



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ALTERACIONES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN EL TRANSPORTE DE
GLUCOSA DEL TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ROSAS GARCÍA JORGE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKER

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

MÉXICO, CD. MX., NOVIEMBRE, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de mayo de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ROSAS GARCÍA JORGE** con número de cuenta 303287878, con la tesis titulada **"ALTERACIONES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE CONTROLAN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA DEL TEJIDO ADIPOSEO EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA**:

- Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
- Vocal: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA
- Secretario: DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
- Suplente: DRA. CLAUDIA ANGÉLICA SOTO PEREDO
- Suplente: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 21 de septiembre de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por haberme aceptado y apoyado en mis estudios de maestría.

Agradezco el apoyo recibido por CONACYT de la beca y al proyecto Conacyt SALUD-2010-02-151136.

Agradezco a mi tutora principal, la Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera por aceptarme como su alumno y apoyarme en mi formación como Maestro en Ciencias Biológicas.

Agradezco a los integrantes de mi comité tutorial, a la Dra. Mina Köningsberg Feinstein y al Dr. Mohammed Elhafidi Bentlaker, quienes me apoyaron en mis estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco a toda persona que directa o indirectamente influyo en mí para profundizar en el entendimiento de uno de los principales problemas de salud mundial.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas que desarrollaron diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares y no tuvieron la oportunidad de generar una conciencia de prevención de estas enfermedades crónicas degenerativas.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Síndrome Metabólico (SM)	7
Sobrepeso y obesidad	9
Tejido adiposo	11
Clasificación del TAB y TAM según su distribución	12
Metabolismo del adipocito	14
Resistencia a la insulina	15
Obesidad y Resistencia a la insulina	17
Homeostasis de la glucosa.....	17
Adipocitos como reguladores de la glucosa.	19
Señalización celular	20
Transporte de glucosa	22
Vía de señalización de la insulina.....	24
La insulina	25
Receptor de Insulina (IR).....	27
Sustrato del Receptor de Insulina (IRS).....	29
Cinasa 3 de Fosfatidilinositol (PI3K)	31

Proteína Cínasa dependiente de fosfoinosítido (PDK).....	34
Proteína cinasa B / AKT	36
TBCD1, TBCD4/AS160 y las proteínas Rabs	38
Cínasa Dependiente de AMP (AMPK).....	41
Estructura de AMPK.....	41
Activadores de AMPK.....	45
AMPK y la captación de glucosa	49
OBJETIVO:	51
Objetivos particulares.....	51
HIPÓTESIS:	52
ANTECEDENTES	53
METODOLOGÍA.....	55
Modelo de estudio	55
Determinación de triacilgliceroles	55
Determinación de insulina	56
Determinación de leptina.....	56
Determinación de adiponectina	56
Determinación de glucosa	57
Aislamiento de adipocitos	57
Análisis por Western blot.....	58
Captación de glucosa	59
Análisis Estadístico	59
RESULTADOS	60

Evaluación del estado de activación de AKT y de la expresión de la proteína AKT e IRS-1 en adipocitos de rata con SM.	61
Alteración en la captación de glucosa (2NBDG) en adipocitos estimulados con insulina en el SM...	64
Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con metformina en el SM.....	65
Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con Metformina en adipocitos con SM	67
Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con AICAR en el SM.....	68
Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con AICAR en adipocitos con SM	70
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	79
LITERATURA CITADA.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Factores de riesgo incluidos en las distintas definiciones del SM.....	8
Tabla 2 Clasificación de la obesidad según la WHO	10
Tabla 3 Especificidades de sustratos de los transportadores tipo GLUT	23
Tabla 4 Características del modelo de rata con SM	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Porcentaje de mortalidad en México según la Organización mundial de la salud (WHO)	6
Figura 2 La disfunción del adipocito	11
Figura 3 Distribución del TAB y TAM en humanos	12
Figura 4 Distribución del TAM y TAB en roedores.....	13
Figura 5 Acción coordinada de distintos órganos en la homeostasis de la glucosa	18
Figura 6 Filogenia de las clases de transportadores de glucosa Basado en el análisis filogénico de similitud de secuencia la familia GLUT se divide en tres clases	22
Figura 7 Vía de señalización de la insulina.....	24
Figura 8 Estructura primaria de la insulina.....	25
Figura 9 Esquema del receptor de Insulina.....	28
Figura 10 Organización estructural de los dominios de IRS.....	30
Figura 11 Estructura del dominio de la subunidad catalítica de PI3K	31
Figura 13 Organización estructural de PDK.....	34
Figura 14 Mecanismo de regulación y activación de PKB α por PDK-1 y PDK-2.....	35
Figura 15 Organización estructural de las isoformas de AKT	36
Figura 16 Organización estructural de los dominios de TBC1D1 y TBC1D4.....	38
Figura 17 Esquema de interacción entre AS160 y las proteínas RabS	39
Figura 18 Organización estructural de los dominios de la isoformas de AMPK.....	43
Figura 19 Vía de señalización de AMPK.....	44
Figura 20 Estructura química de los activadores de la AMPK que actúan indirectamente a través de la inhibición de la síntesis de ATP.....	46
Figura 21 Pro-fármacos que son convertidos en análogos de AMP dentro de la célula	47
Figura 22 Estructuras químicas de los activadores alostéricos de la AMPK que se unen directamente en sitios distintos a los de unión del AMP	48
Figura 23 Residuos de aminoácidos fosforilados por AKT y AMPK.....	50

Figura 24 Inmunoblot representativos de la proteína pAKT, AKT, IRS y Actina de adipocitos estimulados con insulina en el SM.	61
Figura 25 Análisis densitométrico de la expresión de IRS relativo a la Actina de adipocitos estimulados con insulina en el SM.	61
Figura 26 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AKT de adipocitos estimulados con insulina en el SM.	62
Figura 27 Análisis densitométrico de la expresión de AKT relativo a Actina de adipocitos estimulados con insulina en el SM.	62
Figura 28 Alteración en la captación de glucosa (2NBDG) en adipocitos estimulados con insulina en el SM.	64
Figura 29 Inmunoblot's representativos de la proteína pAMPK, AMPK y Actina de adipocitos estimulados con metformina en el SM.	65
Figura 30 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AMPK de adipocitos estimulados con metformina en el SM.	65
Figura 31 Análisis densitométrico de la expresión de AMPK relativo a Actina de adipocitos estimulados con metformina en el SM.	66
Figura 32 Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con Metformina en adipocitos con SM.	67
Figura 33 Inmunoblot's representativos de la proteína pAMPK, AMPK y Actina de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.	68
Figura 34 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AMPK de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.	68
Figura 35 Análisis densitométrico de la expresión de AMPK relativo a Actina de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.	69
Figura 36 Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con AICAR en adipocitos con SM.	70

RESUMEN

Alteraciones de las vías de señalización que controlan el transporte de glucosa del tejido adiposo en un modelo de síndrome metabólico.

Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México DF, México

El Síndrome metabólico (SM) es una combinación de factores de riesgo como obesidad, hipertensión, dislipidemia y resistencia a la insulina. La prevalencia del SM ha incrementado en todo el mundo y se ha convertido en un grave problema de salud pública. El mecanismo de la etiología del SM permanece aún sin esclarecerse, sin embargo se ha reconocido la relevancia de la asociación entre la obesidad y la resistencia a la insulina que involucra la disfunción del tejido adiposo, por lo que el entendimiento del papel del adipocito en el desarrollo del SM resulta de vital importancia. De hecho, las alteraciones que subyacen la disfunción del adipocito, como las vías de señalización de la insulina y la vía de la cinasa dependiente de AMP (AMPK), que controlan el transporte de glucosa, no han sido bien dilucidadas. Por lo que este estudio propone investigar proteínas claves en las vías de señalización involucradas en la captación de glucosa del adipocito que pudieran estar afectadas en el SM y cómo afectan el transporte de glucosa en ratas con SM.

Metodología

El SM fue inducido por la alimentación a 10 ratas con sacarosa al 30% en el agua de beber durante 16 semanas. Ratas que fueron alimentadas con una dieta estándar sirvieron como control. De estos animales se aislaron los adipocitos. Se les añadió metformina, AICAR e insulina a los adipocitos aislados y después se determinó el nivel de fosforilación de las proteínas AMPK y AKT/PKB por Western blot. El ensayo de captación de glucosa se realizó mediante la incubación de los adipocitos con un análogo fluorescente de la D-glucosa (2-NBDG), mediante la medición de la fluorescencia intracelular.

Resultados

La adición de los respectivos activadores de la vía de la insulina y la AMPK, (metformina, AICAR e insulina) a los adipocitos aislados de ratas con SM, muestran alteraciones en el estado de fosforilación de AMPK y AKT entre las distintas condiciones (control y SM), demostrando que la insulina no incrementa el estado de fosforilación de AKT tanto como la condición control, mientras que la metformina y el AICAR no incrementaron el estado de activación de AMPK en adipocitos de ratas con SM. En la captación de glucosa mediada por insulina, los adipocitos de ratas con SM necesitaron más insulina para captar glucosa en comparación con su grupo control. Los resultados muestran diferencias sorprendentes entre los distintos activadores de AMPK (metformina y AICAR) en la condición control, mientras que en adipocitos de rata con SM no tuvieron efecto en la captación de glucosa. La metformina sorprendentemente disminuyó la

captación de glucosa mientras que el AICAR incremento la captación de glucosa en ambas condiciones.

Conclusión

Las alteraciones en las vía de señalización de la insulina afectan disminuyendo la captación de glucosa; evidenciando un estado de resistencia a la insulina en el adipocito de ratas con SM. Se plantea la posibilidad que AMPK tiene distintos papeles en la captación de glucosa, dependiendo de que heterotrímico de AMPK sea activado.

