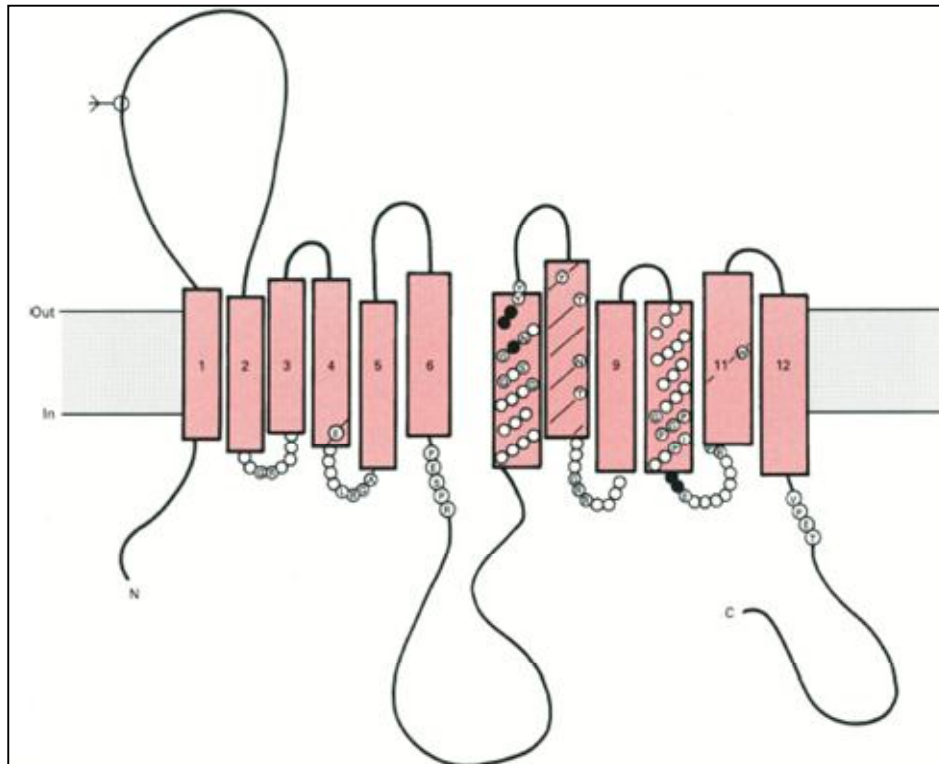
Este sistema se denomina SGLT y se conocen 6 isoformas (SGLT1-6), estos transportadores aprovechan el gradiente electroquímico provisto por la bomba (sodio-potasio)  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa para el transporte de glucosa al interior de la célula en contra de un gradiente de concentración. Estos transportadores han sido descritos en el epitelio intestinal y en los túbulos contorneados proximal y distal, permiten la absorción rápida de esta molécula desde el íleon hacia el sistema portal, así como la reabsorción de la glucosa filtrada en el glomérulo al torrente circulatorio, respectivamente (Bermúdez *et al.*, 2007).

## II. Transportadores de glucosa por difusión facilitada

Los transportadores GLUT son proteínas que permiten el paso de la glucosa y otros monosacáridos mediante el transporte pasivo o facilitado, en el cual se moviliza la glucosa a favor del gradiente de concentración. En este sistema no se requiere de un aporte de energía dado por la hidrólisis del ATP a ADP, así como tampoco se utiliza un gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  ó  $\text{H}^+$  (Wood y Trayhurn, 2003; Devlin, 2006).

Todos los miembros de la familia de transportadores GLUT poseen un conjunto de secuencias primarias de aminoácidos extremadamente conservadas que determinan estructuras secundarias y terciarias que son responsables de las características funcionales de la proteína: especificidad por uno o más carbohidratos, afinidad por el sustrato, distribución tisular, ubicación celular, regulación de su actividad a través de hormonas u otros estímulos (Bermúdez *et al.*, 2007).

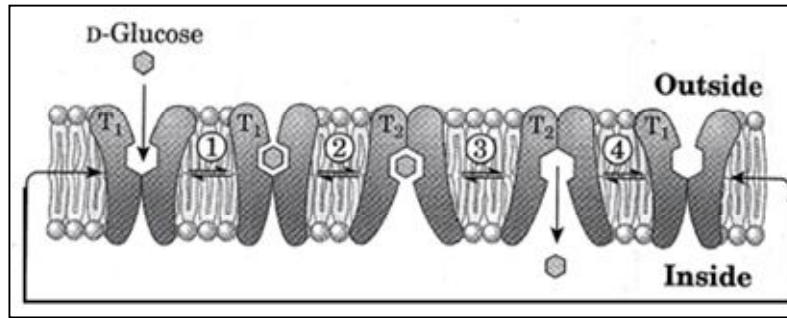
De acuerdo con la información obtenida de la secuencia de aminoácidos por medio de librerías de ácido desoxirribonucleico complementario (cADN), las 13 isoformas comparten características estructurales en común: las 13 proteínas GLUT comprenden aproximadamente 500 residuos de aminoácidos, formando doce alfa-hélices transmembranales conectadas entre sí por asas hidrofílicas, cuyos grupos amino y carboxilo terminal se encuentran orientados hacia el citosol y una región de N-glicosilación en la primera o quinta asa extracelular, (Figura 1). Es importante señalar que los aminoácidos más conservados de la familia GLUT en el humano se encuentran en las 12 alfa-hélices y las mayores divergencias se han encontrado en el asa intracelular que conecta las alfa hélices 6 y 7 (Gould y Holman, 1993; Augustin, 2010).



**Figura 1. Estructura general de los transportadores GLUT.** Los transportadores GLUT contienen 12 hélices transmembranales con un extremo amino (N) y carboxilo (C) terminal dispuestos intracelularmente. (Adaptado de Gould y Holman, 1993)

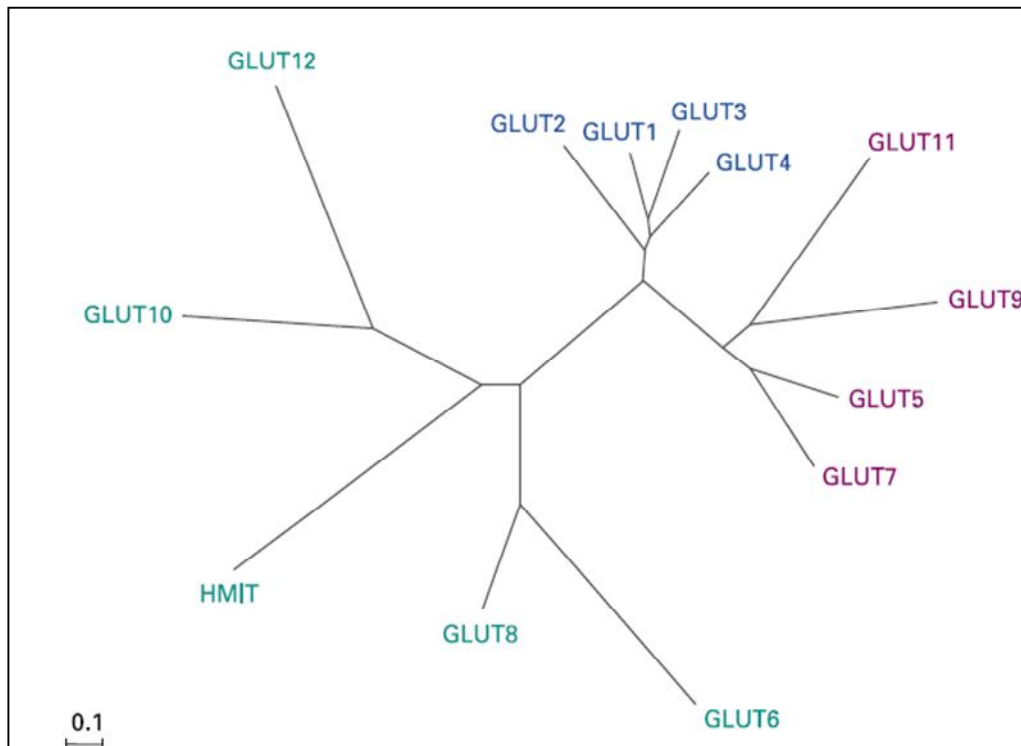
### 1.1.1. Mecanismos del transporte de glucosa a través de la membrana

Los segmentos transmembranales de los transportadores GLUT 1, 3, 5, 7, 8 y 11 contienen aminoácidos que poseen grupos hidroxilo (OH) y carbamido ( $\text{CONH}_2$ ) que participan en la formación de puentes de hidrógeno transitorios con los grupos hidroxilo de la glucosa. La evidencia experimental sugiere que la glucosa entra a la célula en cuatro pasos: en primer lugar la glucosa se une al transportador en la cara externa de la membrana; posteriormente el transportador GLUT sufre un cambio conformacional, la glucosa y su sitio de unión quedan localizados en la cara interna de la membrana; después el transportador libera la glucosa al citoplasma; por último el transportador GLUT libre cambia nuevamente de conformación, para exponer el sitio de unión a la glucosa en la cara externa y retorna a su estado inicial. Una vez dentro de la célula, la glucosa es rápidamente fosforilada y metabolizada, (Figura 2) (Lienhard *et al.*, 1992; Nelson y Cox, 2009).



**Figura 2. Modelo del transporte de glucosa a través de GLUT1 en eritrocitos.** El transporte ocurre en cuatro pasos. 1. La glucosa se une a un sitio estereoespecífico en T<sub>1</sub>; esto disminuye la energía de activación para 2. Un cambio conformacional de la glucosa <sub>exterior</sub> • T<sub>1</sub> a glucosa <sub>interior</sub> • T<sub>2</sub>, la glucosa efectúa su paso a través de la membrana. 3 la glucosa es liberada de T<sub>2</sub> al citoplasma, y 4 el transportador regresa a la conformación T<sub>1</sub> listo para transportar otra molécula de glucosa. Adaptación (Nelson y Cox, 2007).

Basados en el dendograma construido a partir de alineamientos de secuencia múltiple, la familia GLUT se divide en: clase I, clase II y clase III, (Figura3) (Mobasheri *et al.*, 2008).



**Figura 3. Dendograma de la familia de transportadores de glucosa (GLUT).** Fue construido a partir de alineamientos de secuencia múltiple de los 13 miembros de la familia GLUT en humanos. Las tres clases de proteínas GLUT están codificadas como: clase I. azul, clase II morado y clase III

verde. La escala representa 0.1 sustituciones por posición de aminoácido. HMIT (transportador mio-inositol-acoplado-H<sup>+</sup>). Adaptación Mobasher *et al.*, 2008.

### **1.1.2. Transportadores de difusión facilitada clase I**

La clase I de transportadores facilitados comprenden a GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4, los cuales fueron agrupados en este conjunto por su similitud en términos de estructura, función y distribución en los tejidos (Wood y Trayhurn, 2003).

El gen de GLUT1 se ubica en el cromosoma 1p35.31.3, este GLUT posee una alta afinidad por la glucosa [constante de Michaelis-Menten (Km) = 1-2 mM] por lo que es capaz de transportarla al interior de las células prácticamente a cualquier concentración. Se considera como un transportador basal de glucosa puesto que mantiene su concentración intracelular estable, hecho de gran importancia en aquellas células que requieren un suministro constante de la misma para la producción de energía. El GLUT1 se expresa particularmente en el cerebro (incluyendo la barrera hemato-encefálica) y eritrocitos. Se observan niveles moderados de expresión en tejido adiposo, músculo e hígado (Bermúdez *et al.*, 2007).

El GLUT 2 es un transportador de glucosa de baja afinidad (Km = 15–20 mM), su gen se ubica en el cromosoma 3q26.1-26.3. Debido a su baja afinidad por la glucosa y su alta expresión en las células  $\beta$  del páncreas e hígado, se ha propuesto que este transportador funciona como sensor de glucosa. Debido a su elevado Km este GLUT transporta a la glucosa en función de su concentración por lo que se le atribuye la propiedad de glucosensor. Así por ejemplo, cuando existe una baja concentración de glucosa en plasma el transportador GLUT2 no es capaz de transportar glucosa al interior de la célula  $\beta$  del páncreas y, por lo tanto, la secreción de insulina es muy baja. Sin embargo, después de las comidas cuando se incrementa la concentración plasmática de glucosa en suficiente magnitud para poder ser transportada al interior de la célula  $\beta$  pancreática, la generación de ATP producto del metabolismo de la glucosa es capaz de estimular la liberación de insulina (Johnson *et al.*, 1990; Bermúdez *et al.*, 2007).



Se ha descrito la intervención del GLUT2 en el metabolismo hepático de la glucosa. Después de ingerir alimentos, el hígado es capaz de incorporar la glucosa gracias a GLUT2 para ser convertida rápidamente en glucógeno. De forma inversa, durante el período post-prandial tardío (comprendido de 6 a 8 horas después de las comidas) el glucógeno es degradado generando moléculas de glucosa que salen del hígado al torrente sanguíneo, manteniendo así los niveles de glucosa plasmática dentro de los límites normales (Matschinsky, 1990; Bermúdez *et al.*, 2007). El GLUT2 es encontrado adicionalmente en la superficie del túbulo proximal en el riñón y en enterocitos, donde forma parte de la vía trans-celular del transporte de glucosa y fructosa (Wood y Trayhurn, 2003).

El receptor GLUT3 es un transportador de glucosa de alta afinidad ( $K_m = 1-2 \text{ mM}$ ) fue caracterizado primariamente en cerebro. La presencia de este transportador co-agregado con el GLUT1 en tejido nervioso es indicativo de que este transportador lleva a cabo funciones de mantenimiento del nivel basal de glucosa en neuronas. El gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma 12p13.3 (Bermúdez *et al.*, 2007; Mueckler y Thorens, 2013).

Un transportador de glucosa que responde a la insulina es GLUT4, el cual tiene alta afinidad por la glucosa ( $K_m = 5 \text{ mM}$ ) se encuentra fundamentalmente en corazón, músculo esquelético y tejido adiposo, donde es el responsable de la reducción del incremento post-prandial de los niveles de glucosa plasmáticos. El gen que codifica este transportador de glucosa se ubica en el cromosoma 17p13. En condiciones basales, la mayoría de las moléculas de GLUT4 se encuentran localizadas dentro de vesículas en el citosol que forman dos tipos de compartimientos bien definidos, ya que un grupo de estas vesículas responden a la insulina y otro grupo responde fundamentalmente al estímulo que representa la actividad física. La insulina actúa estimulando la traslocación de vesículas que contienen a GLUT4 de almacenes intracelulares a la membrana plasmática, resultando en un incremento inmediato de 10 a 12 veces en el transporte de glucosa (Wood y Trayhurn, 2003).

Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste es activado, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un número orquestado de interacciones proteicas. Existen dos vías principales de transducción que son activadas por

acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, expresión genética y otros efectos mitogénicos (Olivares y Arellano, 2008; Leto y Saltiel, 2012).

### **1.1.3. Transportadores de difusión facilitada clase II**

Los transportadores de difusión facilitada de clase II están encabezados por el transportador de fructosa GLUT5, e incluye a los transportadores tejido-específico (ver Tabla 1) GLUT7, GLUT9 (ninguno de los cuales han sido completamente caracterizados) y GLUT11

El gen que codifica el transportador GLUT5 se localiza en el cromosoma 1p36.22. El GLUT5 es un transportador de fructosa ( $K_m = 10-13 \text{ mM}$ ). Es expresado predominantemente en intestino delgado, testículos y riñones. Su expresión en el músculo esquelético humano se relaciona a su capacidad de utilizar la fructosa para la glucólisis y la síntesis de glucógeno de forma independiente a la incorporación por medio de GLUT1 y GLUT4 (Mobasher *et al.*, 2008)

### **1.1.4. Transportadores de difusión facilitada clase III**

Comprende cinco miembros: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y el transportador mio-inositol-acoplado-H (HMIT). Cada uno de estos transportadores está distribuido en diferentes tejidos, como es descrito en la Tabla 1.

**Tabla 1. Resumen de las características bioquímicas de la familia de transportadores de glucosa GLUT.** Las tres clases de proteínas GLUT están codificadas como: clase I azul, clase II lila y clase III verde. Modificado de Mueckler y Thorens, 2013.