ABSTRACT

Signaling pathways alterations involved in glucose transport of adipocytes in metabolic syndrome

Experimental Nutrition Laboratory, National Institute of Pediatrics, México city, México.

Metabolic syndrome (MS) includes a combination of clinical complications such as obesity, hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance. The prevalence of MS has increased in the entire world and is becoming an important health problem. The exact etiology of MS remains unclear, nevertheless it has recently been recognized the relevance of the association among obesity and insulin resistance, that directly involve dysfunction adipose tissue so understand the role of adipocyte development pathophysiology of MS is vital.

In fact, alterations underlying adipocyte dysfunction such as signaling pathways like insulin and AMP-dependent protein kinase (AMPK) and how they impact glucose transport are not well understood.

Therefore this study proposes to investigate key proteins in the signaling pathways involved in glucose uptake adipocyte that could be affected in the SM and how this condition affects transport glucose I adipose tissue in rats with MS.

Methods

MS was induced by feeding 10 rats with 30% sucrose in drinking water during 16 weeks. Rats having standard diet served as controls. From these animals adipocytes were isolated.

Metformin, AICAR or insulin were added to isolated adipocyte and then the level of phosphorylation of AMPK and PKB/AKT was determined by Western blot. The glucose uptake assay was performed by direct incubation of adipocytes with a fluorescent D-glucose analog (2-NBDG), through the measurement of the intracellular fluorescence.

Results

Addition of respective activators of insulin and AMPK pathways (metformin, AICAR or insulin) to isolated adipocytes from rats with SM, showed alterations among the distinct conditions (Control and MS) in adipocytes on AMPK and AKT phosphorylation state, showed that insulin did not increase the phosphorylation state of AKT, as well as control, while metformin and AICAR did not increase the phosphorylation state of AMPK. In the glucose uptake mediated by insulin, adipocytes with SM needed more insulin than Control group to uptake glucose.

The results showed striking differences among the distinct AMPK activators (metformin and AICAR) on glucose uptake in Control condition, while in adipocytes of rats with MS, they have no effect in glucose uptake. Metformin surprisingly have decreased glucose uptake compared to control. While AICAR increase glucose uptake in both conditions.

Conclusion

Alterations in insulin signaling pathway decreased glucose uptake; showing a state of insulin resistance in adipocytes of rats with MS. It raises the possibility that AMPK exerts different roles in glucose uptake, depending which AMPK heterotrimer is activated.

INTRODUCCIÓN

México, como otros países, se encuentra experimentando una transición epidemiológica que presenta grandes retos al sistema de salud y a la sociedad. A principios del siglo pasado, las primeras causas de mortalidad se relacionaban con enfermedades infecciosas y parasitarias, salud materno-infantil y deficiencias alimentarias. Sin embargo, para la segunda mitad de ese siglo, las enfermedades no transmisibles (ENT) comenzaron a cobrar importancia y sus complicaciones se han convertido en la principal causa de mortalidad del país y del mundo.⁽¹⁾

Las ENT, presentan la causa de defunción más importante en el mundo, pues acaparan un 63% del número total de muertes anuales, significa que matan a más de 36 millones de personas cada año. Cerca del 80% de las muertes por ENT se concentran en los países en vías de desarrollo.⁽²⁾

Las ENT o crónicas son afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta, existen cuatro tipos principales de enfermedades de ENT son:

Las enfermedades cardiovasculares (ECV)

La diabetes

Las enfermedades respiratorias crónicas (por ejemplo, la neumonía obstructiva crónica o el asma)

El cáncer

Mortalidad proporcional (% total de muertes,todas las edades, ambos sexos)

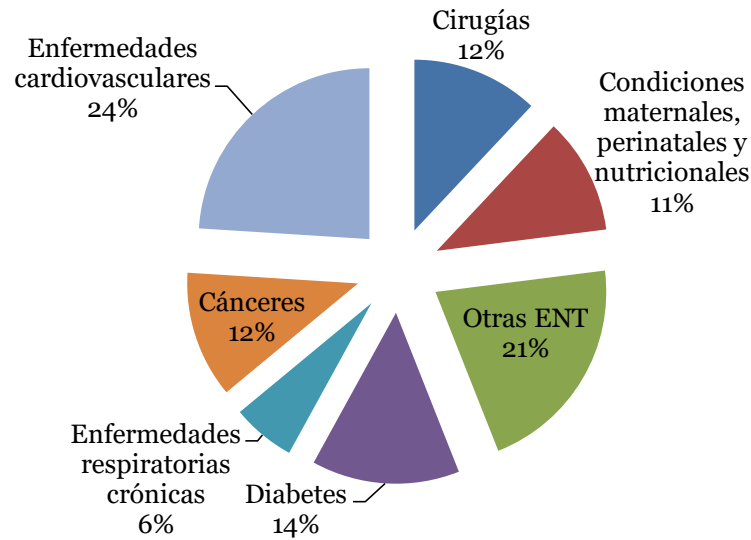


Figura 1 Porcentaje de mortalidad en México según la Organización mundial de la salud (WHO). Porcentaje de mortalidad en México según la Organización mundial de la salud (WHO). Según la WHO en 2011 la mortalidad proporcional (el % del total de muertes de todas las edades y de ambos sexos) fue de 24% para las ECV, 14% para la Diabetes, 12% para Cánceres, 12% Cirugías, 6% para Enfermedades respiratoria crónicas, 11% para Condiciones maternas, perinatales y nutricionales y 21% para otras ENT. ⁽²⁾

De manera muy importante dos de las principales causas de mortalidad mundial están íntimamente relacionadas; la diabetes Mellitus tipo II y las ECV. La **diabetes**, es una enfermedad crónica, que se manifiesta cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce, es un factor de riesgo independiente para desarrollar **ECV**. Las ECV son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, donde los ataques al corazón y los accidentes cerebro vasculares suelen ser fenómenos agudos, que se deben sobre todo, a obstrucciones que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro.^(2,3) La relación entre la diabetes y las ECV está comprendida en un concepto denominado Síndrome metabólico (SM).

Síndrome Metabólico (SM)

El SM está definido como un conglomerado de anormalidades fisiológicas, antropométricas y bioquímicas que aumentan el riesgo de desarrollar ECV o diabetes Mellitus tipo II.^(4,5)

El SM es una condición que genera una gran controversia, empezando por el mismo nombre. Desde mediados de los años 90's existe evidencia que señala la relación entre las anormalidades metabólicas y las ECV no fue hasta 1988 que Gerald Reaven denominó a esta relación con el término Síndrome X, fue entonces que diversas asociaciones como:

La WHO, el Grupo Europeo para el Estudio de la resistencia a la insulina (EIGR), el Panel del Tratamiento del Adulto III en su Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP ATP III), la Asociación Americana de Endocrinólogos clínicos (AACE), la Federación Internacional de Diabetes (IDF). Acuñaron diferentes nombres como síndrome de resistencia a la insulina utilizado por la EIGR y la AACE, y el síndrome metabólico atribuido a la WHO, el NCEP ATP III y la IDF.⁽⁴⁾ (Tabla 1)

Tabla 1 Factores de riesgo incluidos en las distintas definiciones del SM.

La tabla describe los factores de riesgo incluidos por las asociaciones (OMS, EGIR, NCEP ATP III, AACE e IDF) que se han definido al SM. ⁽⁵⁾

	Asociaciones que han definido al SM	OMS	EGIR	NCEP ATP III	AACE	IDF
Factores de riesgo para desarrollar ECV	Resistencia a la insulina	-----	Hiperinsulinemia	-----	-----	-----
	Intolerancia a la glucosa o Diabetes Mellitus,	-----	Elevación en la glucosa plasmática: alteración en la glucosa en ayunas pero no diabetes	Alteración de glucosa en ayunas >110 mg/dL	Algún grado de intolerancia a la glucosa (IFG/IGT)	Glucosa en ayunas ≥100 mg/dL o diagnóstico previo de DM tipo II
	Presión arterial elevada	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg o en tratamiento antihipertensivo	>130/85 mmHg		Presión arterial sistólica ≥130 mmHg o diastólica ≥85 mmHg o tratamiento de hipertensión
	Triacilglicérol plasmáticos elevados	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL	Hipertrigliceridemia	≥150 mg/dL
	HDL-C	<35 mg/dL en hombres <39 mg/dL en mujeres	<39 mg/dL para hombres y mujeres	<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres	Disminución en los niveles de HDL-C	<40 mg/L en hombres y <50 mg/dL en mujeres

	Micro-albuminuria	Grado de excreción de albúmina urinaria ≥ 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ La relación albúmina/creatinina ≥ 30 $\mu\text{g}/\text{min}$	-----	-----	-----	-----
	Obesidad central	Relación cadera/cintura > 0.9 m en hombres y > 0.85 m en mujeres y/o ≥ 30 Kg/m^2	Circunferencia de la cintura ≥ 94 cm en hombres y > 80 cm en mujeres	Circunferencia de la cintura ≥ 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres		Identifica a la obesidad central como componente del SM y la define basada en raza y género.
	Metabolismo anormal del ácido úrico	-----	-----	-----	Concentración anormal de ácido úrico, aclaramiento renal de ácido úrico	-----

Sobrepeso y obesidad

La clasificación actual de Obesidad propuesta por la OMS (Tabla 2) está basada en el Índice de Masa Corporal (IMC), que se calcula con el peso de la persona (en kilogramos) dividido por la altura de la persona (en metros al cuadrado). De esta manera, una persona con un IMC de $30 \text{ Kg}/\text{m}^2$ o mayor es considerada con

obesidad y una persona con un IMC de 25 Kg/m² o mayor es considerada con sobrepeso.

Tabla 2 Clasificación de la obesidad según la WHO. Es una clasificación que está basada en el Índice de Masa Corporal (IMC), que se calcula con el peso de la persona (en kilogramos) dividido por la altura de la persona (en metros al cuadrado).⁽⁶⁾

Clasificación	IMC $\left(\frac{kg}{m^2}\right)$
Normo Peso	18.5 – 24.9
Exceso de Peso	≥ 25
Sobrepeso o Pre Obeso	25 – 29.9
Obesidad Grado I o moderada	30 – 34.9
Obesidad Grado II o severa	35 – 39.9
Obesidad Grado III o mórbida	≥ 40

Aunque en general, el exceso de grasa es definido usualmente por el IMC, es importante señalar que más que el exceso de grasa por sí mismo, es la distribución de grasa, especialmente en las regiones centrales del cuerpo (grasa visceral, omental e intraabdominal) juegan un papel importante con la asociación a la resistencia a la insulina.^(7,8,9)

Este almacenamiento excesivo de grasa ocurre principalmente en los adipocitos, los cuales se ven afectados a tal grado que exhiben tanto hipertrofia como hiperplasia del tejido adiposo (Figura 2).

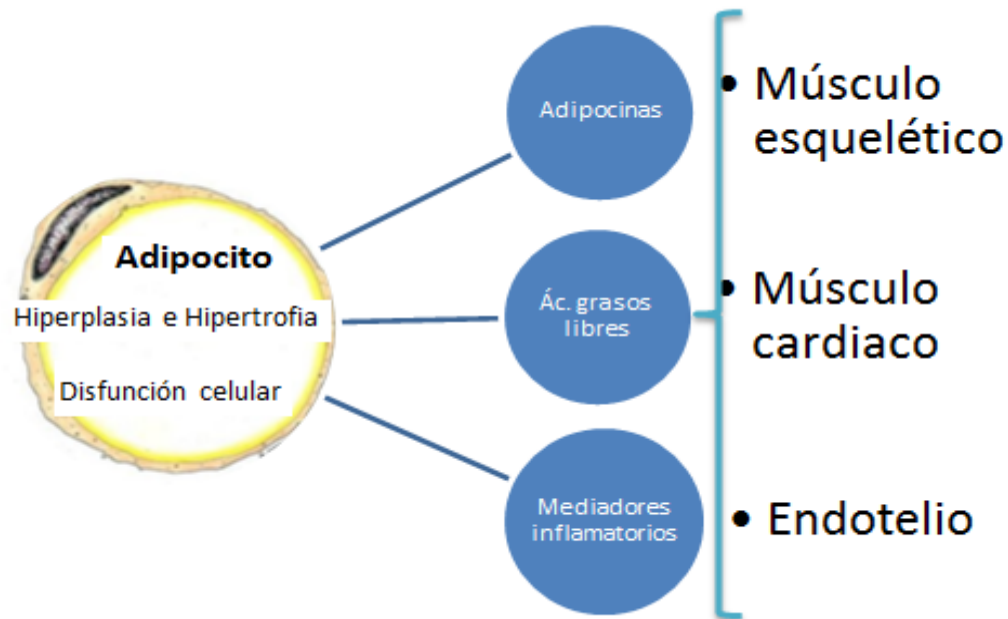


Figura 2 La disfunción del adipocito. La disfunción del adipocito se evidencia en un proceso de hipertrofia e hiperplasia, que está relacionado con anomalías intracelulares y sistémicas, incluyendo la resistencia a la insulina, producción de adipocinas, ácidos grasos libres, mediadores inflamatorios que afectan la función del endotelio, músculo esquelético y cardiaco.⁽¹⁰⁾

Tejido adiposo

Se han identificado dos tipos de tejido adiposo en humanos y otros mamíferos, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). Estos tejidos adiposos tienen diferente color, morfología, funciones metabólicas y características bioquímicas.

EL TAB se considera como el principal tejido que almacena el exceso de nutrientes en forma de triacilgliceroles mientras que el TAM juega un papel en la regulación de la temperatura generando calor mediante el consumo de energía almacenada en forma de triacilgliceroles.

El TAB está compuesto en su mayoría por adipocitos contienen una gran gota unilocular de lípidos. A diferencia del TAM que contiene múltiples gotas de grasa pequeñas (multiloculares), es rico en mitocondrias y reside en depósitos que son altamente innervados y vascularizados.⁽¹¹⁾

Clasificación del TAB y TAM según su distribución^(11,12)

Los depósitos de tejido adiposo se distinguen por su localización anatómica en humanos y otros animales. (Figura 3) (Figura 4)

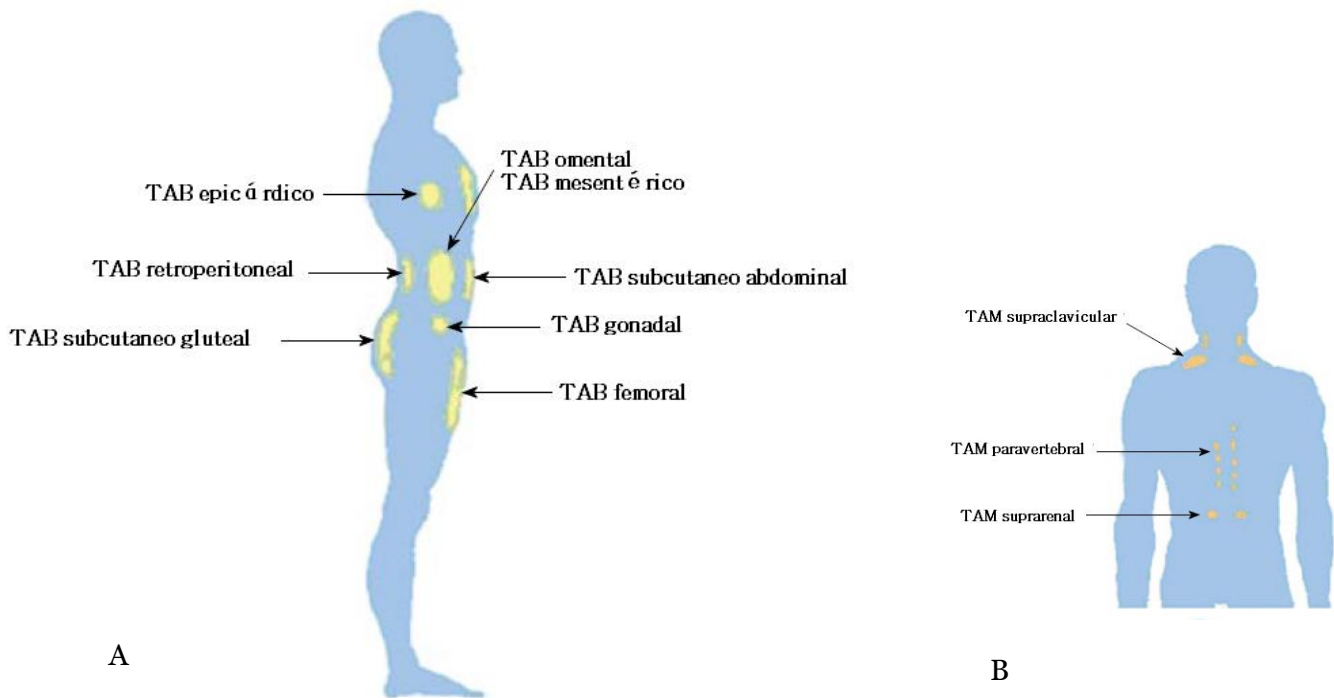


Figura 3 Distribución del TAB y TAM en humanos. A) TAB subcutáneo (epicárdico, inguinal e intramuscular), TAB visceral (mesentérico, omental, perigonadal y retroperitoneal). B) TAM (interescapular, supraclavicular y perirenal)