Nombre del transportador	Sustratos	Km[mM]	Distribución tisular	Locus del gen humano
<b>GLUT 1</b>	Glucosa, galactosa, manosa, glucosamina	2	Eritrocitos, cerebro, barrera hemato-encefálica	1p35-31.3
<b>GLUT 2</b>	Glucosa, galactosa, fructosa, manosa	17	Hígado, islote de Langerhans, intestino, riñón y cerebro	3q26.1-q26.2
<b>GLUT 3</b>	Glucosa, galactosa, manosa	2	Cerebro (neuronas), testículos	12p13.3
<b>GLUT4</b>	Glucosa, glucosamina	5	Tejido adiposo (blanco y café), músculo esquelético y cardiaco	17p13
<b>GLUT5</b>	Fructosa	10	Intestino delgado, riñón	1p36.2
<b>GLUT6</b>	Glucosa	5	Cerebro, bazo, leucocitos	9q34
<b>GLUT7</b>	Glucosa, fructosa	0.3-0.06	Intestino delgado, testículos	1p36.2
<b>GLUT8</b>	Glucosa, fructosa, galactosa	2	Testículos, cerebro, hígado, bazo, tejido adiposo	9q33.3
<b>GLUT9</b>	Urato (glucosa, fructosa)	no descrita	Riñón, hígado, intestino delgado	4p16-15.3
<b>GLUT10</b>	Glucosa, galactosa	0.3	Corazón, cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas	20q13.1
<b>GLUT11</b>	Glucosa, fructosa	no descrita	Corazón, músculo	22q11.2
<b>GLUT12</b>	Glucosa	no descrita	Corazón, músculo esquelético	6q23.2
<b>GLUT13/ HMIT</b>	mio-inositol	no descrita	Cerebro, tejido adiposo	12q12

## 1.2. Alteraciones en la captación de glucosa: Diabetes

El metabolismo de la glucosa en los mamíferos está limitado por la velocidad de captación de esta hexosa por las células y su fosforilación por la hexocinasa. Los transportadores GLUT1, GLUT2 y GLUT3 se expresan de forma constitutiva en la membrana plasmática de los eritrocitos, células  $\beta$  del páncreas y neuronas, respectivamente por mencionar algunos. Por el contrario, el principal transportador de glucosa en las células de músculo esquelético, músculo cardíaco y tejido adiposo, GLUT4, está secuestrado en pequeñas vesículas intracelulares y se desplaza a la membrana plasmática en respuesta a la señal de insulina y a la contracción muscular (Nelson y Cox, 2009; Gómez y Urdampilleta, 2012). Cuando existen alteraciones en la producción de insulina ó pérdida de la sensibilidad a esta hormona, existe una disminución en la captación de glucosa, dando como resultado niveles anormalmente elevados de glucosa en sangre y promoviendo el establecimiento de la diabetes mellitus (DM) (Rang *et al.*, 2008).

La DM es un trastorno metabólico crónico que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas, es caracterizado por una concentración sanguínea de glucosa elevada o hiperglicemia, causada por una deficiencia de insulina, a menudo combinada con una resistencia a la misma. Es de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales (Modificación a la NOM-015-SSA2-1994).

La DM es un reto de salud global; estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que actualmente existen 347 millones de personas con esta enfermedad (OMS, 2012). En México, durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) identifican a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia previa sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición (ENSANUT, 2012).

La clasificación de la DM según la OMS comprende tres grupos: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y diabetes mellitus gestacional (DMG) (OMS, 2014).

La DMT1 resulta de la destrucción autoinmune progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que conduce a una deficiencia completa de insulina (Gruber *et al.*, 2006).

La DMT2 presenta dos principales anormalidades: resistencia a la insulina y disfunción de las células  $\beta$  del páncreas. Es frecuentemente asociada con obesidad visceral y central, así como factores de riesgo cardiovasculares como la hipertensión y anormalidades en el metabolismo de las lipoproteínas (Gruber *et al.*, 2006). En la historia natural del desarrollo de la DMT2, la resistencia a la insulina (IR) está presente antes del establecimiento de la enfermedad clínica. Las células  $\beta$  pancreáticas incrementan la secreción de insulina (condición conocida como hiperinsulinemia) en respuesta a la resistencia a la insulina y durante un período de tiempo, son capaces de contrarrestar efectivamente la IR y mantener los niveles de glucosa por debajo de los niveles de hiperglicemia diabética, etapa conocida como pre-diabetes. Sin embargo, cuando la función de las células  $\beta$  pancreáticas comienza a declinar, la producción de insulina es insuficiente para superar la IR y los niveles plasmáticos de glucosa aumentan. El incremento en la glicemia es paralelo a declive de la función de las células  $\beta$  del páncreas, una vez establecida, la IR permanece relativamente estable durante un tiempo, condición que varía de un individuo a otro (Weir y Bonner, 2004).

La DMG se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo (Modificación a la NOM-015-SSA2-1994).

### **1.2.1. Complicaciones de la diabetes mellitus**

La DM no suele cursar con complicaciones cuando el control glucémico es adecuado, pero si no existe este control la hiperglicemia crónica puede causar diferentes alteraciones. Dentro de las complicaciones crónicas derivadas de la DM se pueden dividir en dos categorías: las complicaciones microangiopáticas y las complicaciones macroangiopáticas. Las

manifestaciones microangiopáticas se caracterizan por la afectación de los pequeños vasos de la microcirculación que afectan a la retina, los glomérulos y los nervios periféricos, conocidos como retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética, respectivamente. La diabetes se asocia también con una aceleración de enfermedades macroangiopáticas de tipo arterosclerótico que afectan a las arterias que nutren el miocardio, el cerebro y extremidades inferiores, dando como resultado la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la arteriopatía periférica (Tébar y Escobar, 2009; Giacco y Brownlee, 2012).

### **1.2.2. Infecciones en pacientes diabéticos**

Antes de la introducción de la insulina y los antibióticos, el sector salud informaba que las infecciones contribuían significativamente a las muertes asociadas a la diabetes. Se estimaba que las infecciones mataban 1 de cada 5 pacientes en la década de 1920 comparado a 1 de cada 20 a finales de los años 60s. A pesar de los avances recientes en el manejo tanto de la diabetes como de las enfermedades infecciosas, los pacientes diabéticos continúan presentando un alto riesgo de contraer enfermedades infecciosas. Aún cuando el control de la glicemia reduce significativamente las complicaciones de la DMT1 y DMT2, la relación entre la glicemia y las infecciones no se ha esclarecido del todo. Otros factores, incluyendo la atenuación de la respuesta inmunológica y el daño en tejidos en estos pacientes pueden jugar un papel importante (Peleg *et al.*, 2007).

La diabetes está asociada con diversas enfermedades infecciosas, las cuales son más comunes en pacientes con esta enfermedad que en la población restante (Mantzoros *et al.*, 2006). Las infecciones en piel y tejidos blandos ocurren comúnmente en pacientes con diabetes, pueden incluso ser una característica de la enfermedad y a menudo sufren de complicaciones recurrentes. La incidencia en la colonización así como la infección con hongos, principalmente *Candida albicans* es comúnmente observada en pacientes con un control inadecuado de glucosa (Coleman, 2011).

### 1.2.3. Infecciones por *Candida albicans*

*Candida albicans* es un hongo dimórfico y puede exhibir la morfología levaduriforme o micelial (Reiss *et al.*, 2012). Este hongo oportunista es un comensal de las vías gastrointestinales, la mucosa bucal y vaginal, así como de la piel perianal de individuos sanos (Sobel, 2008). La transición del estado de comensalismo a un estado patógeno se ha asociado a los factores de virulencia propios de *C. albicans*: la capacidad de adhesión; la producción de enzimas proteolíticas (proteasas y fosfolipasas), las cuales facilitan la penetración y la degeneración de queratina y colágeno; la transformación morfológica de la levadura en hifa, que favorece la penetración y permite evadir el sistema de defensa, pues la hifa libera mayor cantidad de fosfolipasas y es más resistente a la fagocitosis; los cambios fenotípicos, que permiten al hongo adaptarse a condiciones cambiantes. Otro mecanismo que promueve la elevada incidencia de infecciones en el paciente diabético es el aumento en la adherencia de microorganismo en mucosas y células epiteliales comparado con sujetos sanos (Arenas, 2011).

En los pacientes diabéticos, las alteraciones metabólicas conllevan una mayor concentración de glucosa que favorece la proliferación de la levadura en mucosas. Asimismo, la glucosilación no enzimática de las proteínas por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos propicia las infecciones diseminadas, no es frecuente encontrar este tipo de infecciones a menos que el paciente reciba antibióticos de amplio espectro, inmunosupresores o nutrición parenteral (Guarner y Brandt, 2011). *Candida albicans* promueve cambios en el pH local de la vagina, lo que propicia su desarrollo en este sitio anatómico (Arenas, 2011). Es ampliamente aceptado que otras alteraciones en la diabetes no controlada son la disminución en la capacidad quimiotáctica y fagocítica de los neutrófilos (Marhoffer *et al.*, 1992; Delamaire *et al.*, 1997). Sin embargo, estos trabajos no son contundentes. Cuando *Candida albicans* se torna patógena causa afecciones mucocutáneas tales como: infecciones en la boca (estomatitis, glotitis y quelitis angular), en intertrigos y genitales (balanitis) en los hombres y vaginitis en las mujeres (Bonifaz, 2012).

#### 1.2.4. Respuesta inmunológica innata contra *Candida albicans*: el papel del macrófago

Las células del sistema inmunológico que actúan como primera línea de defensa en la infección por *C. albicans* son las células presentadoras de antígeno profesionales (APC), las cuales incluyen a los monocitos/macrófagos y a las células dendríticas (DCs) y linfocitos B (Miramón *et al.*, 2013). Los macrófagos han sido considerados importantes células efectoras del sistema inmunitario. El término “macrófago” fue usado por primera vez hace más de 100 años por Élie Metchnikoff, para describir a las grandes células fagocíticas mononucleares que observó en tejidos. Los macrófagos son células extraordinariamente versátiles, están presentes en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, donde participan en una abrumadora variedad de procesos biológicos. Sin embargo, como centinelas del sistema inmunológico los macrófagos poseen un amplio repertorio funcional; detectan, fagocitan y destruyen agentes infecciosos, además de participar en la respuesta de los linfocitos T a través de la presentación de antígeno. (Heinsbroek y Gordon, 2007; Morrissette *et al.*, 1999).

Para eliminar patógenos, los macrófagos al igual que otras células del sistema inmunológico, deben ser capaces de distinguir lo propio de lo extraño. El reconocimiento de *Candida albicans* es mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los cuales reconocen moléculas altamente conservadas del microorganismo referidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento de *C. albicans* por los macrófagos es a través de PRRs como el receptor de manosa, los receptores tipo Toll (TLRs) TLR2, TLR4, TLR9, Dectina 2 y el receptor Galectina-3 (Meyer-Wentrup *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2008).

El reconocimiento a través de los PRRs conlleva a la activación del macrófago induciendo en este la fagocitosis, producción de numerosas citocinas, quimiocinas, eicosanoides tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y prostaglandinas, entre otras, las cuales inician y modulan la respuesta inmunitaria inflamatoria (Zipfel *et al.*, 2008).



La fagocitosis es definida como la ingestión de partículas de más de 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los dos principales receptores involucrados en la fagocitosis de *C. albicans* son el receptor de complemento 3 (CR3), también conocido como integrina  $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18, y  $\text{FC}\gamma\text{R}$ . A partir de ambos tipos de receptores se inician cascadas de transducción de señales que conducen a la polimerización de actina bajo la superficie de contacto, que se cree es la fuerza líder para la extensión de membrana alrededor de la partícula (Brown, 2011). Una vez que el microorganismo es fagocitado, el macrófago produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), junto con una amplia variedad de enzimas proteolíticas que contribuyen a la actividad microbicida del macrófago y la eliminación del microorganismo fagocitado (Romani, 2004).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Expresión de los transportadores GLUT en leucocitos

En leucocitos, el incremento de la utilización de glucosa es clave durante la respuesta inmunológica (Pearce *et al.*, 2013). Maratou y colaboradores (2007) realizaron un trabajo cuyo objetivo fue determinar la expresión de los transportadores GLUT1, GLUT3 y GLUT4 en la membrana plasmática de monocitos, linfocitos T, linfocitos B y PMN en estado de reposo, así como activadas con el forbol-12 miristato 13-acetato (PMA) ó el lipopolisacárido (LPS) en ausencia de insulina y a  $25 \text{ mUL}^{-1}$  y  $100 \text{ mUL}^{-1}$  de insulina. Para ello extrajeron sangre a 27 sujetos sanos, aislaron las subpoblaciones de leucocitos y determinaron la expresión de los transportadores de glucosa por citometría de flujo. Los resultados de este estudio revelan que en las células en reposo, no se modifica la expresión del transportador GLUT1 en función de la concentración de insulina en ninguna de las poblaciones de estudio. Sin embargo, la expresión de GLUT3 y GLUT4 aumenta en relación con la insulina de forma dosis dependiente en el caso de los monocitos y linfocitos B; la expresión de estos dos transportadores se mantuvo prácticamente constante para los linfocitos T. En el caso de los PMN la expresión de GLUT4 se incrementó en función de la concentración de insulina, mientras que la expresión de GLUT3 no reveló cambios significativos. Posterior a la activación de los monocitos con LPS y a la estimulación de los PMN, linfocitos T y linfocitos B con PMA, se observó un aumento significativo en la expresión de los transportadores GLUT1, GLUT3 y GLUT4 comparado con los respectivos controles (células no estimuladas para cada población) en todos los casos.

En otro estudio, Fu y colaboradores (2004) estudiaron la expresión de RNA mensajero de los transportadores GLUT1, GLUT3 y GLUT5 en linfocitos, monocitos y macrófagos THP-1 humanos a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) y Western blot. Los linfocitos expresaron las proteínas GLUT1 y GLUT3, los niveles de ambas isoformas aumentaron de 3.5 a 6 veces seguido de la activación de estas células con fitohemaglutinina (PHA). Los monocitos expresaron 8.4 veces más la proteína GLUT3 y la expresión de GLUT1 fue 88% menor respecto a lo observado en linfocitos. La activación *in vitro* de los monocitos con LPS resultó en un incremento en la expresión a nivel de proteína

de GLUT1. Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de GLUT3 tanto en las células activadas como en las células no estimuladas. La diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos con PMA, se asoció a una disminución en la expresión de GLUT1 y una marcada inducción en la expresión de GLUT3 y GLUT 5 a nivel de proteína. En este artículo se propuso que la alta expresión de GLUT 1 y GLUT3 puede proveer de combustible a la células del sistema inmunológico, los altos niveles del transportador de alta afinidad GLUT3 puede permitirle a la células competir con el patógeno por las hexosas, aún en concentraciones bajas de las mismas.

Cabe mencionar que ambos trabajos emplean estímulos sintéticos, un estudio en el que se evalué la expresión de los transportadores GLUT en macrófagos infectados con un microorganismo vivo y que relacione la expresión de los transportadores GLUT con el consumo de glucosa cobraría mayor relevancia.

## **2.2. Efecto de la insulina en células del sistema inmunológico innato**

La insulina ha sido considerada como una hormona clave en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que tiene efectos biológicos en la función de leucocitos, células endoteliales y plaquetas (Dandona *et al.*, 2006). Las funciones biológicas de la señalización de la insulina en los macrófagos involucra la supervivencia, síntesis proteica, secreción de citocinas y fagocitosis. La mayor parte de las moléculas de señalización de insulina son expresados en estas células (Liang *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se ha demostrado que la insulina suprime tres importantes mediadores inflamatorios como la molécula de adhesión celular-1(ICAM-1), factor nuclear kappa B (NFκB) y la expresión de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) en células endoteliales humanas *in vitro* (Dandona *et al.*, 2006).

En un estudio con pacientes sépticos, se observó que la insulina disminuye la incidencia de sepsis y la tasa de mortalidad de pacientes críticos. En ratas traumatizadas y con endotoxemia, la insulina atenúa la respuesta inflamatoria al disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias. En el estudio de Leffler y colaboradores (2007), se determinó que

la insulina disminuye los marcadores pro-inflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de forma dosis-dependiente en las células THP-1 estimuladas con LPS, ejerciendo un efecto anti-inflamatorio (Deng *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha descrito que en la respuesta inmunitaria frente *C. albicans* y diferentes hongos es una respuesta tipo Th1, caracterizada por la producción de TNF- $\alpha$ , Interleucina-12 (IL-12), interferón gama (IFN- $\gamma$ ) y factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF), esta respuesta se vincula con la resistencia a la infección. Al suprimir o modificar el perfil de citocinas secretadas por las APCs puede haber una mayor susceptibilidad a las infecciones fúngicas (Romani, 2000).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de que existe evidencia de que los individuos con diabetes mellitus son más susceptibles a enfermedades infecciosas, que la DM es una importante causa de los cambios en los niveles séricos de insulina y que se ha informado que esta hormona afecta la función de las células del sistema inmunológico. Hasta el momento, no se ha determinado el efecto de la concentración de insulina en la captación de la glucosa y la expresión de los transportadores GLUT en macrófagos humanos infectados.

### **4. HIPÓTESIS**

Los macrófagos infectados con *Candida albicans* aumentarán la expresión de los transportadores GLUT, así como el consumo de glucosa a una concentración fisiológica de insulina en relación con los macrófagos no infectados y este efecto se revertirá al emplear una concentración elevada de insulina.

### **5. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la concentración fisiológica y elevada de insulina en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT y el consumo de glucosa en los macrófagos THP-1 en condiciones basales y de infección.

#### **Objetivos particulares**

1. Optimizar la diferenciación de los monocitos de la línea celular THP-1 a macrófagos.
2. Evaluar la influencia de la insulina a concentración fisiológica y elevada en la expresión de los receptores GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT5 en macrófagos THP-1 en condiciones basales y de infección.
3. Evaluar la influencia de la insulina a concentración fisiológica y elevada en el consumo de glucosa por los macrófagos THP-1 en condiciones basales y de infección.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Línea celular THP-1**

La línea celular THP-1 es de origen humano, obtenida de un infante masculino de un año de edad con leucemia monocítica aguda. Son monocitos en suspensión, que expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterasa. Para el cultivo de las células THP-1 se empleó el medio RPMI-1640 liofilizado (GIBCO, Carlsbad) preparado con agua mili-Q y enriquecido con L-Glutamina, piruvato de sodio (concentración final 1mM), bicarbonato de sodio al 7.5%, antibióticos/antimicóticos y 10% de suero fetal bovino (SFB), filtrado a través de una membrana de 0.22 micrómetros. La línea celular se incubó en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C. Las células se mantuvieron con una confluencia de aproximadamente 8X10<sup>5</sup> células/mL a través de la adición de medio fresco o el remplazo del mismo cada 2 o 3 días.

### **6.2. Maduración de los monocitos THP-1 a macrófagos y determinación de CD14 posterior a la maduración.**

El trabajo de Park y colaboradores (2006) fue tomado como referencia, aunque se realizaron algunas modificaciones para realizar el proceso de maduración. 1X10<sup>6</sup> células THP-1 se diferenciaron a macrófagos con diferentes concentraciones de PMA (5, 10, 15 y 25 ng/mL) en una placa de 24 pozos (Corning, Lowell) con un volumen final de 1 mL de medio RPMI-1640 durante 48 horas. Finalizado este tiempo, se centrifugó la placa a 385 g durante 5 minutos. Se agregó 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado a cada pozo y las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h.

Una vez terminado el proceso de maduración, las células THP-1 se incubaron con 200 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM estéril a 37°C por 10 minutos con el objetivo de despegar la monocapa. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon con 2.5 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) y se centrifugaron a 385 g durante 5 minutos a 20°C. Para comprobar su madurez se analizó su morfología y expresión de CD14, como a continuación se indica.

Una vez que las células THP-1 se diferenciaron, se procedió a realizar la tinción con el anticuerpo CD14-PE. Para ello, se tiñeron  $1 \times 10^6$  células con 5  $\mu\text{L}$  del anticuerpo para cada una de las concentraciones de PMA, además de un grupo control de células sin madurar. Como control de autofluorescencia (CAF), se emplearon células estimuladas con la concentración de PMA correspondiente sin teñir. Las células se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos en oscuridad, este procedimiento será referido como condiciones de tinción en el resto del escrito. Se realizaron 2 lavados con PBS a 1539 g durante 2 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . Finalmente las células se fijaron con 400  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído (PFA) al 1% y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su adquisición en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y posterior análisis en el programa Summit (Dako Colorado, Inc. Versión 4.3).

### **6.2.1. Determinación de la viabilidad y porcentaje de adhesión**

Una vez terminado el proceso de maduración, las células THP-1 se incubaron con 200  $\mu\text{L}$  de EDTA 2 mM estéril a  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos con el objetivo de despegar la monocapa. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon con 2.5 mL de PBS y se centrifugaron a 385 g durante 5 minutos a  $20^\circ\text{C}$ . Finalmente, las células se contaron por exclusión con azul tripano para determinar la viabilidad celular.

Por otra parte, se recolectaron los sobrenadantes en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, para determinar el número de células no adheridas por exclusión con azul tripano. Por otro lado, las células adheridas se incubaron con EDTA para despegar la monocapa como ya se mencionó. Las células se lavaron con PBS y por último, se realizó el conteo por exclusión con azul tripano para determinar el porcentaje de células adheridas.

### **6.3. Titulación de los anticuerpos anti-GLUT**

A partir de un cultivo de macrófagos maduros en placa de 24 pozos, y una vez pasado el tiempo de 48 h de reposo, se cosecharon las células y se transfirieron a tubos para citometría de flujo, se lavaron con 2 mL de PBS y después del lavado se tiñeron con los anticuerpos GLUT1-APC, GLUT2- PE, GLUT3-Biotinilado, GLUT4- FITC y GLUT5-Biotinilado (Todos los anticuerpos son marca R&D systems, Mineapolis; excepto GLUT4 que es ABCAM,

Monterrey) con tres concentraciones diferentes: 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 0.25  $\mu\text{g/mL}$  en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Posterior a la adición de los anticuerpos, se dio vórtex y las células se incubaron en las condiciones de tinción antes descritas. Terminada la incubación, se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS. Debido a que los anticuerpos GLUT3 y GLUT5 estaban biotinilados, a los tubos teñidos con los GLUT3 y GLUT5 se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-PerCP y 1  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-PE, respectivamente. Las células se incubaron en las condiciones de tinción. Se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1X a 1539 g durante 2 minutos a 20°C. Como controles de citometría se realizó un CAF y un control de isotipo (CI). Por último, las células se fijaron con 250  $\mu\text{L}$  de PFA al 1%. Las muestras se guardaron en refrigeración hasta el momento de su adquisición en el citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron en el programa Summit.

#### **6.4 Tinción para citometría de flujo de los transportadores GLUT en las células THP-1 maduras.**

A partir de un cultivo de macrófagos maduros en placa de 24 pozos, y una vez pasado el tiempo de 48 h de reposo, las células se cosecharon, se lavaron, se transfirieron a tubos para citometría de flujo y finalmente, se tiñeron con los anticuerpos GLUT a la concentración establecida en la titulación. El procedimiento de tinción, lavado y fijado ya se describió en la sección anterior.

#### **6.5 Cultivo de macrófagos THP-1 a diferentes concentraciones de insulina.**

Una vez terminados la diferenciación y el período de descanso las células THP-1, se cambió el medio por 1 mL de RPMI-1640 sin suero fetal bovino y sin antibióticos 12 h antes de la tinción, las células se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se preparó un stock de insulina a partir de una ampolla inyectable (Pisa México, D.F.) con una concentración de 100 UI/mL, se hicieron dos diluciones seriadas 1:100 en medio RPMI-1640 sin suero ni antibióticos. Finalmente se añadió 1  $\mu\text{L}$  de dicho stock a cada pozo para obtener la concentración fisiológica de insulina que corresponde a 10  $\mu\text{UI/mL}$  y otro grupo se trabajó a una concentración de 45  $\mu\text{UI/mL}$  que representa la concentración elevada de insulina, las células se incubaron con insulina durante una hora. Se tomó como referencia el trabajo de Koshy y colaboradores (2010) para realizar esta metodología. Al término de la incubación, se



procedió a hacer la tinción de las células con los diferentes GLUT de estudio como se menciona en la sección 6.4.

### **6.6 Infección de macrófagos THP-1 con *Candida albicans***

Un día antes del experimento de infección, se tomó una colonia de *C. albicans* y se sembró en 25 mL de caldo Saboraud dextrosa, este cultivo se incubó a 30°C durante 12 h. Una vez terminado el periodo de incubación, la suspensión de *Candida albicans* se centrifugó a 1341 g durante 10 minutos a 20°C, se decantó el caldo Saboraud dextrosa. Finalmente se realizó un lavado con PBS con las condiciones ya mencionadas y se resuspendió el botón en 1 mL de PBS. Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 con azul tripano y se contaron las blastoconidias en la cámara de Neubauer. Por otra parte, se preparó un cultivo de macrófagos maduros y una vez terminado el tiempo de reposo, se le adicionó al cultivo la concentración correspondiente de insulina (sin insulina, normal o elevada) durante 1 h antes de realizar la infección. Se procedió a realizar la infección con un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 10 es decir  $10 \times 10^6$  blastoconidias por  $1 \times 10^6$  macrófagos. Es importante mencionar que para cada uno de los grupos de insulina había dos grupos de macrófagos: infectados y no infectados. Las células se incubaron con la levadura durante 4 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (Tavanti *et al.*, 2006).

Transcurrido el tiempo de incubación, las células se despegaron agregando 200 µL de EDTA 2 mM como se mencionó anteriormente. El millón de células de cada pozo se dividió en tres tubos de citometría: el primero se utilizó como CAF, otro en el que las células se tiñeron con GLUT1, GLUT3 y GLUT4 y el último en el que se tiñó GLUT5. Después de decantar, se realizó un lavado con 2 mL de PBS y se procedió a realizar la tinción. Por último, las células se fijaron con PFA al 1%, se adquirieron en el citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron en el software Summit.

### **6.7 Ensayo de incorporación del análogo fluorescente de glucosa 6-NBDG**

El reactivo 6-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazol-4-il) amino)-desoxiglucosa (6-NBDG; Life Technologies, Carlsbad) se reconstituyó en 1 mL de agua destilada estéril, se almacenó a 4°C protegido de la luz hasta el momento de su uso. Para este experimento, se llevó a cabo

la metodología establecida en el trabajo de Dimitriadis y colaboradores (2005) con algunas modificaciones. Brevemente,  $2.4 \times 10^7$  de células THP-1 se maduraron, para tener los seis grupos de trabajo:

1. Sin insulina/ sin infectar
2. Sin insulina/ infectado
3. Insulina fisiológica/ sin infectar
4. Insulina fisiológica/ infectado
5. Insulina alta/ sin infectar
6. Insulina alta/ infectado.

Las células se trataron 12 h antes del experimento como en ensayos anteriores. Al cabo de la incubación, las células se despegaron y se cosecharon en tubos para citometría estériles, se realizaron 2 lavados con PBS. El botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 sin suero ni antibióticos. Inmediatamente después se adicionó la concentración de insulina correspondiente y se realizó la infección con 10 millones de blastoconidias de *C. albicans* y únicamente insulina para los grupos de condiciones basales. Las células se incubaron a 37°C en baño María previo a la adición del 6-NBDG y su adquisición en el citómetro de flujo FACSdiva (Becton Dickinson). El monitoreo del análogo de la glucosa fluorescente se realizó a los 20, 40 y 60 minutos. Segundos antes de los tiempos mencionados, se agregaron 2  $\mu$ L del reactivo 6-NBDG a cada tubo para tener una concentración final de 30  $\mu$ M, las células se agitaron y la medición se realizó durante 5 minutos

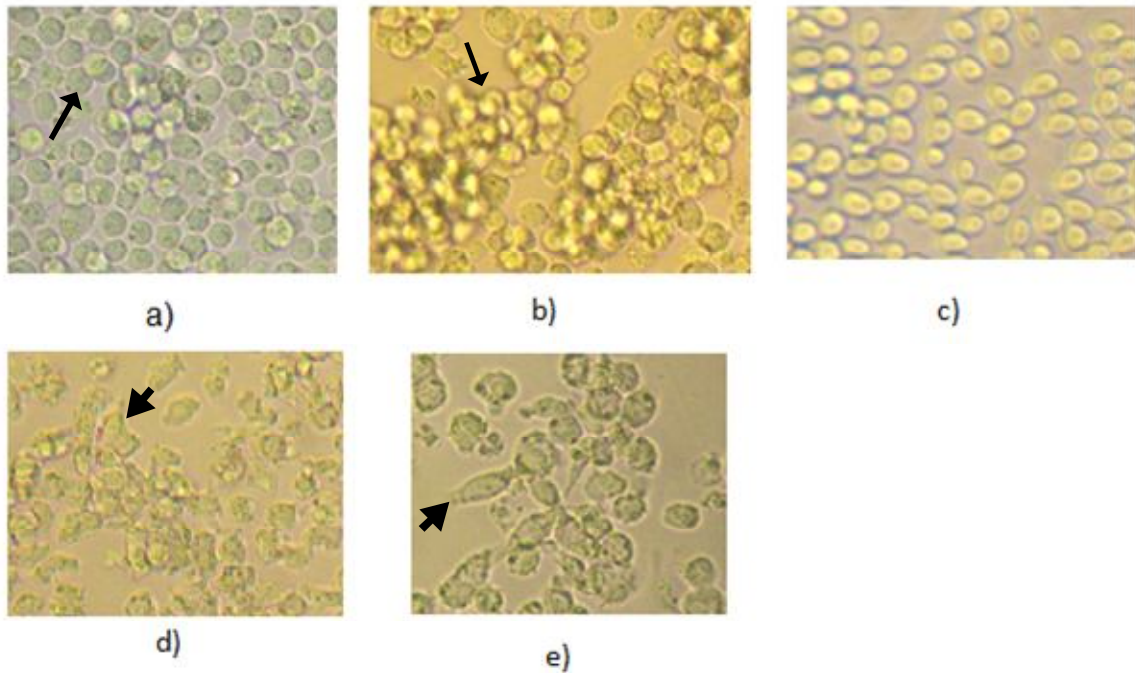
## 6.8 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  error estándar de la media. El análisis estadístico se llevó a cabo en el software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego) en el cual se compararon las medias a través de una prueba de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple de Dunns. Los valores  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS

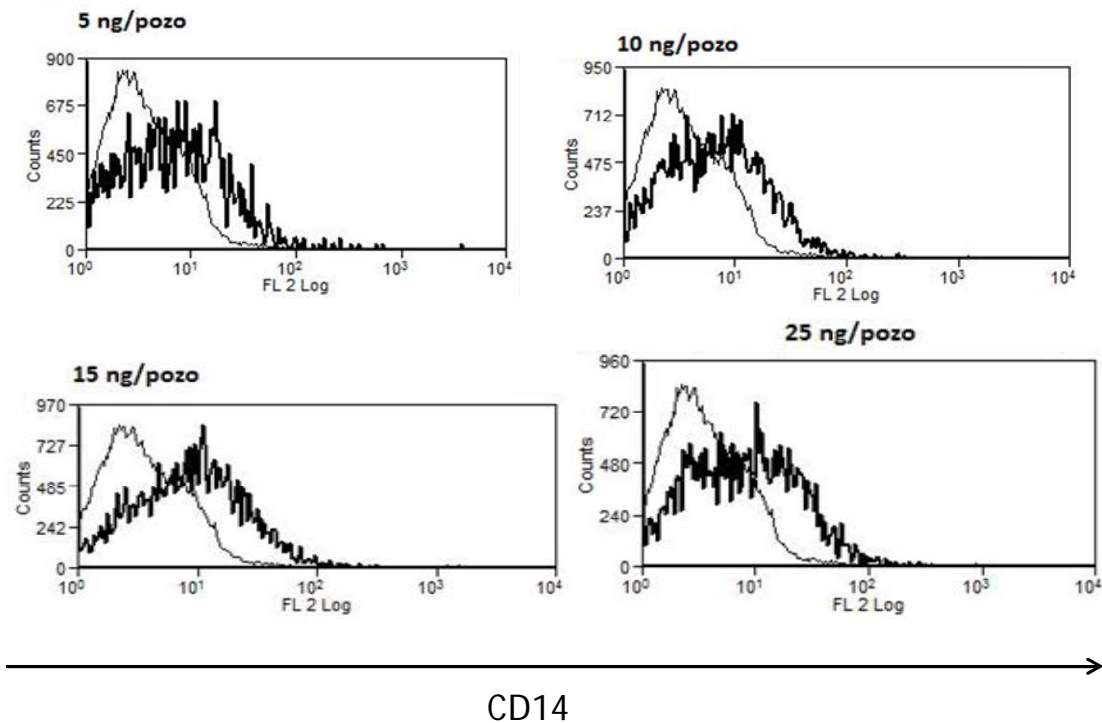
### 7.1. Maduración de los monocitos THP-1 a macrófagos y determinación de la expresión de CD14

Las células THP-1 presentan un cambio morfológico después de ser estimuladas con PMA *in vitro* por 48 h, los cultivos se examinaron en un microscopio de transmisión de luz invertido. Como se puede observar en la Figura 4, las células sin estimular conservan su morfología redonda además de presentarse como un cultivo en suspensión (a). Conforme se incrementa la concentración de PMA empleada en el cultivo, las células THP-1 aumentan su capacidad de adherirse y presentan una morfología ligeramente alargada (b-e).