Distribución de TAB y TAM en roedores⁽¹²⁾

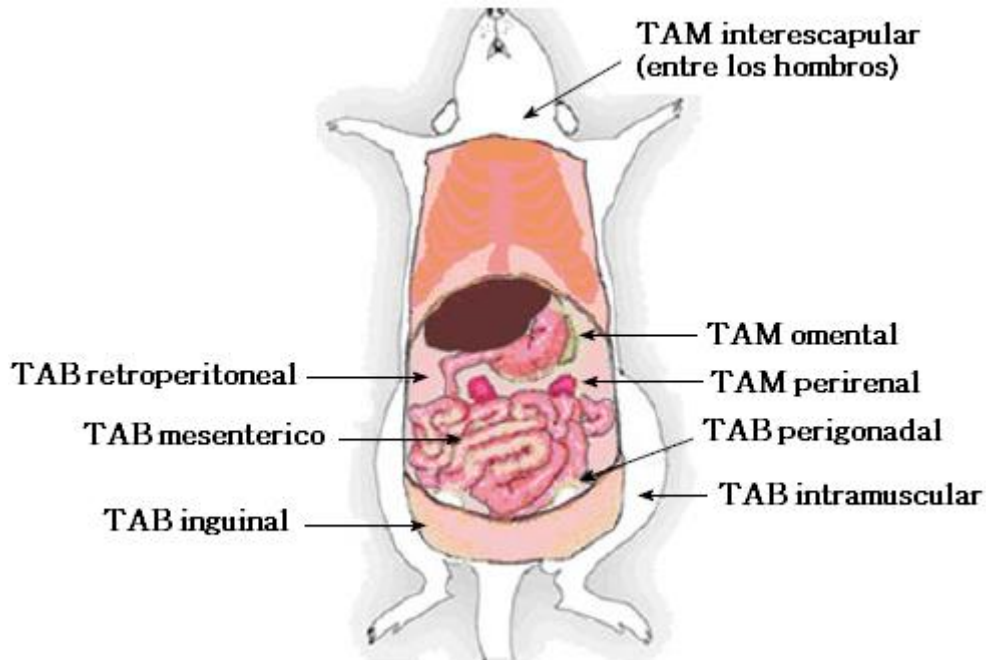


Figura 4 Distribución del TAM y TAB en roedores. Los depósitos de TAB en roedores incluyen los TAB subcutáneo anterior, incluyendo el TAB interescapular y axilar (localizado en la región escapular), TAB inguinal (unido a lo largo de la pelvis en el muslo de la extremidad posterior), TAB perigonadal (alrededor del útero y ovarios en hembras y en los testículos y epidídimo en los machos), TAB retroperitoneal (localizado entre la cavidad a lo largo de la pared dorsal del abdomen, atrás de los riñones pero no unidos a los riñones o mezclados con el TAM perirenal) y TAB mesentérico (recubriendo la superficie de los intestinos). El TAM en roedores está localizado en discretos depósitos vascularizados, subescapulares y cervicales en el lado superior anterior del tronco y cuello, así como en partes de la aorta y riñones. ^(11,12)

El TAB está distribuido a través del cuerpo y se clasifica en TAB visceral y TAB subcutáneo. El TAB subcutáneo está localizado bajo la piel y provee aislamiento del calor o frío. Mientras que el TAB visceral está localizado dentro del peritoneo y distribuido alrededor de los órganos internos. Y dependiendo su localización el TAB visceral se clasifica en mesentérico, perigonadal, retroperitoneal y omental.

El TAM se clasifica según su distribución anatómica en interescapular, axilar, paravertebral y perirenal. ⁽¹²⁾

Metabolismo del adipocito

El tejido adiposo blanco es importante en la homeostasis energética de mamíferos, debido a su capacidad de almacenaje de triacilgliceroles, la reserva energética más importante en el cuerpo.

Los triacilgliceroles surgen de la síntesis de novo dentro de los adipocitos, así como de la reesterificación secundaria a la lipólisis de lipoproteínas plasmáticas, fuente de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) de cadena larga que son los precursores de los triacilgliceroles.

Los adipocitos tienen una mínima expresión de la enzima glicerol cinasa y normalmente la gliceroneogénesis a partir de precursores de 3 carbonos es muy baja, por lo que el glicerol-3-fosfato es en gran medida derivado de la glucólisis en el adipocito. ⁽¹³⁾

Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una condición que exhibe una respuesta disminuida en los tejidos periféricos (adiposo, muscular y hepático) a las acciones biológicas de la insulina. ⁽¹⁴⁾

Existen diversas alternativas para medir la resistencia a la insulina. La prueba que es considerada como el estándar de oro para evaluar la resistencia a la insulina es la pinza euglicémica hiperinsulinémica (Clamp). Aunque debido a la dificultad para realizar el Clamp, se han propuesto diversas opciones para la medir la resistencia a la insulina como; la medición de la insulina plasmática en ayunas, la evaluación del índice homeostasis model assessment (HOMA-IR) y el quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI), Intravenous Glucose Tolerance Test (IVGTT), Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) y por último el índice Matsuda así como el Oral Glucose Insulin Sensitivity (OGIS). ⁽¹⁵⁾

Clamp

Se basa en la tasa de eliminación de glucosa (tasa de infusión de glucosa exógena) durante la fase hiperinsulinémica, el estudio provee una medición de la sensibilidad a la insulina periférica.

Usualmente, los estudios son realizados escogiendo una tasa de infusión de insulina de $40mU m^{-2}min^{-1}$ por 2h hasta lograr un nivel fisiológico de insulina en suero de 600 pmol/l (100mU/l). A este nivel de hiperinsulinemia, en sujetos saludables normales, la producción de glucosa hepática es totalmente suprimida, de este modo la estimación de la eliminación de glucosa es muy precisa.

IVGTT

Otra prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa que consiste en una administración intravenosa de glucosa (300mg/Kg de peso corporal durante 2 minutos y una infusión de insulina (13 – 20mU/Kg de peso durante 5 minutos. (Después de 20 a 25 minutos de la administración de glucosa se mide la concentración de glucosa e insulina plasmática.

Modelo de evaluación homeostática de resistencia a la insulina (HOMA-IR)

Es un índice de resistencia a la insulina basado en la concentración de insulina y concentración de glucosa.

$$\text{HOMA} = \left(\text{insulina} \left(\frac{\text{mU}}{\text{L}} \right) \right) \times \left[\frac{\text{glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22.5} \right]$$

QUICKI

Es un índice de sensibilidad a la insulina y utiliza una transformación logarítmica del producto de la concentración de la glucosa y la insulina.

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{insulina} \left(\frac{\text{mU}}{\text{L}} \right) + \log \text{glucosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)}$$

OGTT

Este procedimiento usa la concentración de glucosa e insulina medidas durante las siguientes dos horas después de una carga de 75 g de glucosa vía oral.

Otros índices han sido derivados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral.

Los OGIS y los índices Matsuda. Ambos métodos proveen un índice calculado usando una formula derivado del modelo de OGTT y la concentración de insulina y

han sido validados en sujetos diabéticos y no diabéticos contra el Clamp hiperinsulinémico euglicémico.

Obesidad y Resistencia a la insulina

Aproximadamente el 85% de la masa total de tejido adiposo en humanos delgados es subcutánea, mientras que el 15% remanente es intraabdominal incluyendo depósitos tanto viscerales como retroperitoneales.⁽⁷⁾ Es importante señalar que cambios en el tejido adiposo son fenómenos comunes para la mayoría de los individuos sanos y solo se convierte clínicamente relevante cuando la acumulación de grasa se asocia con problemas de salud.⁽¹⁰⁾

Existen dos teorías que tratan de explicar la relación molecular entre la obesidad y la resistencia a la insulina.

La primera es que debido a la sobrecarga nutricional, existe una falla en la acumulación del exceso de nutrientes. Esto resulta en la fuga de ácidos grasos de los adipocitos y la consecuente acumulación en otros órganos, tales como el hígado y el músculo esquelético. Por lo que esta acumulación inapropiada afecta negativamente la sensibilidad a la insulina en los tejidos involucrados.

La segunda hipótesis sugiere que el exceso de nutrientes en el tejido adiposo activa cambios cualitativos y cuantitativos en la producción de adipocinas. Éstas funcionan después como moduladoras de la sensibilidad a la insulina y tiene como consecuencia una resistencia a la insulina local y sistémica.⁽¹⁰⁾

Homeostasis de la glucosa

La homeostasis de la glucosa recae en la actividad de distintos tejidos. (Figura 6) Las células pancreáticas β , secretan insulina en respuesta niveles elevados de glucosa en condiciones postprandiales. La insulina aumenta la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo y también inhibe la producción de glucosa por el hígado suprimiendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis. En una condición de

ayuno, cuando los niveles de insulina son bajos, combinado con una elevación en las hormonas reguladoras como el glucagón, adrenalina y corticoides se promueve la producción de glucosa hepática y recientemente el cerebro ha emergido como un órgano que coordina muchos de estos efectos, de manera directa e indirecta censando la glucosa y la producción de órganos periféricos.⁽¹⁷⁾

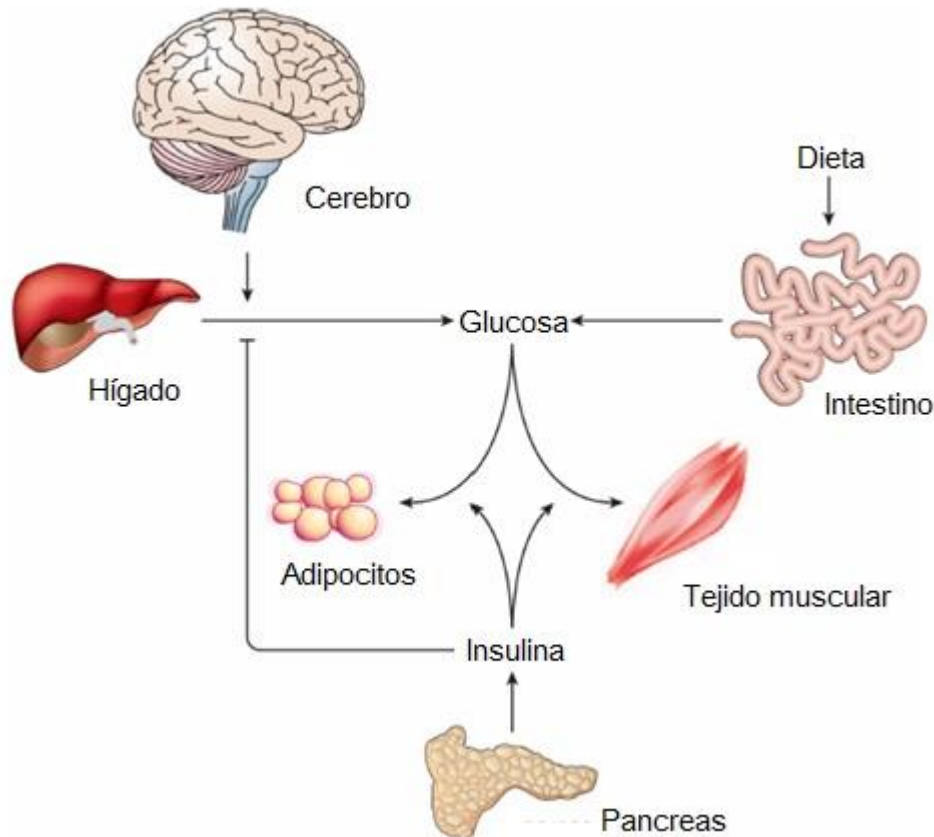


Figura 5 Acción coordinada de distintos órganos en la homeostasis de la glucosa. La concentración de glucosa plasmática incluye la absorción por el intestino y la liberación por el hígado. El hígado produce glucosa por degradación de glucógeno así como por gluconeogénesis y ambos procesos son inhibidos por la insulina. La glucosa sanguínea se remueve por absorción en prácticamente todos los tipos celulares, siendo los más importantes el tejido muscular y el adiposo, los cuales requieren insulina para captar glucosa. Recientemente se ha propuesto que el Sistema Nervioso Central (SNC) puede también sentir la concentración de glucosa plasmática mediante la regulación de la gluconeogénesis.⁽¹⁷⁾

Adipocitos como reguladores de la glucosa.