**Figura 4. Células THP-1 estimuladas con diferentes concentraciones de PMA.** Se muestran cambios morfológicos de las células THP-1 después de cultivarlas en presencia de PMA a diferentes concentraciones por 48 horas. a) Células sin estimular, b) 5 ng/mL, c) 10 ng/mL, d) 15 ng/mL y e) 25 ng/mL El aumento al que fueron tomadas las fotografías fue de 200. Células redondas en suspensión (↑), células alargadas y adheridas (↕). Imágenes representativas de un experimento realizado por duplicado.

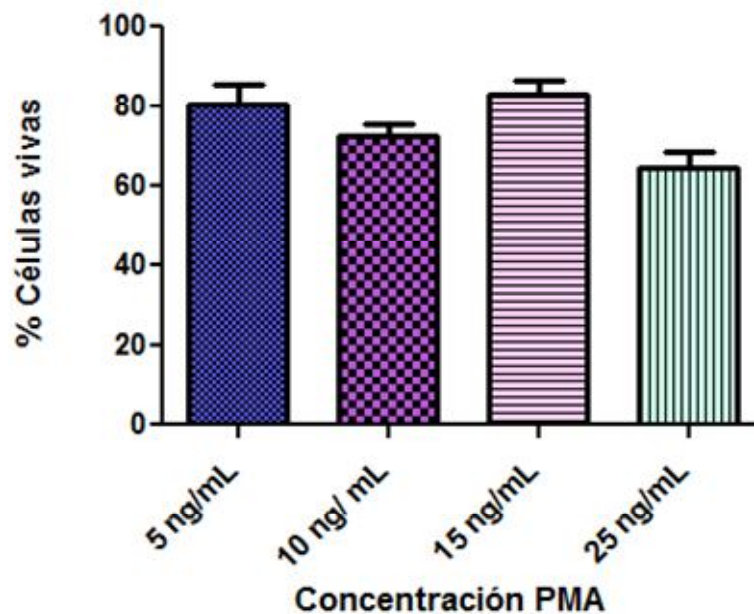
En este experimento se determinó el marcador de superficie específico de macrófagos, CD14. Este marcador lo expresa la línea celular THP-1 a diferentes niveles cuando ya se encuentra madura. Los resultados revelan un aumento dosis-dependiente en la expresión de este marcador después de la estimulación con las diferentes concentraciones de PMA (Figura 5).



**Figura 5. Efecto de la concentración de PMA en la expresión de CD14 en las células THP-1 diferenciadas a macrófagos.** Las células no maduras y las células maduras con diferentes concentraciones de PMA se tiñeron con el anticuerpo anti CD14. La línea delgada representa a las células no maduras, mientras que la línea gruesa las células maduras con la concentración de PMA correspondiente. Mediana de intensidad de fluorescencia (MIF), NM (No maduras), M (maduras). Imagen representativa de un experimento realizado por duplicado. En este experimento se adquirieron 50,000 eventos.

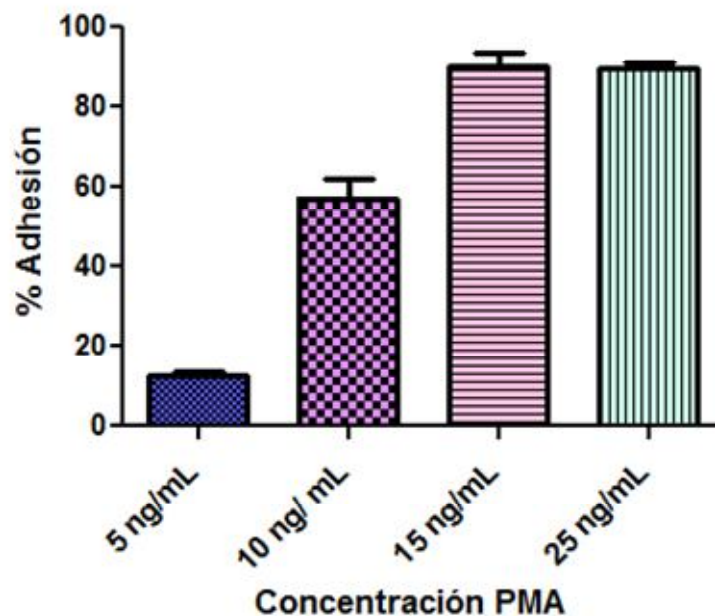
## 7.2. Determinación de la viabilidad y porcentaje de adhesión de las células THP-1 posterior a la maduración

El porcentaje de células vivas para cada una de las concentraciones de PMA probadas se presenta en la Figura 6. A las concentraciones de 5, 10 y 15 ng/mL se observó un 80% de viabilidad. Sin embargo, los pozos estimulados con 25 ng/mL de PMA revelaron una disminución en el porcentaje de células vivas, siendo este de 64.7%.



**Figura 6. Porcentaje de células vivas.** Una vez terminado el proceso de maduración, se despegó la monocapa de las células THP-1 diferenciadas y se determinó la viabilidad por exclusión con azul tripano. Los datos representan el promedio y desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.

Se observó que la capacidad de adhesión de las células THP-1 en relación con la concentración de PMA fue dosis dependiente. A una concentración de 5 ng/mL el porcentaje de adhesión fue de apenas 12.5%, a 10 ng/mL fue de 57.2%, mientras que con las concentraciones de 15 y 25 ng/mL se obtuvieron los mejores resultados: 90 y 89%, respectivamente, (Figura 7). En base a los resultados obtenidos de viabilidad, adhesión y expresión de CD14, se determinó que la concentración óptima de PMA para emplear en experimentos posteriores fue de 15 ng/mL.



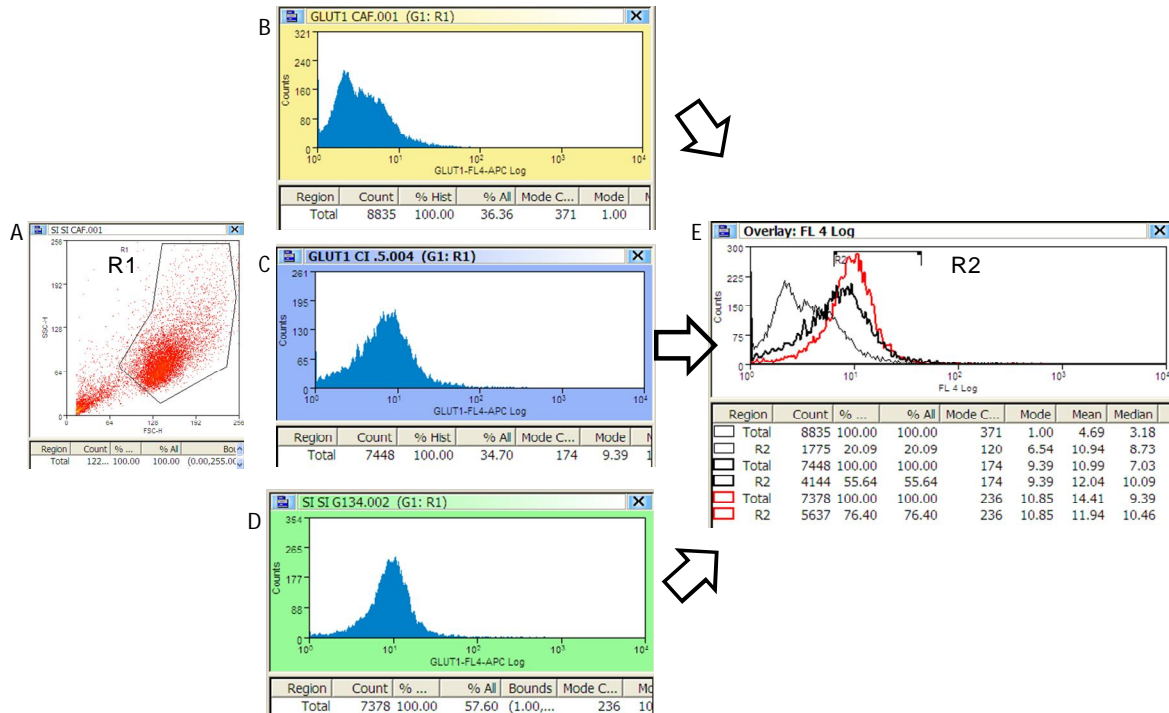
**Figura 7. Porcentaje de adhesión.** Después de la incubación, se tomó el sobrenadante y se determinó el número de células no adheridas. Las células adheridas se despegaron con EDTA, se realizó la cuenta por exclusión con azul tripano de estas células. El porcentaje de adhesión se determinó multiplicando las células adheridas por cien entre el número de células totales. Los datos representan el promedio y desviación estándar de un experimento realizado por duplicado.

### **7.3. Titulación de los anticuerpos GLUT**

Se determinó que las concentraciones ideales de trabajo eran: 0.25  $\mu\text{g/mL}$  de anticuerpo para GLUT1, mientras que para el resto de los transportadores GLUT la concentración fue de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de los anticuerpos correspondientes (resultados no presentados). Estas fueron las concentraciones empleadas en todos los experimentos realizados.

### **7.4. Expresión basal de los transportadores GLUT en las células THP-1 en ausencia de insulina**

El procedimiento general de la determinación de la expresión de los receptores GLUT por citometría de flujo se presenta en la Figura 8. La muestra del CAF se utilizó para la identificación de la población de estudio, esta se delimitó excluyendo los agregados y detritos celulares y se identificó como R1 (Figura 8 A). También con esta muestra se ajustó el umbral y la autofluorescencia en los canales FL-1, FL-2, FL-3 y FL-4 en el citómetro de flujo (Figura 8 B). Posteriormente con las muestras teñidas con el Control de isotipo (CI) se analizaron las células de la R1 y se consideró la unión inespecífica, realizando un reajuste de los voltajes, en caso de ser necesario (Figura 8 C). Finalmente, se adquirieron las muestras teñidas con los diferentes GLUT (Figura 8 D). En la Figura 8 E se presenta la superposición de los histogramas del CAF, CI y células teñidas. La R2 representa el porcentaje de las células positivas para cada uno de los GLUT estudiado.

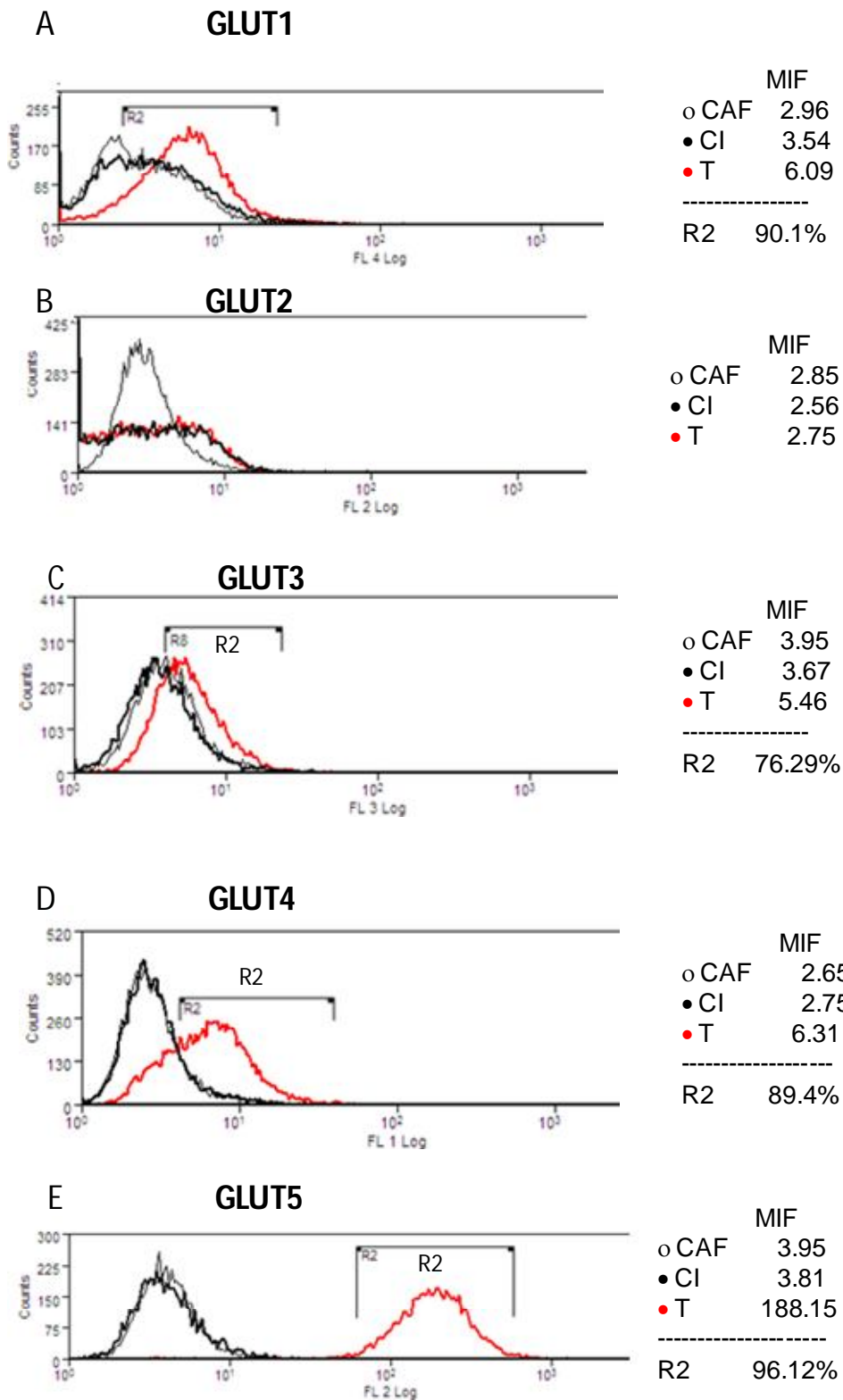


**Figura 8. Estrategia de análisis.** Las células THP-1 diferenciadas a macrófagos fueron teñidas con los CI y anticuerpos anti-GLUT correspondientes conforme se indica en materiales y métodos. Diagrama de puntos del control de autofluorescencia (CAF) tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) (A), histogramas provenientes de la región R1 del CAF (B), histogramas provenientes de la región R1 del CI (C), células THP-1 teñidas con el anticuerpo anti-GLUT (D), gráfico de la superposición de B, C y D (E). En el panel E, CAF (○; línea negra delgada), CI (●; línea negra gruesa) y células teñidas con el anticuerpo anti-GLUT correspondiente (●; línea roja gruesa). Para el análisis se adquirieron 10,000 eventos.

La imagen representativa del patrón de expresión de receptores GLUT-1, 2, 3, 4 y 5 en macrófagos THP-1 en ausencia de insulina se presenta en la Figura 9. Se encontró que los macrófagos THP-1 expresan los transportadores GLUT1, GLUT3, GLUT5 y GLUT4 aún en ausencia de insulina.

En el caso de GLUT2 la intensidad de fluorescencia del CI y las células teñidas con el anticuerpo anti-GLUT2 son muy similares, por tal motivo, se concluye que no hay expresión de este transportador y por tanto se descartó la evaluación de GLUT2 en experimentos posteriores.