Al principio, la idea que el tejido adiposo pudiera tener un efecto considerable en el control glicémico sistémico, no fue fácilmente aceptada. Estudios recientes han determinado que el tejido adiposo implica solo una fracción de la disposición de glucosa después de la comida (alrededor del 10 al 15%), con la mayoría del resto tomada por el músculo. Aun así, ha sido igual de claro que alteraciones en el tejido adiposo tienen importantes implicaciones en la homeostasis de la glucosa.

Demasiada grasa (obesidad) y muy poca grasa (lipodistrofia) ambas son asociadas con resistencia a la insulina. La asociación entre obesidad y resistencia a la insulina es probablemente una relación de causa y efecto, ya que los estudios en humanos y animales indican que la pérdida/ganancia de peso correlaciona con el incremento/disminución de la sensibilidad a la insulina, respectivamente. ⁽¹⁸⁾

Datos de principios de los años 70's han sugerido una alteración en la sensibilidad a la insulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. Desde entonces la maquinaria de señalización intracelular de las acciones metabólicas de la insulina han sido dilucidadas y en buena medida ha sido demostrado que alteraciones en esta vía subyacen la fisiopatología en un estado de resistencia a la insulina.

Para un mayor entendimiento del mecanismo molecular que subyace la resistencia a la insulina, es necesario comprender conceptos clave de transducción de señales que incluyen la modificación proteínica por fosforilación y la interacción de los dominios proteínicos así como conocer las moléculas involucradas en complicadas redes de señalización.

Señalización celular

Las modificaciones postraduccionales como la fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, nitrosilación, acilación, metilación, lipidación y proteólisis, influyen en varios aspectos fisiológicos normales y patológicos. Las cinasas llevan a cabo reacciones de fosforilación por la transferencia de un fosfato gamma del ATP a grupos hidroxilo de varios sustratos incluyendo; lípidos, carbohidratos o aminoácidos cuyo proceso es revertido por su correspondiente fosfatasa. ⁽²⁰⁾

Las cinasas de proteínas representan un conjunto único, altamente dinámico y preciso que regula interruptores que controlan eventos biológicos en las células eucariotas. ⁽²¹⁾

Esta familia de enzimas tienen un dominio catalítico denominado proteína cinasa que comprende un segmento de 250 a 300 residuos de aminoácidos, correspondiente en alrededor de 30 KD. ⁽²²⁾

Todas las cinasas de proteínas hasta ahora caracterizadas con respecto a su especificidad de sustrato caen dentro de dos clases. Específicas de serinas y treoninas o específicas de tirosinas.

El estado de fosforilación de una proteína está controlado tanto por las cinasas de proteínas que son enzimas que transfieren un grupo fosfato a la proteína así como por proteínas fosfatasas que son enzimas que remueven el grupo fosfato. En vista del papel fundamental que desempeña la resistencia a la insulina en la patogénesis de la obesidad, la diabetes tipo 2 y el SM, las estrategias dirigidas a restaurar defectos en la señalización de la insulina se han convertido en una prioridad en la prevención de estos trastornos metabólicos. Los adipocitos, que ahora son reconocidos como un recurso de hormonas circulantes, citocinas y sustratos que influyen en el balance energético sistémico y de manera muy importante en la homeostasis de la glucosa, lo hacen a través del estímulo de la insulina. ⁽²³⁾

El primer paso por el cual la insulina incrementa el almacenamiento de energía o utilización, involucra la regulación del transporte de glucosa dentro de la célula mediado por el transportador facilitado de glucosa GLUT4. La localización celular del GLUT4 es gobernada por un proceso de reciclamiento regulado, en el cual la endocitosis, la clasificación dentro de vesículas, la exocitosis, la inmovilización, el acoplamiento y la fusión de proteínas están estrechamente regulados. ⁽²⁴⁾

Por otra parte, existe otro mecanismo que induce la translocación de GLUT4 a la superficie celular, aunque con una vía de señalización diferente, que implica la captación de glucosa por medio de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) e independiente a la insulina, aunque este mecanismo ha sido bien documentado en músculo esquelético. El efecto de la activación de la AMPK en tejido adiposo aún no es claro. ⁽²⁵⁾

La vía de la insulina es activada en una condición de disponibilidad de nutrientes, mientras que la vía de la AMPK es activada en condiciones de escases de nutrientes. ⁽²⁶⁾

Transporte de glucosa

Las membranas plasmáticas de las células de mamífero tienen uno o más sistemas de transporte de glucosa hacia el interior de estas, con la finalidad de mantener la concentración de glucosa en un intervalo fisiológico mediante mecanismos homeostáticos. ⁽²⁷⁾

La captación facilitada de glucosa dentro de la célula es mediada por la familia de transportadores SGLT2 y GLUTs. Estos transportadores permiten el transporte bidireccional de moléculas de hexosa a través de la membrana plasmática. ⁽²⁸⁾

Basados en estudios filogenéticos de la similaridad de las secuencias, la familia GLUT de los transportadores de glucosa está dividida en tres clases.

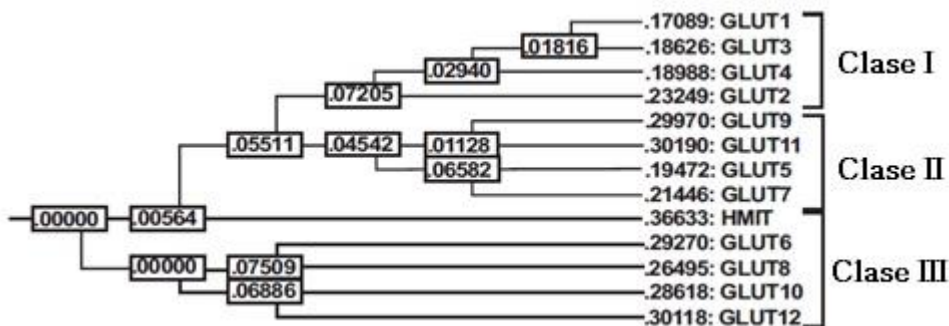


Figura 6 Filogenia de las clases de transportadores de glucosa Basado en el análisis filogenético de similitud de secuencia la familia GLUT se divide en tres clases. La Clase I incluye GLUT1-4 los cuales son 48-64% idénticos en humanos. La Clase II comprende al GLUT5, 7, 9, y 11 los cuales son 35-40% idénticos. La Clase III está compuesta por GLUT6, 8, 10, 12 y HMIT los cuales son 19-41% idénticos. ⁽²⁷⁾

Tabla 3 Especificidades de sustratos de los transportadores tipo GLUT. Se muestra la afinidad de los distintos transportadores GLUT así como el principal sitio de expresión de los transportadores. ^(27, 29)

Proteína	Km (mM)	Molécula transportada	Principal sitio de expresión
GLUT1	3-7	Glucosa, Galactosa, Manosa y Glucosamina.	Ubicuo
GLUT2	1.7	Glucosa	Hígado y células beta pancreáticas
GLUT3	1.4	Glucosa	Cerebro
GLUT4	6.6	Glucosa, ác. Dehidroascórbico y glucosamina	Músculo y adipocitos
GLUT5		Fructosa	Epitelio intestinal y testículos
GLUT6			Bazo, leucocitos y cerebro
GLUT7	0.3	Fructosa	Intestino delgado, riñón y testículos
GLUT8	2	Glucosa	Dentro de vesículas lisosomales
GLUT9			Hígado y riñón
GLUT10	0.3	Glucosa	Hígado y páncreas
GLUT11		Fructosa	Músculo
GLUT12			Corazón, próstata y glándula mamaria

Km para la 2-Deoxyglucosa o glucosa

GLUT1 es expresado en todas las células y sirve para mantener las concentraciones basales de glucosa. El transportador más importante sensible a la insulina es el transportador GLUT4, el cual es expresado en músculo, adipocito y cerebro. El grado de captación de glucosa en músculo y adipocitos es controlado por los siguientes parámetros. La concentración de glucosa dentro y fuera de la célula, el número total de transportadores tipo GLUT localizados en la membrana plasmática y las actividades cinéticas de estos transportadores. ⁽²⁹⁾

Vía de señalización de la insulina

La insulina es el agente anabólico fisiológico más potente hasta ahora conocido, promueve el almacenamiento y la síntesis de lípidos, proteínas, y carbohidratos e inhibe su rompimiento y liberación dentro de la circulación sanguínea.

La acción es iniciada con la unión de la hormona a la subunidad α extracelular del receptor de insulina, lo que activa una cascada de fosforilaciones que crea una compleja red que afecta múltiples procesos biológicos: ⁽³²⁾ (Figura 7)

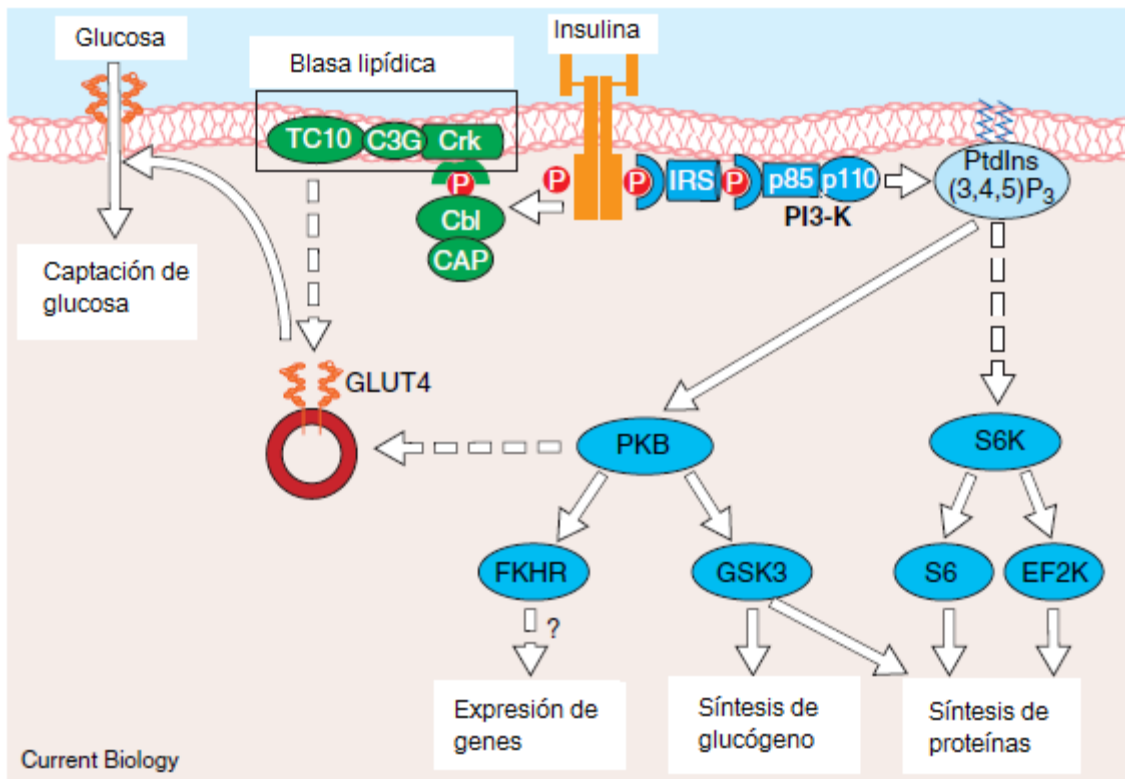


Figura 7 Vía de señalización de la insulina. Se muestra un panorama general sobre la regulación de las principales respuestas metabólicas en las células por la insulina. ⁽³⁶⁾

La insulina

La insulina es un dipéptido de 51 residuos de aminoácidos que contiene una cadena A y una B ligadas por puentes disulfuro. La cadena A comprende 21 aminoácidos mientras que la cadena B 30 aminoácidos, las dos cadenas están unidas por dos puentes disulfuro. (Figura 8)

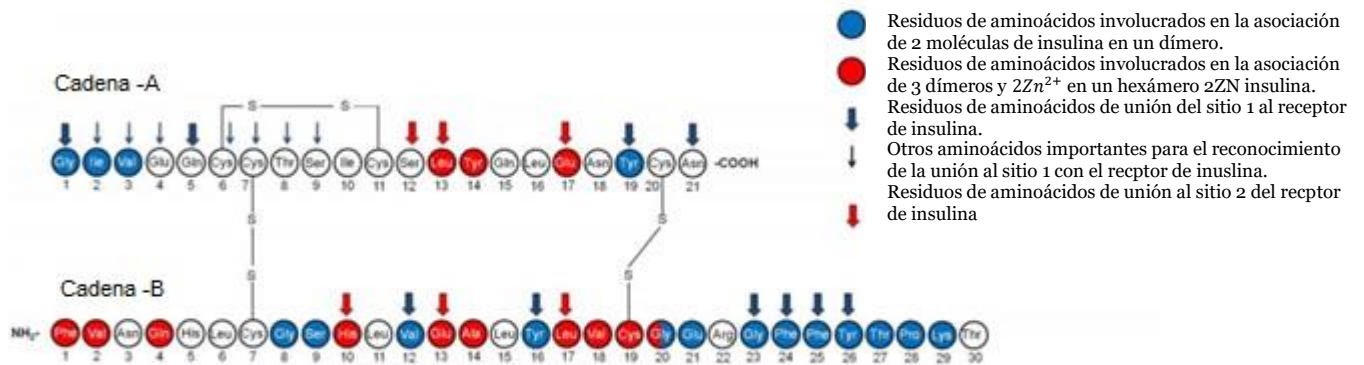


Figura 8 Estructura primaria de la insulina. Los residuos de aminoácidos envueltos en la asociación de dos moléculas de insulina en un dímero se muestra en color azul y el ensamblaje molecular de tres dímeros. se muestra en color rojo. Los residuos de aminoácidos pertenecientes a la unión de la insulina con el receptor de insulina en los sitios 1 y 2 están indicaos por flechas rojas y azules respectivamente. Los residuos de aminoácidos importantes para el reconocimiento del sitio 1 de unión al receptor de insulina pero no pertenece a este sitio están insicados con una flecha azul delgada.⁽³⁵⁾

La insulina es una hormona producida por las células beta de los islotes pancreáticos y es secretada hacia la circulación portal, principalmente en respuesta a gradientes de concentración de glucosa. Otros factores como aminoácidos, ácidos grasos, acetilcolina, polipéptido activado por adenilato ciclasa (PACAP), GIP, GLP-1, y algunos otros agonistas, juntos o en combinación, también influyen en este proceso.^{(36,37) (33,34)}

Los efectos de la insulina, varían de acuerdo a la función fisiológica de los tejidos u órganos concernientes y a la dependencia de la insulina en los procesos metabólicos. Los tejidos más responsivos ante la insulina son el músculo

esquelético, el tejido adiposo y el hígado. El primer paso por el cual la insulina incrementa el almacenamiento de energía o utilización involucra la regulación del transporte de glucosa dentro de la célula, mediado por Glut4. ⁽²⁴⁾

Receptor de Insulina (IR)

La insulina actúa a través la unión a su receptor, el cual es miembro de los receptores activados por ligando y de la familia tirosina cinasa de proteínas de señalización transmembranales, que colectivamente son reguladores importantes de la diferenciación celular, el crecimiento y el metabolismo.⁽³⁸⁾ (Figura 9) El principal papel fisiológico del receptor de insulina aparece en la regulación metabólica, mientras que los demás receptores tirosina cinasa se encargan de la regulación del crecimiento celular y/o diferenciación. Los receptores tirosina cinasa son alostéricamente regulados por su ligando y funcionan como dímeros. La naturaleza de la unión no covalente, dimérica, de la unión ligando receptor tirosina cinasa, es una característica de toda la familia, pero el receptor de insulina IR y los receptores relacionados cercanamente como el receptor IGF-1.⁽³⁷⁾

La unión de la insulina ocasiona cambios conformacionales en el receptor de insulina que activan el dominio tirosina cinasa de la porción intracelular de las subunidades. Una vez que los receptores de insulina tirosina cinasa están activados, se promueve la autofosforilación de sus subunidades β , donde la fosforilación de tres residuos de tirosina (Tyr^{1158} , Tyr^{1162} y Tyr^{1163}) son requeridas para una amplificación de la actividad de cinasa.⁽³⁸⁾

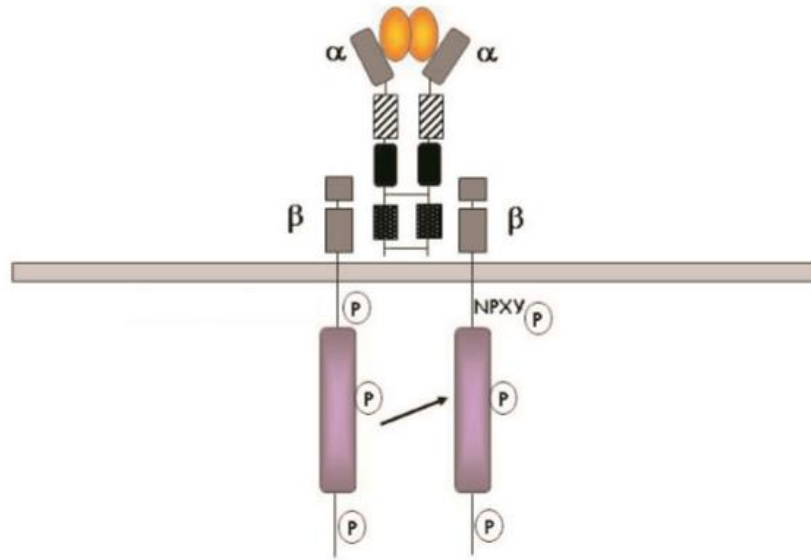


Figura 9 Esquema del receptor de Insulina. Conformado por dos subunidades α y dos subunidades β . El receptor de insulina consiste en dos subunidades extracelulares y dos subunidades transmembranales con actividad de tirosina cinasa. La unión de la insulina al receptor de insulina induce la transfosforilación de una subunidad por otra en tirosinas específicas en el asa de activación, resultando en un incremento en la actividad catalítica de la cinasa. ⁽²⁴⁾