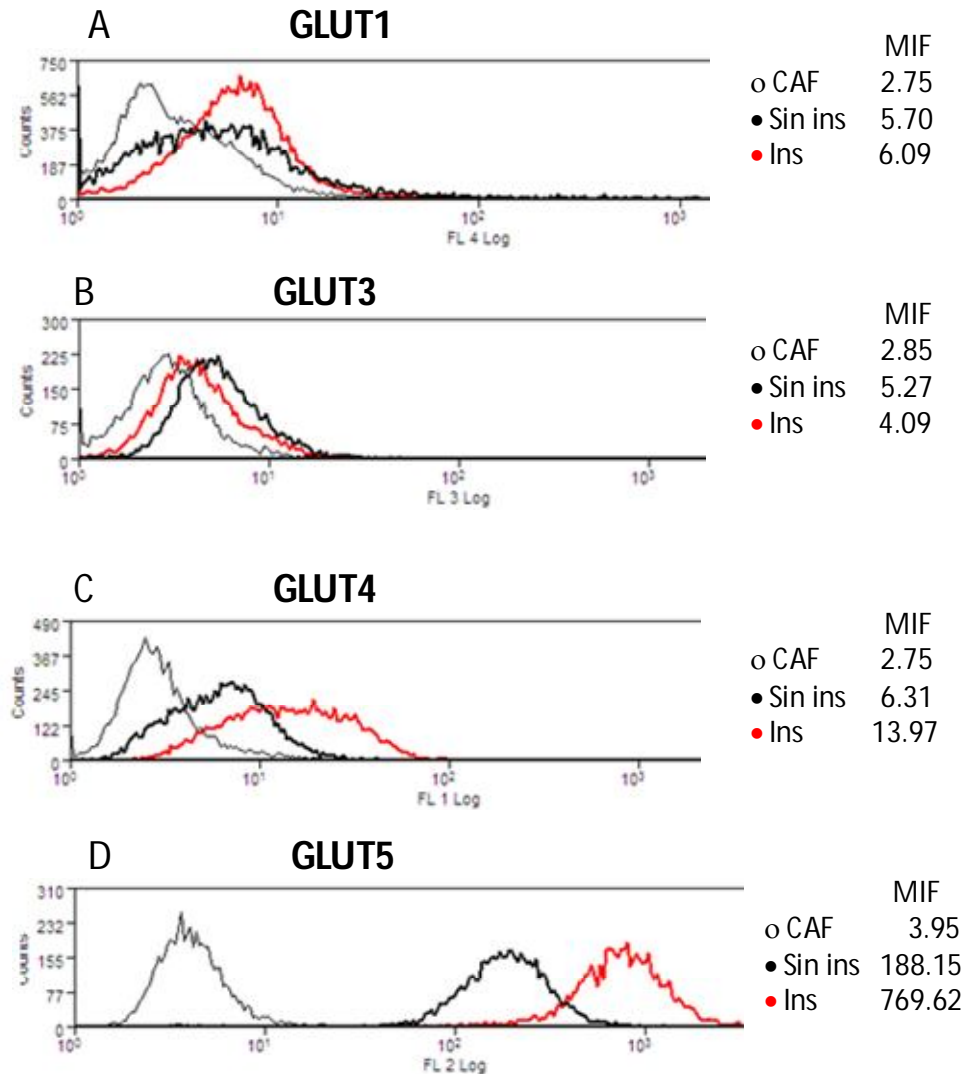




**Figura 9. Expresión basal de los transportadores GLUT en las células THP1 maduras en ausencia de insulina.** Paneles (A-E): Traslapo de los histogramas del CAF (○; línea negra delgada), CI (●; línea negra gruesa) y las células teñidas con el anticuerpo anti-GLUT correspondiente (●; línea roja gruesa). A GLUT1, B GLUT2, C GLUT3, D GLUT4 y E GLUT5. Mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), células teñidas (T), R2 representa la región positiva para las teñidas con los anti-GLUT. Para el análisis se adquirieron 10,000 eventos. Imagen representativa de 3 experimentos realizados de forma independiente.

## 7.5. Expresión de los transportadores GLUT en presencia de insulina a concentración fisiológica

La insulina aumenta la expresión de los transportadores GLUT4 y GLUT5, no induce cambios significativos en el caso de GLUT1, mientras que se la expresión de GLUT3 es menor al aumento que se esperaba en presencia de la insulina, (Figura10).



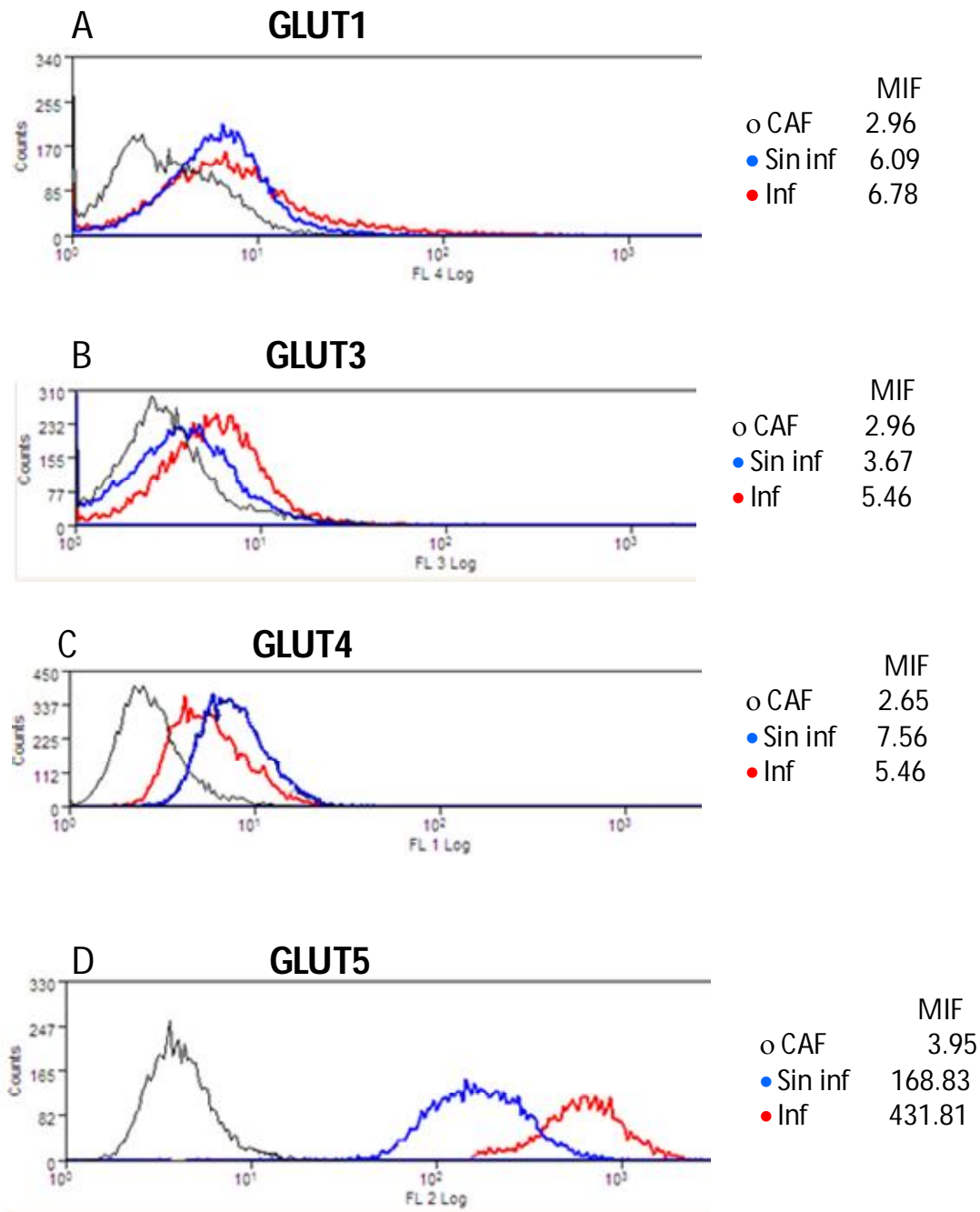
**Figura 10. Efecto de la insulina a concentración fisiológica en la expresión de los transportadores GLUT.** Paneles (A-D): Traslape de los histogramas de el CAF (○; línea negra delgada), células THP-1 teñidas con el anticuerpo correspondiente en ausencia de insulina (●; línea negra gruesa) y células THP-1 incubadas con 10  $\mu$ UI/mL de insulina (●; línea roja gruesa). A GLUT1, B GLUT3, C GLUT4 y D GLUT5. MIF (mediana de la intensidad de fluorescencia), Insulina (ins). Se adquirieron 10,000 eventos para el análisis. Imagen representativa de 3 experimentos realizados de forma independiente.

## **7.6. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración fisiológica de insulina**

A partir de los cultivos de las células THP-1 incubadas con insulina a concentración fisiológica sin infectar e infectados con una MOI de 10 de *Candida albicans*, se tiñeron las células con cada uno de los GLUTs de estudio.

Se encontró que las células infectadas con *C. albicans* aumenta la expresión de GLUT3 y GLUT5 respecto a las células no infectadas. Mientras que hay una disminución en la expresión de GLUT4 comparada con las células no infectadas, finalmente no se observan cambios en la expresión del transportador GLUT1 en las células infectadas y no infectadas, (Figura 11).

El tratamiento estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de Dunns, concluye que no hay diferencias significativas entre las células infectadas y no infectadas para cada uno de los transportadores GLUT de estudio. Sin embargo, puede observarse que la tendencia indica que GLUT3 y GLUT5 son los transportadores que aumenta en mayor medida su expresión ante la infección con *Candida albicans* comparado con el resto de los transportadores de glucosa bajo condiciones de insulina a concentración fisiológica.



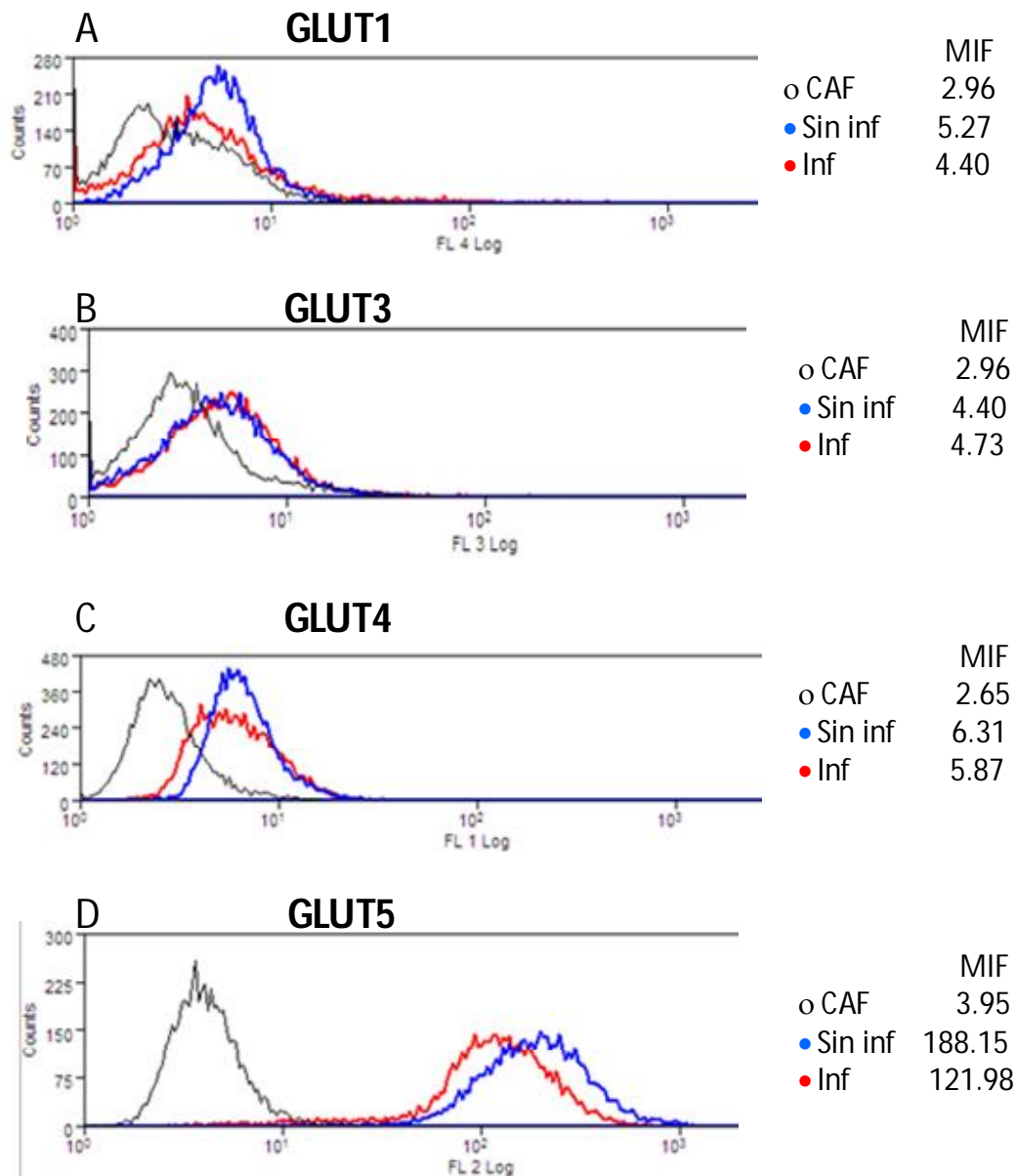
**Figura 11. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración fisiológica de insulina.** Paneles (A-D): Traslape de los histogramas de las células THP-1 teñidas con el anticuerpo correspondiente en presencia de insulina a concentración fisiológica. CAF (○; línea negra delgada), macrófagos THP-1 no infectados (●; línea azul), macrófagos infectados con *C. albicans* (●; línea roja). A GLUT1, B GLUT3, C GLUT4 y D GLUT5; Mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), Inf (infectado). Se adquirieron 10,000 eventos para el análisis. Esta imagen es representativa de tres experimentos independientes.

### **7.7. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración alta de insulina**

Las células THP-1 maduras se incubaron durante 1 h con 45  $\mu$ UI/mL de insulina, luego se procedió a realizar la infección con *C. albicans*, las células se incubaron por 4 h, posteriormente se cosecharon, se tiñeron con los anticuerpos anti-GLUT correspondientes y se adquirieron en el citómetro de flujo.

La expresión de los transportadores GLUT1, GLUT4 y GLUT5 disminuyó en el grupo de las células infectadas, mientras que en el caso de GLUT3, no hay cambios en la expresión de este transportador en las células sin infectar e infectadas (Figura 12). Adicionalmente, resulta interesante que la expresión del transportador GLUT5 es menor cuando las células THP-1 son incubadas con 45  $\mu$ UI/mL de insulina comparada con los resultados del experimento anterior (Figura 11).