Sustrato del Receptor de Insulina (IRS)

El receptor de insulina atrae un grupo de proteínas adaptadoras intracelulares que median su actividad biológica. Este receptor fosforila a proteínas de la familia IRS (IRS-1 a IRS-4) para propagar sus funciones metabólicas (Figura 10) y promotoras de crecimiento, entre estas moléculas, IRS-1 e IRS-2 destacan como puntos clave en la regulación con respecto a la señalización de la insulina. Es por esta razón que resultan un punto de convergencia para diversos estímulos extracelulares, la fosforilación de IRS-1/2 provee un mecanismo para el entendimiento de la señalización de insulina y otras vías de señalización. Incluyen el dominio de homología con pleckstrina (PH), el dominio de unión a fosfotirosinas (PTB) y el dominio de homología IRS-3 (IH-3). Muestran una alta homología en la secuencia de las dos isoformas de IRS. IRS-1 e IRS-2 forman un complejo con la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3K) en respuesta a la estimulación con insulina y son fosforilados de nuevo por PI3K. ⁽³⁹⁾

Adicionalmente, las proteínas IRS e IR comparten mecanismos de regulación en común: son activadas por la fosforilación de tirosinas y son negativamente reguladas por las proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs), fosforilación de serinas y la regulación inducida por ligando. Las proteínas IRS tienen tanto el dominio de homología a pleckstrina como el dominio de unión a fosfotirosinas cerca de la región N-terminal que cuenta con una alta afinidad de estos sustratos con el RI. Las proteínas IRS contienen hasta 20 sitios de tirosinas fosforilados después de la fosforilación por el RI, que se unen a moléculas intracelulares que contienen dominios de homología Src-2 (dominios SH2). ⁽⁴⁰⁾

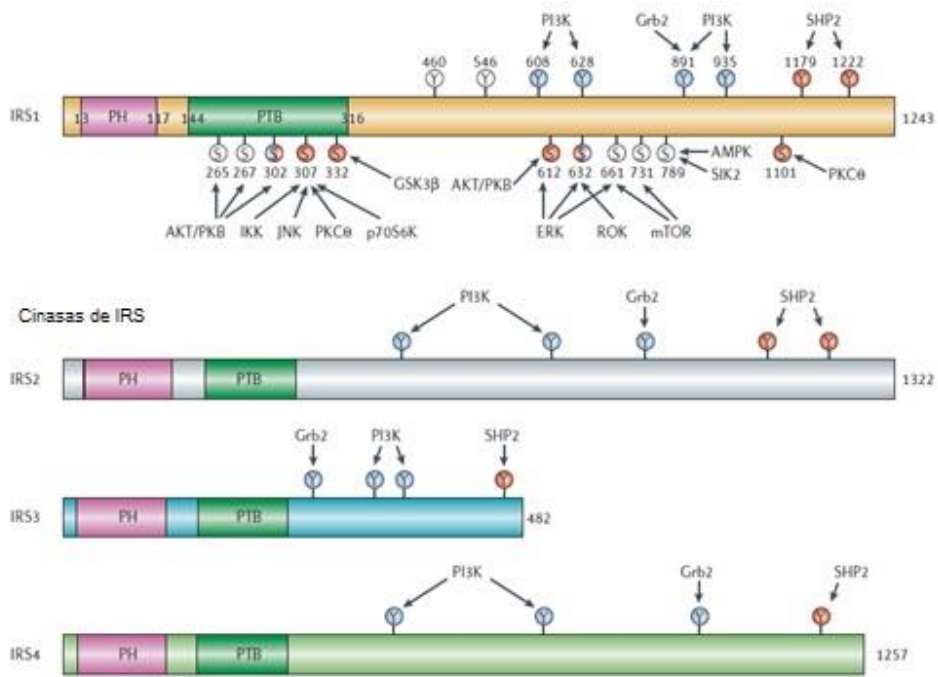


Figura 10 Organización estructural de los dominios de IRS. Las cuatro isoformas de IRS, IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4, comparten un dominio PH, un dominio PTB y varios sitios de fosforilación de residuos de tirosinas y serinas. Las posiciones de los residuos de tirosinas y que son fosforilados por el RI y los residuos de serina y las cinasas responsables de esta fosforilación. Los círculos azules representan sitios de regulación positiva, mientras que los círculos rojos sitios de regulación negativa. La combinación de ambos colores muestra sitios de regulación que han sido reportados tanto como reguladores positivos como negativos bajo diferentes condiciones. Los círculos blancos representan sitios de fosforilación con efecto desconocido. ⁽⁴⁰⁾

Cinasa 3 de Fosfatidilinositol (PI3K)

La activación de la cinasa 3 de fosfatidilinositol es un evento crítico temprano en las células, en respuesta a una variedad de factores de crecimiento, citocinas y hormonas incluyendo la insulina.⁽⁴³⁾

Las PI3K cinasas están codificadas por una familia de genes muy conservada la cual puede dividirse en tres clases. (Figura 11) La clase 1a de las PI3K existe como un heterotrímero el cual consiste en una subunidad adaptadora y una reguladora asociada estrechamente a una subunidad catalítica. Las PI3K de clase 1b se asocian con una familia distinta de subunidades adaptadoras a las subunidades adaptadoras de la clase 1a y no existe evidencia que señale que son activadas por insulina. La clase 2 de las PI3K son ampliamente expresadas y pueden ser activadas por insulina. La clase 3 de las PI3K son también ampliamente expresadas pero estas solo usan fosfatidilinositol como sustrato.⁽⁴¹⁾

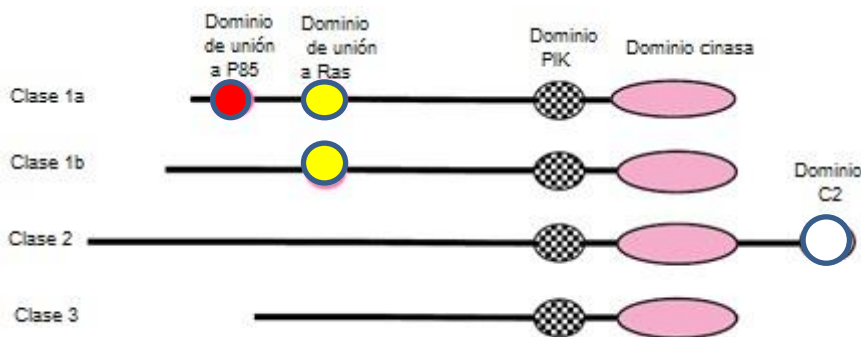


Figura 11 Estructura del dominio de la subunidad catalítica de PI3K. El dominio de unión de p85 se muestra en rojo, los dominios de unión a Ras en amarillo, los dominios de homología de la cinasa de fosfoinositidos en blanco con negro y los dominios cinasas en rosa y el dominio C2 en blanco.⁽⁴¹⁾

En mamíferos, estas PI3Ks, consisten en una subunidad catalítica (p110 α , p110 β o p110 δ) y una subunidad reguladora más pequeña, de la que existen cinco

isoformas (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α and p50 α) que colectivamente son conocidas como P85s.

En células estimuladas por insulina, el reclutamiento del complejo p85-p110 hacia los residuos de fosfotirosinas en el receptor activado o en moléculas activadas en la subunidad p85, lo que conlleva a aproximar la subunidad p110 a los lípidos cercanos y libera de la inhibición a p110, permitiendo la producción de Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns-3,4,5)-trifosfato.⁽⁴²⁾ (Figura 12)

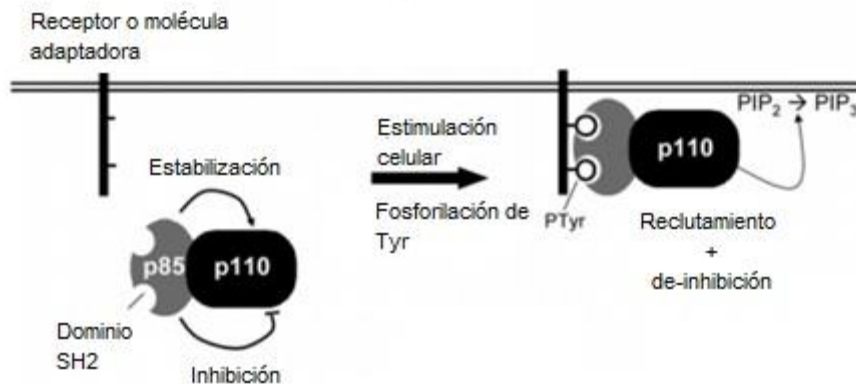


Figura 12 Mecanismo de regulación de la PI3K clase Ia. P85 estabiliza la p110 e inhibe la actividad de cinasa de lípidos en células sin estímulo. El reclutamiento de p85-p110 al receptor activado o a moléculas adaptadoras, después del estímulo celular permite la des-inactivación del complejo p85-p110 y su interacción con los sustratos de lípidos cercanos.⁽⁴²⁾

Los receptores con actividad de tirosinas cinasas, incluyendo al receptor de insulina, estimulan a las PI-2 cinasas clases 1a. Estas enzimas fosforilan al fosfatidilinositol, PtdIns-4-fosfato y al PtdIns-(4,5)-bisfosfato, aunque de manera preferentemente lo hacen con el de PtdIns (4,5) P_2 , por lo que el principal producto es el PtdIns (3,4,5)-trifosfato.⁽⁴²⁾