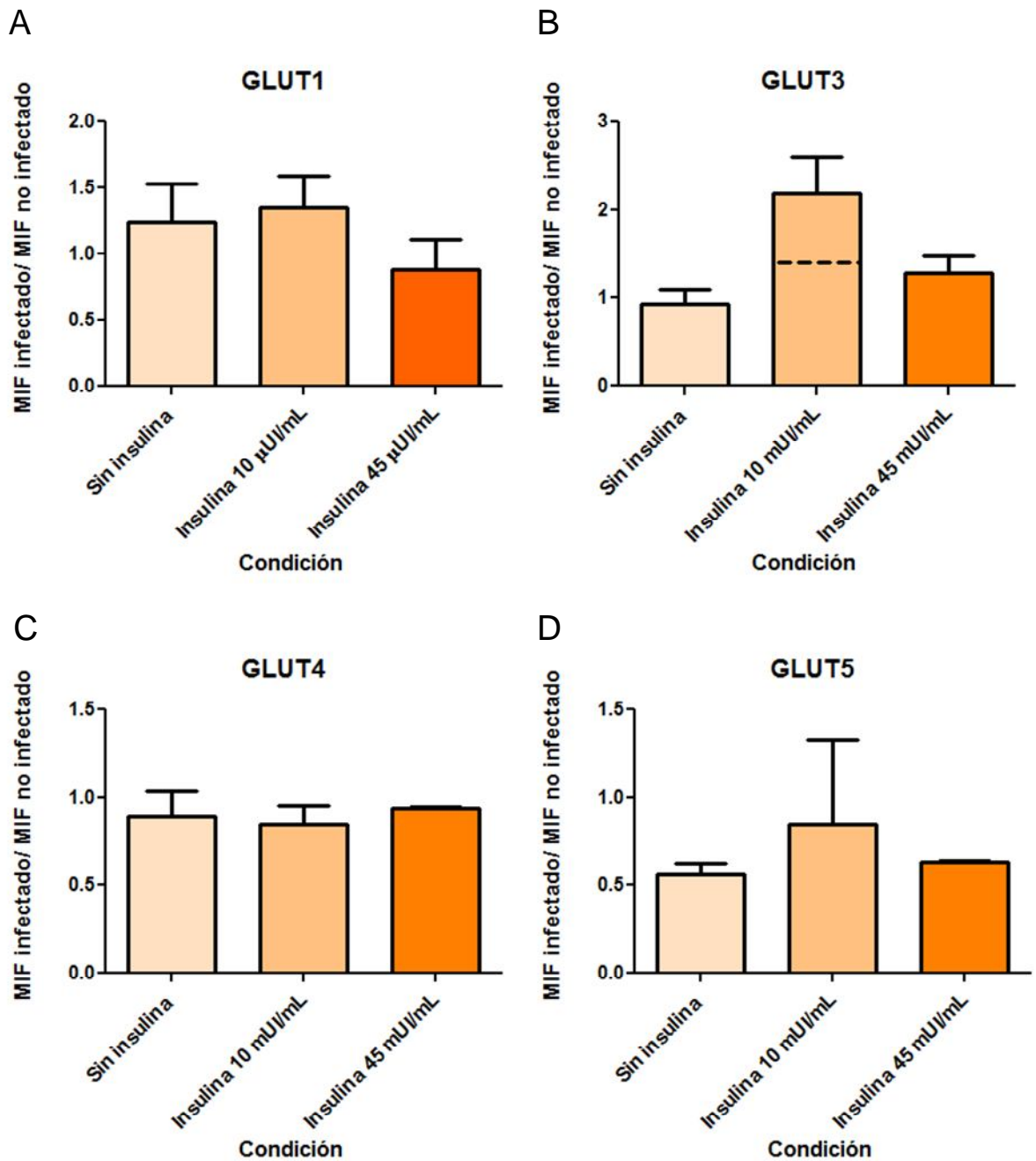
La prueba estadística Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunns concluye que no hay diferencias estadísticamente significativas para los cuatro GLUT de estudio en los grupos sin infectar e infectados.



**Figura 12. Efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a una concentración alta de insulina.** Paneles (A-D): Traslapo de los histogramas de las células THP-1 teñidas con el anticuerpo correspondiente en presencia de 45  $\mu$ UI/mL de insulina. CAF (o; línea negra delgada), macrófagos THP-1 no infectados (•; línea azul), macrófagos infectados con *C. albicans* (•; línea roja). A GLUT1, B GLUT3, C GLUT4 y D GLUT5; Mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), Inf (infectado). Se adquirieron 10,000 eventos para el análisis. Esta imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Con el fin de representar el cambio en la expresión de los transportadores GLUT de estudio en función de la infección, en la figura 13 se presenta el cociente de la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) de las células infectadas entre la MIF de las células no infectadas para cada uno de los tres grupos de estudio: en ausencia de insulina, 10  $\mu\text{UI/mL}$  y 45  $\mu\text{UI/mL}$  de insulina. La línea punteada en la figura representa un aumento mayor a 1.5 en la expresión del transportador en el grupo infectado respecto al no infectado.

A pesar que el resultado de la prueba estadística concluye que no hay diferencias significativas en la expresión de los transportadores GLUT en las células infectadas y no infectadas en los tres grupos de estudio, esta figura muestra que la expresión de GLUT3 en las células THP-1 infectadas e incubadas con insulina a concentración fisiológica aumenta su expresión al doble respecto a las células no infectadas, y que esta expresión es mayor respecto a los grupos sin insulina e insulina a concentración alta (Figura 13). El GLUT5 presenta un comportamiento semejante al de GLUT3. Mientras que la expresión del resto de los transportadores GLUT se mantiene muy similar bajo las tres condiciones de estudio.



**Figura 13. Expresión de los transportadores GLUT en relación a la infección a concentración fisiológica y elevada de insulina.** (A) GLUT1, (B) GLUT3, (C) GLUT4 y (D) GLUT5. La línea punteada (- -) representa un aumento mayor a 1.5 en la expresión del transportador en el grupo infectado respecto al no infectado. La prueba Kruskal Wallis concluye que no hay diferencias significativas en los grupos de estudio en ninguno de los transportadores GLUT. Los datos representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

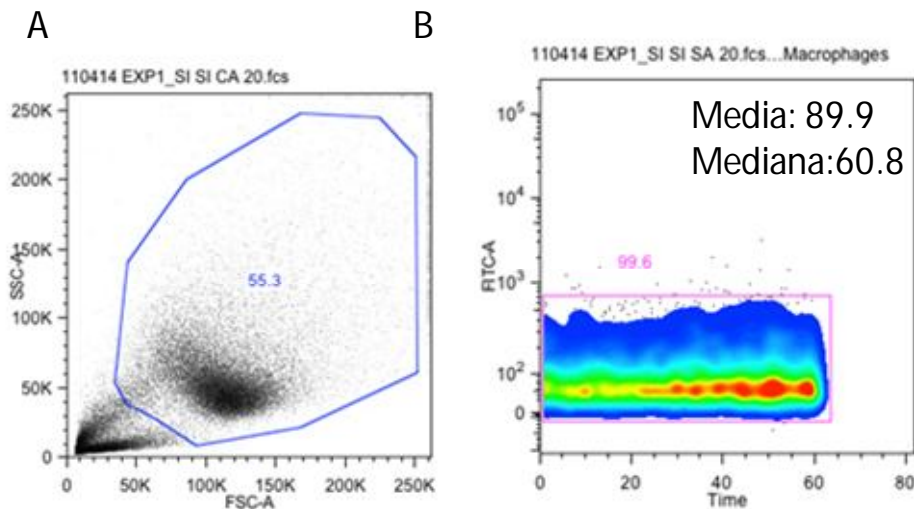


## 7.8. Incorporación del análogo de glucosa 6-NBDG

Una vez que se conoció que los transportadores GLUT3 y GLUT5 aumentan su expresión por efecto de la infección, se procedió a determinar el efecto de la concentración de insulina y la infección en el consumo de glucosa en las células THP-1.

Para cumplir este objetivo, a partir de un cultivo de células THP-1 diferenciadas a macrófagos y tratadas 12 horas antes del experimento, fueron cosechadas y se pasaron a tubos para citometría estériles, se trabajaron con los seis grupos indicados anteriormente. A partir del momento en que se hizo la infección con 10 millones de blastoconidias de *C. albicans* y se agregó la concentración de insulina en el grupo correspondiente, se contabilizó el tiempo para el monitoreo de la incorporación de 6-NBDG a los tres tiempos de análisis. Se analizó la incorporación del análogo de glucosa fluorescente (6-NBDG) durante 5 minutos para cada tubo.

En la Figura 14, panel A, se presenta la región analizada, el panel B se presenta la fluorescencia basal de las células THP-1 en ausencia del análogo 6-NBDG a lo largo del tiempo para indicar que la fluorescencia emitida por el análogo no se traslapa con la fluorescencia propia de las células.

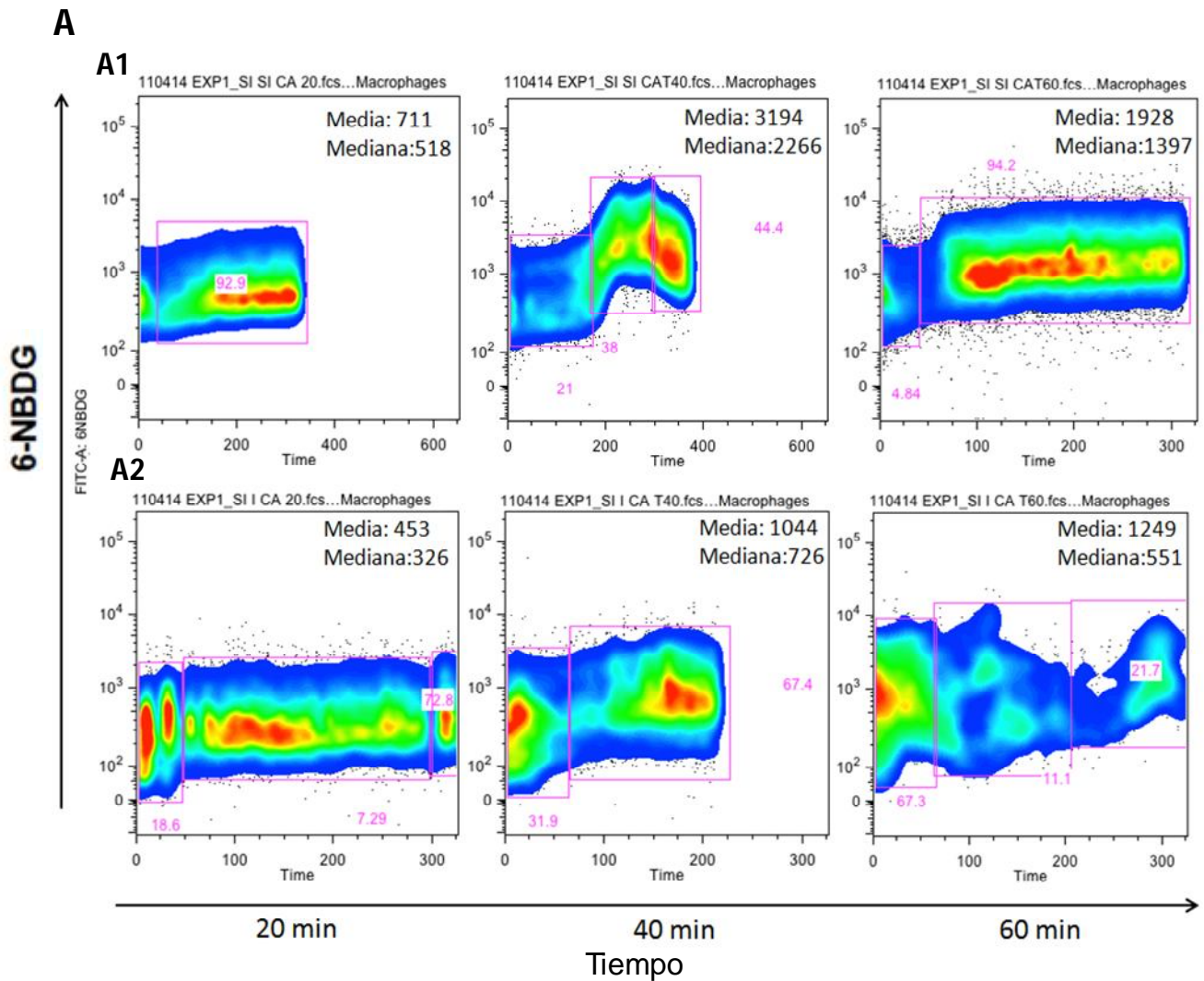


**Figura 14. Morfología y fluorescencia basal de las células THP-1.** Diagrama de puntos tamaño (FSC) contra granularidad (SSC) de las células THP-1 en ausencia del análogo 6-NBDG(A), la región representa los macrófagos maduros, todos los gráficos que se presentan a continuación provienen de esta región. Curso temporal de la fluorescencia basal de las células THP-1 en ausencia del análogo 6-NBDG (B). En el gráfico se presenta la media y mediana de la intensidad de fluorescencia.

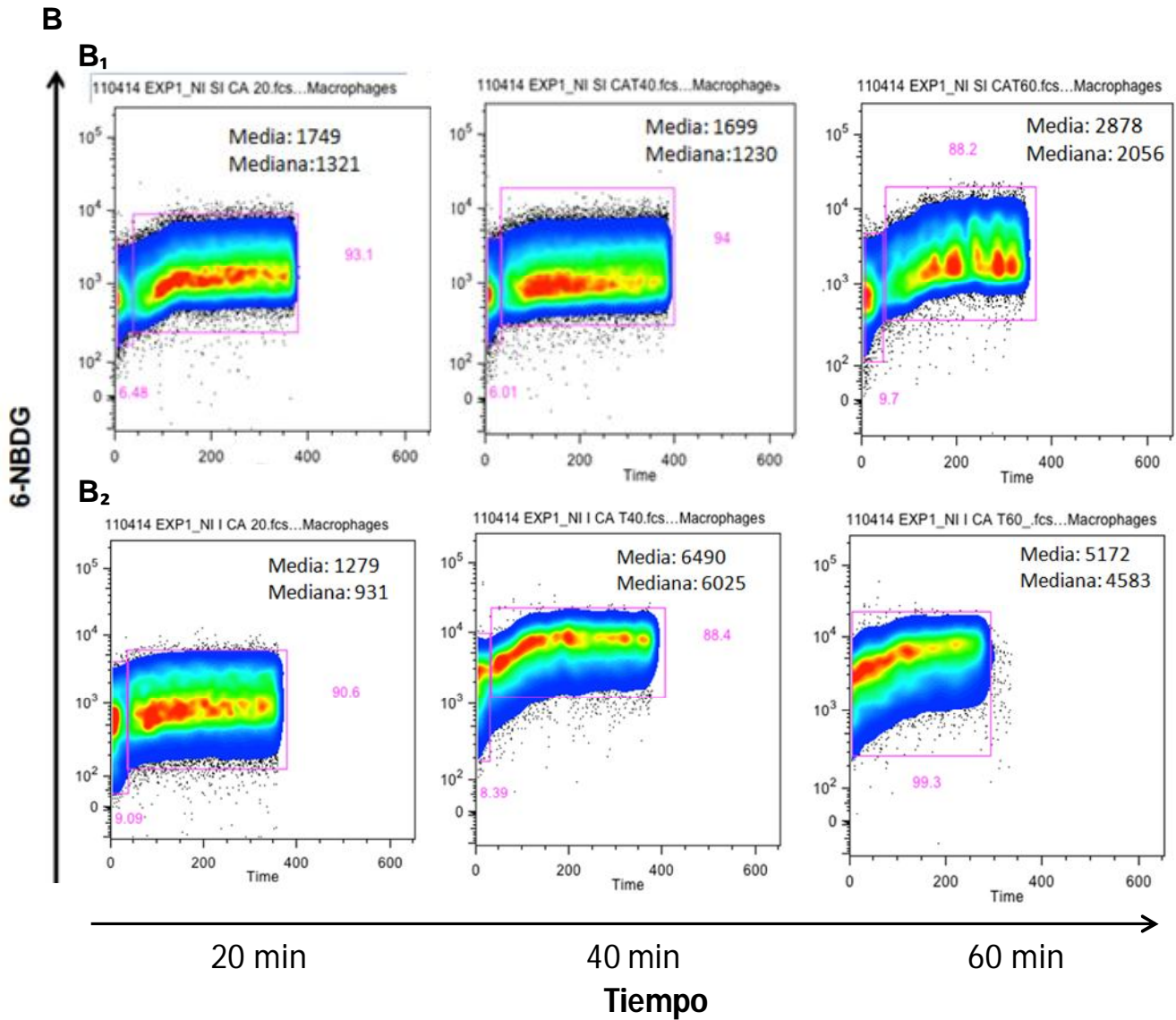
En la Figura 15, los paneles A1 y A2 representan las células sin insulina. A1 muestra el consumo basal de glucosa de las células THP-1 sin infectar, dicho consumo fue mayor en este grupo comparado con las células THP-1 infectadas, A2, en las cuales el consumo del 6-NBDG disminuye en más de la mitad con respecto a las no infectadas.

En el caso de las células THP-1 tratadas con insulina a concentración fisiológica (Figura 16 paneles B) se observó que el consumo del análogo de glucosa se incrementa continuamente en los diferentes tiempos en las células infectadas B2, este consumo fue mayor comparado con las células no infectadas B1, a partir de los 40 y 60 minutos.

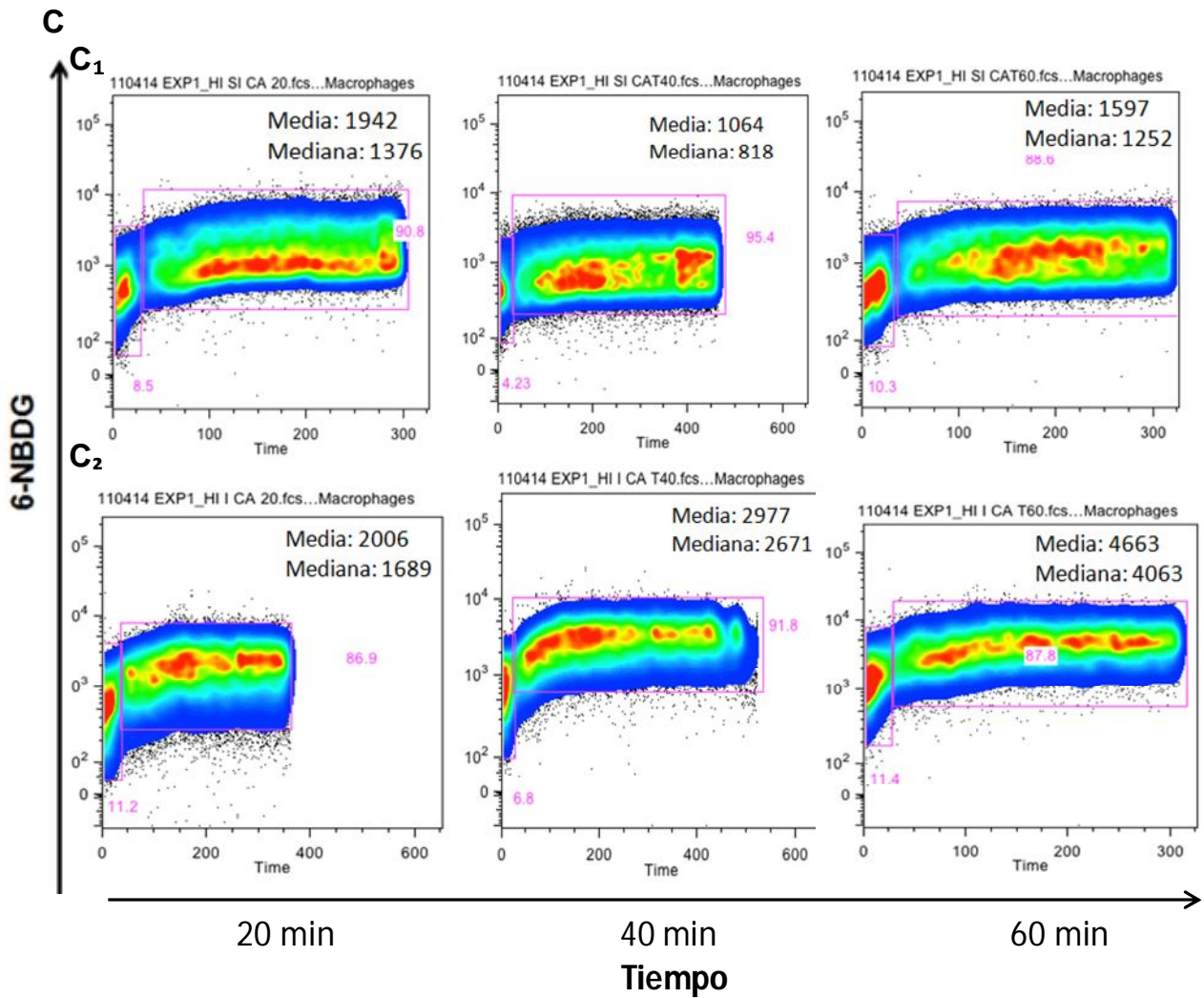
En el caso del grupo incubado con una alta concentración de insulina, se observa que no existe una diferencia tan evidente en el consumo de glucosa entre las células infectadas C2 y las no infectadas C1, como en el caso del grupo tratado con 10  $\mu$ UI/mL insulina, (Figura 17). Es importante mencionar que tanto en el grupo sin infectar e infectado, la condición de insulina elevada, disminuye la captación de glucosa.



**Figura 15. Monitoreo del consumo del 6-NBDG en las células THP-1 en ausencia de insulina (A).** Se registró el consumo de 6-NBDG por parte de las células THP-1 a los 20, 40 y 60 minutos. (A<sub>1</sub>) células THP-1 no infectadas, (A<sub>2</sub>) células THP-1 infectadas. En cada uno de los gráficos se presenta la media y mediana de la intensidad de fluorescencia. Datos de un experimento.

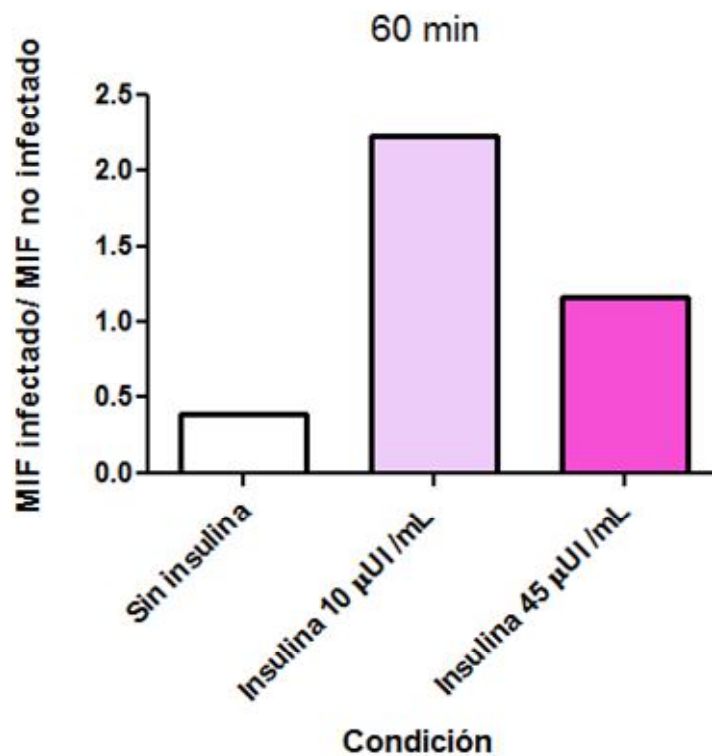


**Figura 16. Monitoreo del consumo del 6-NBDG en las células THP-1 en presencia de 10  $\mu$ UI/mL de insulina (B).** Se registró el consumo de 6-NBDG por parte de las células THP-1 a los 20, 40 y 60 minutos. (B<sub>1</sub>) células THP-1 no infectadas, (B<sub>2</sub>) células THP-1 infectadas. En cada uno de los gráficos se presenta la media y mediana de la intensidad de fluorescencia. Datos de un experimento.



**Figura 17. Monitoreo del consumo del 6-NBDG en las células THP-1 en presencia de 45  $\mu$ UI/mL de insulina (C).** Se registró el consumo de 6-NBDG por parte de las células THP-1 a los 20, 40 y 60 minutos. (C<sub>1</sub>) células THP-1 no infectadas, (C<sub>2</sub>) células THP-1 infectadas. En cada uno de los gráficos se presenta la media y mediana de la intensidad de fluorescencia. Datos de un experimento.

Debido a que la diferencia en el consumo de 6-NBDG fue más notable a los 60 minutos. Se calculó el cociente de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de las células infectadas entre la MIF de las células no infectadas para cada uno de los tres grupos de estudio: en ausencia de insulina, 10  $\mu$ UI/mL y 45  $\mu$ UI/mL de insulina. Bajo estos términos, en la Figura 18 se observa que las células THP-1 incubadas con una concentración de insulina fisiológica consume el doble de glucosa que las células tratadas con una concentración alta de la misma, y 5.6 veces más que las células incubadas sin insulina.



**Figura 18. Consumo de 6-NBDG por parte de las células THP-1 a los 60 minutos.** Se calculó el cociente de la MIF de las células THP-1 infectadas entre las células no infectadas, para las tres condiciones de estudio: sin insulina, 10  $\mu$ UI/mL y 45  $\mu$ UI/mL de insulina. Datos de un experimento.

## 8. Discusión.

Para poder entender cómo las alteraciones bioquímico-metabólicas características de los individuos con DMT2 afectan al sistema inmunológico, es necesario realizar estudios de investigación básica que nos indique que poblaciones leucocitarias y/o funciones biológicas de estas células se encuentran alteradas. Al respecto, este trabajo pretende comenzar por describir las necesidades de glucosa de los macrófagos en estado infectado y la influencia de la insulina a una concentración alta en el consumo de esta hexosa.

Para lograr este objetivo, se trabajó con la línea celular THP-1 que ha sido ampliamente usada como modelo *in vitro* de macrófagos humanos, comparada con otras líneas celulares mieloides como la HL-60, U937 o KG-1, las células THP-1 comparten más similitudes con los macrófagos derivados de monocitos humanos en diferentes criterios como la morfología, expresión de antígenos de membrana y productos de secreción. A diferencia de los cultivos primarios de monocitos humanos, la línea celular THP-1 ofrece la ventaja adicional de presentarse como una población homogénea, lo cual facilita la realización de estudios a nivel bioquímico (Auwerx, 1991).

Para inducir la diferenciación de los monocitos a macrófagos, el reactivo comúnmente utilizado es el PMA. Intentos preliminares para identificar un inductor natural como la 1, 2, 5-dihidroxitamina D3 (VD<sub>3</sub>), el ácido retinoico o citocinas tuvieron un éxito parcial. La evidencia experimental revela que las células THP-1 tratadas con PMA presentan un fenotipo más similar al de los macrófagos maduros comparado con VD<sub>3</sub>, en cuanto a la capacidad de adhesión, actividad fagocítica, expresión de los antígenos de superficie CD11b y CD14, liberación de TNF $\alpha$  y prostaglandina E<sub>2</sub>, así como la pérdida de la capacidad de estas células por proliferar (Schwende *et al.*, 1996). Ninguna de las citocinas y factores de crecimiento probados por Auwerx (1991): IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o GM-CSF tuvieron la capacidad de inducir la diferenciación de las células por si mismos. Por tanto, la combinación de estos agonistas puede ser requerida para simular los resultados obtenidos con PMA.

En el presente trabajo se probaron distintas concentraciones de PMA con el fin de optimizar el proceso. Se tomaron como criterios de maduración la morfología celular, viabilidad,



adhesión y expresión de CD14. Se encontró que la concentración de 15 y 25 ng/mL inducen cambios en la morfología de los macrófagos, aumento en el tamaño y la presencia de vesículas. Adicionalmente, se determinó que con 15 ng/mL se mantiene una viabilidad mayor al 80%, de forma similar a los resultados obtenidos con concentraciones más bajas, pero superior a la viabilidad resultado de la incubación con la concentración de 25 ng/mL. El porcentaje de adhesión en función de la concentración de PMA tuvo un efecto dosis-dependiente, siendo mayor para las concentraciones de 15 y 25 ng/mL. Por otro lado, en este trabajo se observó un aumento en la expresión del marcador de superficie en macrófagos CD14 como se ha informado en otros trabajos, en los cuales la expresión de esta molécula no se presenta en la totalidad de la población de macrófagos estimulada (Schwende *et al.*, 1996; Dobrovolskaia y Voge, 2002). Este aumento, al igual que en el caso de adhesión, fue dosis-dependiente, siendo las concentraciones de 15 y 25 ng/mL aquellas en las cuales hubo un mayor aumento respecto a las dosis mas bajas. En base a los resultados obtenidos se determinó que la concentración ideal para inducir la diferenciación de las células THP-1 fueron 15 ng/mL de PMA.

Un aspecto importante en este trabajo fue evaluar la expresión de los transportadores GLUT en condiciones basales en ausencia de insulina. Se encontró que los macrófagos THP-1 expresan los transportadores GLUT3 y GLUT5 en la membrana celular, lo cual concuerda con el trabajo realizado por Fu y colaboradores (2004). Sin embargo, se esperaba una mayor expresión de GLUT1 de acuerdo a lo informado en uno de los artículos presentado como antecedente. En contraste, no se observó la expresión de GLUT2. Los resultados también demuestran la expresión del transportador GLUT4 en ausencia de insulina. La expresión de este transportador puede deberse al proceso de maduración por el que son sometidas las células con el PMA. Se ha descrito que el PMA induce la traslocación de GLUT4 a la membrana a través de la activación de la protein cinasa C (PKC) en los adipocitos 3T3-L1 y en las células de músculo L6 (Kishi *et al.*, 1998). Es probable que en las células THP-1 ocurra un proceso semejante.

Posterior a este experimento se evaluó la expresión de los transportadores GLUT en presencia de insulina a concentración fisiológica. Se encontró que la insulina a concentración fisiológica aumenta la expresión de los transportadores GLUT4 y GLUT5.



La expresión del transportador GLUT4 en función de la insulina está ampliamente documentada en la bibliografía. Cuando la insulina interacciona con su receptor, éste se activa e inicia diferentes cascadas de señalización, tiene dos vías principales de transducción activadas por la acción de la insulina: la vía PI3K y la vía de las MAP cinasas. La PI3K se asocia con los residuos de fosfotirosina en el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1). Una vez activada por dicha unión, la PI3K fosforila al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), transformándolo en el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>). Por otro lado la protein cinasa B (PKB) también llamada AKT se localiza en el citoplasma, y la estimulación con insulina produce su traslocación y unión a PIP<sub>3</sub>. PKB desencadena el desplazamiento de los transportadores GLUT4 desde las vesículas internas hasta la membrana plasmática, estimulando la captación de glucosa (Leto y Saltiel, 2012; Olivares y Arellano, 2008, Nelson y Cox, 2007)

Por otro lado, en un trabajo realizado por Hajduch y colaboradores (2003), se menciona que la expresión de GLUT5 puede ser modulada por hormonas. La insulina en particular, es capaz de incrementar la abundancia y actividad funcional de GLUT5 en las células de músculo L6, y el efecto de la insulina parece ser mediado a través de la activación del promotor de GLUT5. En el presente trabajo se demuestra que al igual que las células de músculo esquelético, los macrófagos THP-1 también son sensibles a la insulina.

En el caso del transportador GLUT1 la insulina no induce cambios significativos en la expresión de este transportador, lo cual concuerda con el trabajo de Fu y colaboradores (2004).

La expresión de GLUT3 fue más baja con insulina que en ausencia de la misma cuando se esperaba que la expresión de este transportador aumentara, ya que se sabe que GLUT3 en los leucocitos está presente dentro de vesículas en el citosol y puede ser reclutado a la membrana plasmática de forma semejante a lo que ocurre con GLUT4 (Simpson *et al.*, 2008). En el trabajo realizado por Heijnen y colaboradores (1997) demostraron que GLUT3 está contenido en vesículas llamadas gránulos- $\alpha$  en las plaquetas. En estas células, la trombina media el reclutamiento de los gránulos- $\alpha$  a través de un mecanismo que involucra la

fosforilación PI3K. Es posible que la insulina active la fosforilación de PI3K y promueva la traslocación de este transportador.

En cuanto al efecto de la infección en la expresión de los transportadores GLUT a concentración fisiológica de insulina los resultados revelan que hubo un aumento en la expresión de GLUT3 y GLUT5. Cabe mencionar que los modelos que utilizan LPS como estímulo son muy limitados, ya que al estimular a las células del sistema inmunológico innato con microorganismos vivos como *C. albicans*, logramos satisfacer el objetivo de simular el efecto que tiene la infección en la expresión de los transportadores GLUT y la captación de glucosa.

Un aumento en la expresión de GLUT3 en las células activadas por la infección, provee de glucosa como fuente de energía para el metabolismo celular que a su vez es necesaria para sostener la respuesta inmunológica (Carruthers *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2008).

Por otra parte, se sabe muy poco del rol fisiológico de GLUT5 en los macrófagos, debido a que la concentración de fructosa en torrente sanguíneo y tejidos es baja. Es posible que el transportador GLUT5 movilice otros sustratos adicionales a la fructosa que pueden ser necesarios para la fagocitosis en este tipo de células (Burant *et al.*, 1996).

La exposición prolongada a la insulina, condición observada en pacientes con DMT2, caracterizados por la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia trae como consecuencia cambios en la expresión de los transportadores GLUT. En este trabajo, se evaluó el efecto agudo de la concentración alta de insulina en los transportadores GLUT, se observó que la expresión de los transportadores GLUT1, GLUT4 y GLUT5 disminuyó en el grupo de las células infectadas, mientras que en el caso de GLUT3, no hubo diferencias entre las células infectadas y las no infectadas.

Una posible explicación a los resultados obtenidos es que hay una reducción en la expresión génica de los transportadores GLUT, ya que se ha demostrado que la insulina ejerce una regulación transcripcional y post-transcripcional en la expresión de GLUT3 y GLUT4 en la

línea celular de fibroblastos 3T3-L1 y adipocitos, es posible que algo semejante ocurra en las células THP-1 (Taha *et al.*, 1999).

En este trabajo se demostró que la expresión de GLUT5 disminuye en las células THP-1 tratadas con una alta concentración de insulina. En un estudio realizado en ratas obesas adultas fa/fa, en las cuales se establecen condiciones de hiperinsulinemia e hiperglicemia, la proteína GLUT5 y el ritmo de incorporación de fructosa en adipocitos disminuye 12 veces. La reducción de la densidad de GLUT5 en los adipocitos puede contribuir al incremento de las concentraciones plasmáticas de fructosa en la Diabetes Mellitus (DM). Esto sugiere que los cambios en la expresión de GLUT5 en los adipocitos de pacientes con DMT2 son dependientes de la concentración de insulina (Douard y Ferraris, 2008). Los resultados de este trabajo proponen que los macrófagos THP-1 al igual que los adipocitos de pacientes con DMT2 disminuyen la expresión de este transportador cuando la concentración de insulina excede la concentración fisiológica.

Por otra parte, se calculó el cociente de la MIF de las células infectadas entre la MIF de las células no infectadas en ausencia de insulina, e incubadas con 10  $\mu$ UI/mL y 45  $\mu$ UI/mL de insulina. El transportador GLUT3 presenta una mayor expresión en condiciones fisiológicas de insulina respecto a la condición de insulina alta y en ausencia de la misma. El GLUT5 exhibe un comportamiento semejante, aunque no tan evidente como en el caso de GLUT3. Mientras que no hay cambios notables en la expresión de GLUT1 y GLUT4 en las tres condiciones de estudio.

La translocación de GLUT3 es en respuesta al incremento sustancial en la necesidad energética asociada con la activación de las células, en nuestro modelo esta activación es resultado de la infección. La translocación de GLUT3 es en respuesta al incremento sustancial en la necesidad energética asociada con la activación de las células. En los macrófagos y otros leucocitos, que son células con un tiempo de vida corto, los cambios en la demanda de energía parecen ser satisfechos por la traslocación de GLUT3 a la membrana celular (Simpson *et al.*, 2008). La alta afinidad de este transportador ( $K_m = 2$  mM), le confiere una mayor capacidad de captación de esta hexosa que los transportadores GLUT2 y GLUT4. La expresión de GLUT3 es de vital importancia cuando en el ambiente los niveles de glucosa

son bajos ó cuando la célula fagocítica compite por esta fuente de carbono con un microorganismo. *Candida albicans* también posee transportadores de hexosas de forma semejante a los transportadores GLUT, que utilizan la difusión facilitada y son proteínas transmembranales sustrato-selectivas que forman poros en la membrana, facilitando la internalización de la glucosa y otras hexosas relacionadas (Sabina y Brown, 2009).

En años recientes los análogos de glucosa han permitido el estudio del transporte de la glucosa en eritrocitos, linfocitos, astrocitos, etc. El 6-NBDG está compuesto por una molécula de glucosa, en la cual el grupo fluorescente nitrobenzoxidiazoamino reemplaza el grupo hidroxilo en el carbono 6. Debido a esta sustitución, el 6-NBDG no puede ser fosforilado por la hexosinasa. Otra propiedad de esta molécula es que tiene una afinidad 300 veces más alta que la glucosa por el sitio de unión al transportador de glucosa GLUT1 (Barros *et al.*, 2009).

En este trabajo, se midió el efecto de la insulina y de la infección en el transporte de glucosa por parte de los macrófagos con el análogo fluorescente de glucosa 6-NBDG. Como se puede apreciar en los gráficos, la captación del análogo aumenta con respecto al tiempo en todas las condiciones estudiadas.

La captación del análogo aumenta en presencia de insulina, ya que la MIF fue considerablemente menor en las células incubadas sin insulina comparadas con las células incubadas con 10 y 45  $\mu\text{UI}/\text{mL}$  de insulina. Este resultado revela que al igual que los adipocitos y fibroblastos, el transporte de 6-NBDG es dependiente de insulina en las células THP-1. Este resultado concuerda con otro trabajo en el cual determinan que el transporte de 6-NBDG, al igual que el transporte de glucosa a las células, es dependiente de insulina (Kim *et al.*, 2012)

También puede observarse que la captación del análogo fue menor en las células infectadas respecto a las células sin infectar en el grupo tratado sin insulina. Este resultado sugiere que en ausencia de insulina, las células THP-1 son menos eficientes en la captación de glucosa, y que este proceso se afecta mas por la infección. Adicionalmente, la incorporación del 6-NBDG es mayor en las células infectadas con *C. albicans* respecto a las células no infectadas en ambos grupos tratados con las dos concentraciones de insulina. Esto implica

que los macrófagos THP-1 incorporan una mayor cantidad de glucosa para satisfacer las demandas adicionales impuestas por la infección con *C. albicans*. Durante la fagocitosis hay un incremento en la oxidación de la glucosa, activación del ciclo del ácido tricarboxílico y vía de las pentosas fosfato. Un aumento en el transporte de glucosa necesita un incremento en la función de los transportadores GLUT. Los resultados de la expresión de los transportadores GLUT indican que la incorporación del 6-NBDG podría ser mediado principalmente por GLUT3.

Es importante mencionar que la captación del análogo en las células tratadas con insulina a concentración fisiológica fue mayor que en las células tratadas con 45  $\mu$ UI/mL, observándose el máximo de captación a los 60 minutos. Es decir, la condición de insulina elevada disminuye la captación eficiente de glucosa.

La disminución en la captación del análogo de glucosa en presencia de una alta concentración de insulina puede tener varias explicaciones: (i) La alta concentración de insulina afecta la expresión de los transportadores GLUT como se menciona con anterioridad y es por esto que la captación de 6-NBDG disminuye, (ii) Este fenómeno podría deberse a una disminución en la concentración del receptor de insulina en la superficie celular, debido a la saturación de los sitios de unión y (iii) Es posible que la alta concentración de insulina promueva una reducción en la expresión en el sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2) en los macrófagos, aún cuando el tiempo de incubación fue de una hora, este efecto se observó en un trabajo realizado por Burén y colaboradores (2003), donde se demuestra que la exposición de los adipocitos por un largo período de tiempo con una alta concentración de insulina y glucosa a concentraciones fisiológicas y altas por 24 horas, promueve alteraciones en la internalización de glucosa, y una reducción en la expresión del receptor IRS-2.

## 9. CONCLUSIONES

En el modelo *in vitro* empleando macrófagos THP-1 infectados con *C. albicans*, observamos que disminuye la captación de glucosa por parte de los macrófagos THP-1 infectados en presencia de una alta concentración de insulina comparada con las células infectadas y tratadas a una concentración fisiológica de la misma. Esta reducción puede ser resultado de la alteración en la expresión de los transportadores GLUT.

## **10. PERSPECTIVAS**

Debido a que la principal característica de la DMT2 es una concentración de glucosa elevada en sangre, se recomienda realizar ensayos en los que se determine la expresión de los receptores GLUT, así como la incorporación de glucosa bajo concentraciones fisiológicas y altas de glucosa. Así como evaluar las funciones biológicas del macrófago como fagocitosis, producción de citocinas y función microbicida.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Arenas R. 2011. *Micología médica ilustrada*. 4ª Ed. Mc Graw Hill. 222-235.

Augustin R. 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 62(5): 315–333.

Auwerx J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47: 22-31.

Barros L, Bittner C, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Moldenhauer H, Oyarzún C, Álvarez M. 2009. Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transport GLUT1 in astrocytes. *J. Neurochem*. 109 (1): 94–100.

Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Lea El, Linares S, Mengua El, Valdelamar L, Rodríguez M, Seyf H Amell A, Carrillo M, Silva C, Acosta A, Añez J, Andara C, Angulo V, Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 26: 76-86.

Bonifaz A. 2012. *Micología medica básica*. 3ª Ed. MC GRAW HILL. 279-300.

Brown G. 2011. Innate Antifungal Immunity: The key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol*. 2011. 29:1–21.

Burant C, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell G, Davidson N. 1996. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5, *J. Biol. Chem*. 267: 14523-14526.

Burén J, Liu H, Laurantz J, Eriksson J. 2003. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitization in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 148(1):157-67.

Calder P. 1995. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc*. 54: 65-82.



Carruthers A, DeZutter J, Ganguly A, Devaskar S. 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E836–E848.

Coleman W. 2011. Skin Infections: diagnosis and treatment. *dermatologic surgery*, 37: 1776.

Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. 2006. Anti-inflammatory effects of insulin and the pro-inflammatory effects of glucose. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 18:293-301.

Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B.1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 14:29–34.

Deng Hu-ping, Chai Jia-Ke. 2009. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. *Int Immunopharmacol.* 9(11):1251-9.

Devlin T. 2006. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas.*4ª ed. Reverté. 513-515.

Díaz D, Burgos L. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA.* 15: 179-189.

Dimitriadis G, Maratou E, Boutati E, Psarra K, Papasteriades C, Raptis S. 2005. Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. *Cytometry Part A* 64A: 27–33.

Dobrovolskaia M, Vogel S. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*; 4: 903–14.

Douard V, Ferraris R. 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E227–E237.

ENSANUT 2012. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control.

<http://ensanut.insp.mx>. Consultado el 11 de junio del 2014.

Feng Z, Keating A. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics*. 2:113-28.

Fu Y, Maianu L, Barry R, Melbert, Garvey T. 2004. Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood Cells Mol Dis*. 32:182–190.

Giacco F, Brownlee M. 2012. Mechanisms of hyperglycemic damage in diabetes. En: Skyler J. *Atlas of diabetes*. 4a ed. Springer. 217-231.

Gómez S, Urdampilleta A. 2012. El GLUT4: efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la Diabetes tipo 2. *Av Diabetol*; 28(1):19-26.

Gould G, Holman G. 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue specific expression. *Biochem J*; 295:329-341.

Gruber de Bustos E., Hernández Ruano M., Hernández T., Hernández Yero A., Jadzinski M., Javiel G., Lerario A., Lopez Stewart G., Moreira V., Ramos O., Rosas Guzmán J., Ruiz A., Segarra P., Sierra I., Vaca Cojitambo C., Villena Chavez J., Violante Ortiz R., García de los Ríos M. 2006. Guías ALAD de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. *XIV*:1-77.

Guarner J, Brandt M. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev*. 24(2): 247–280.

Hajdуч E, Litherland J, Turban S, Brot-Laroche E, Hundal S. 2003. Insulin regulates the expression of the GLUT5 transporter in L6 skeletal muscle cells. *FEBS Lett*. 549(1-3):77-82.

Heijnen H, Oorschot V, Sixma J, Slot J, James D. 1997. Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol.* 138(2):323-30.

Heinsbroek S, Gordon S. 2007. Macrophages. En: Brown G, Netea M. *Immunology of fungal infections.* Springer. 3–25.

Johnson J, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard C, Alam T, Unger R. 1990. Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science.* 4980: 546-9.

Kim W, Lee J, Jung D, Williams D. 2012. Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors.* 12: 5005-5027.

Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, Miyata I, Hagi A, Hayashi H. 1998. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes.* 47: 550-558.

Koshy S, Alizadeh P, Timchenko L, Beeton C. 2010. Quantitative measurement of GLUT4 translocation to the plasma membrane by flow cytometry. *JoVE.* 45:1-3.

Leto D, Saltiel A. 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.*13: 383-396.

Leffler M, Hrach T, Stuerzl M, Raymund E, Herndon D, Jeschke M. 2007. Insulin attenuates apoptosis and exerts anti-inflammatory effects in endotoxemic human macrophages. *Journal of Surgical Research* 143: 398–406.

Liang C. Han S, Senokuchi T, Tall A. 2007. The macrophage at the crossroads of insulin resistance and atherosclerosis. *Circ Res.* 100:1546-1555.

Lienhard G, Slot J, James D, Mueckler M. 1992. How cells absorb glucose. *Scientific American*. 86-9.

Mantzoros M, Tsiodras M, Kelesidis L, Christos S. 2006. Obesity and diabetes. *Human Press*. 377-401.

Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, Raptis SA. 2007. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eu J Clin Invest*. 37: 282-290.

Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. 1992. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 15:256–260.

Matschinsky F. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$ -cells and hepatocytes. *Diabetes*. 39: 647-652.

Meyer-Wentrup F, Cambi A, Figdor C, Adema G. 2007. Detection of fungi by mannose-based recognition receptors. En: Brown G, Netea M. *Immunology of fungal Infections*. Springer. 293-307.

Miramón P, Kasper L, Hube B. 2013. Thriving within the host: *Candida* spp. Interactions with phagocytic cells. *Med Microbiol Immunol*. 202:183–195.

Mobasher A, Bondy C, Moley K, Mendes A, Carvalho R, Richardson S, Hoyland J, Barret-Jolley R, Shakibaei M. 2008. Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. En: mammalian sugar transporter families: GLUT and SGLT. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 200: 22-3.

Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994. 2009, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Secretaria de Salud.

Morrisette N, Gold E, Aderem A. 1999. The macrophage a cell for all seasons. *Trends in Cell biology* (9): 199-201.

Mueckler M, Thorens B. 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34:121-138.

Nelson D, Cox M. 2009. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 5ª ed. Omega. 25-26, 391-392, 439-443, 929.

Netea M, Brown G, Kullberg B, Gow N. 2008. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology*. (6):67-78.

Netea M, Van Der Meer, Kullberg B, Bart J. 2007. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. En: Brown G, Netea G. *Immunology of fungal infections*, Springer 259–272.

Olivares J, Arellano A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 27(1): 9-18.

Organización Mundial de la Salud (2014)

[http://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/es/](http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/es/). Consultado el 11 de junio del 2014.

Park E, Jung H, Yang H, Yoo M, Kim C, Kim K. 2006. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 56: 45-50.

Pearce E, Poffenberger M, Chang C, Jones R. 2013. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*. 342 (6155): 1242454-1 – 1242454.

Peleg A, Weerarathna T, McCarthy, Davis T. 2007. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 23: 3–13.

Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. 2008. *Farmacología*. 6a ed. Elsevier. 402-403.

Reiss E, Shadomy J, Lyon M. 2012. Fundamental medical mycology. 1a ed. Wiley-Blackwell. 251-278.

Romani L. 2000. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. J Leukoc Biol. 68:175-179.

Romani L. 2004. Immunity to fungal infections. Nature Reviews Immunol. 4: 1-13.

Sabina J, Brown V. 2009. Glucose Sensing Network in *Candida albicans*: a Sweet Spot for Fungal Morphogenesis. Eukaryotic cell. 8(9):1314–1320.

Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Leukoc Biol; 59: 555–61.

Simpson A, Dwyer D, Malide D, Moley K, Travis A, Vannucci S. 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295: E242–E253.

Sobel J. 2008. Candidiasis. In: Hospenthal D M, Rinaldi M. Infectious Disease: Diagnosis and Treatment of Human Mycoses. Humana Press Inc. 137-161.

Stryer L, Berg J, Tymoczko J. 2012. Bioquímica con aplicaciones clínicas. 7<sup>a</sup> ed. Reverté. 452-454.

Taha C, Liu Z, Jin J, Al-Hasani H, Sonenberg N, Klip A. 1999. Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. J. Biol. Chem. 274: 33085-33091.

Tavanti A, Campa D, Bertozzi A, Pardini G, Naglik J, Barale R, Senesi S. 2006. *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. Microbes and Infection 8: 789-800.

Tébar F, Escobar F. 2009. La Diabetes mellitus en la practica clínica. 1ª Ed. Médica Panamericana. 189-192.

Weir G, Bonner S. 2004. Five stages of evolving  $\beta$ -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53: S16-S21.

Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol*. 2008:1-19.

Wood IS, Trayhurn P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 1:3-9.

Zipfel P, Gropp K, Reuter M, Schindler S, Skerka C. 2008. The host innate immune response to pathogenic *Candida albicans* and other fungal pathogens. En: human and animal relationships, 2nd Edition. Springer. 233-242.