La PI3K posee especificidad dual, actuando como una cinasa de fosfolípidos así como teniendo actividad de cinasa de serina. La enzima PI3K consiste en una subunidad catalítica y una reguladora, cada una de las cuales ocurre en varias formas, la activación de la subunidad catalítica depende de la interacción de dos dominios SH2 en la subunidad reguladora, con motivos fosfotirosina específicos

en las proteínas IRS de la secuencia (pY)MXM and (pY)XXM. PI3K activa reguladores críticos de la señalización de la insulina, catalizando la formación de un segundo mensajero PIP_3 en la célula para que proteínas con dominio PH pueden unirse al PIP_3 y volverse localizables en la misma región, lo cual permite su activación. ^(41, 44)

Proteína Cinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK)

PDK-1 es una enzima clave en la vía de señalización de la insulina, que se encuentra río debajo de la PI3K, PDK1 consiste en una proteína cinasa con un núcleo catalítico de una extensión de 75 aminoácidos en la región N-terminal y un dominio PH en la región C-terminal. ⁽⁴⁵⁾ (Figura 13)

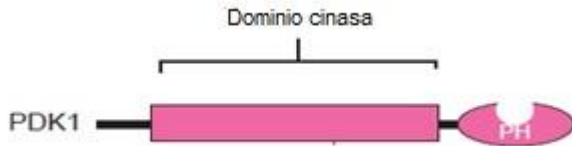


Figura 13 Organización estructural de PDK. Contiene un dominio PH que interacciona con los fosfoinosítidos y un dominio cinasa con el que transfiere fosfatos a la proteína cinasa B (AKT/PKB). ⁽⁴⁶⁾

La proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1), es responsable de la activación de la proteína cinasa B (AKT/PKB) y proteínas cinasas C atípicas (aPKCs). PDK1 fosforila los bucles de activación de AKT/PKB en la Thr 308 y de manera relevante AKT/PKB requiere una segunda fosforilación en la *Ser*⁴⁷³ para su completa activación y dado que PDK1 es incapaz de fosforilar la Ser 473, la existencia de PDK2 se ha postulado. (Figura 14)

Aunque existe controversia por la cinasa que fosforila a la *Ser*⁴⁷³ por lo que se han propuesto otras moléculas incluyendo la proteína cinasa C α (PKC α), la cinasa ligada a integrinas, la proteína cinasa mutada telangiectasia-ataxia (ATM), proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-PK) y autofosforilación por AKT misma, Incluso el blanco mamífero de rapamicina mTOR, en complejo con la proteína homóloga a LST8 asociada a MTOR (mLST8), mSin y rictor. ^(43, 46)

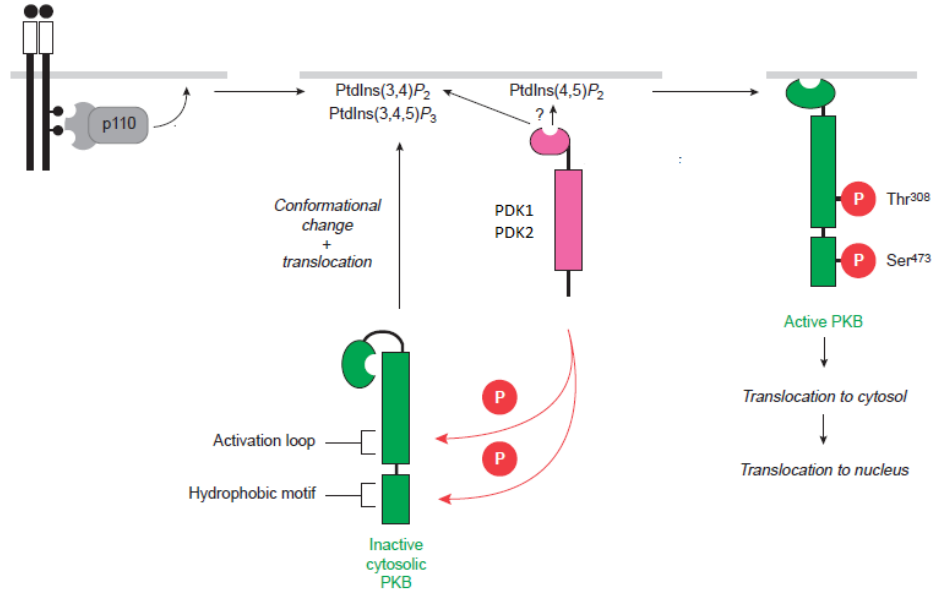


Figura 14 Mecanismo de regulación y activación de PKB α por PDK-1 y PDK-2. La estimulación de células con insulina incrementa la concentración de PtdIns (3,4,5)-Trisfosfato. Lo que desencadena el reclutamiento de PKB α y aumenta la proximidad con PDK1, la cual transfiere un fosfato a PKB α en el residuo de Thr308 mientras que PDK2 en residuo Ser 302. ⁽⁴⁶⁾

Proteína cinasa B / AKT

AKT es una cinasa de serina/treonina que es un blanco que se encuentra río abajo de la vía de señalización de PI3K.

Existen tres isoformas de AKT/(PKB) codificadas por distintos genes y la funcionalidad específica de las isoformas ha sido demostrada en vías de señalización de metabolismo y crecimiento. Akt1 o PKB α , Akt2 o PKB β y Akt3 o PKB γ . (Figura 15) Los tres genes tienen más del 85% de homología, los primeros 100 aa de la región N-terminal poseen un dominio PH que une fosfolípidos, una región pequeña rica en glicina que une el dominio PH con el dominio catalítico. Las tres isoformas de AKT/PKB poseen residuos conservados de serina y treonina (T308 y S473 en Akt/PKB α) que junto con el dominio PH son críticos para la activación de Akt/PKB. ⁽⁵⁰⁾

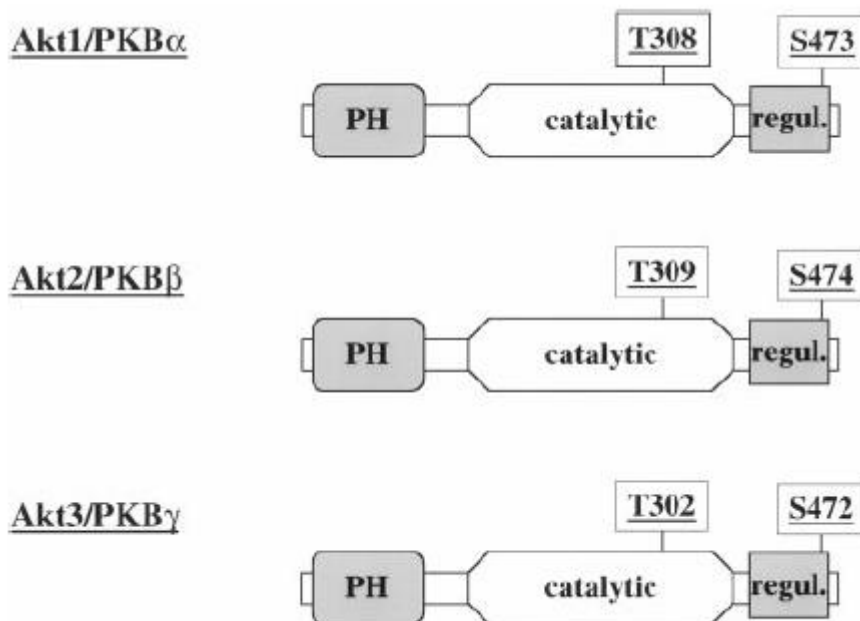


Figura 15 Organización estructural de las isoformas de AKT. Todas las isoformas de AKT/PKB contienen un dominio PH, un dominio catalítico y un fragmento regulador en la región C-terminal. Así como residuos de Ser y Thr conservados que son necesarios para la activación de AKT/PKB. ⁽⁵⁰⁾

AKT/PKB activada fosforila múltiples sustratos y controlan una variedad de respuestas río abajo dependiendo del tipo celular. En algunos casos, la fosforilación por sí misma regula la actividad de sus blancos, mientras que en otros la unión de las proteínas 14-3-3. ⁽⁴⁸⁾

La actividad de AKT es modulada río abajo de PI3K, siguiendo un proceso de varios pasos, AKT en su región N-terminal contiene un dominio PH, el cual es reclutado a sitios de la membrana plasmática con un alto contenido de PtdIns-(3,4,5)-trisfosfato, PtdIns-(3,4)-bisfosfato producidos por PI3K. Una vez reclutada a la membrana plasmática, AKT es fosforilada en dos sitios para su completa activación, uno en el dominio catalítico en el residuo *Thr*³⁰⁸ de AKT1 por PDK y la otra dentro del dominio hidrofóbico terminal *Ser*⁴⁷³. Una vez activada AKT fosforila sustratos distribuidos en toda la célula como la glucógeno sintasa cinasa (GSK3), regulador de la síntesis de glucógeno, la GTPasa Rheb activadora del complejo de proteínas de esclerosis tuberosa TSC1/2, regulando mTOR y la síntesis de proteína, el factor de transcripción FOXO, regulando la expresión de genes gluconeogénicos, regulando la apoptosis y de manera muy importante la proteína Rab GTPasa miembro de la familia de proteínas con dominio Tre-2/BUB2/cdc 4 (TBC1D4) también conocida como sustrato de AKT (AS160) implicada en la regulación de la captación de glucosa y múltiples funciones celulares. ⁽⁴⁷⁾

AKT/PKB puede regular el metabolismo de glucosa a muchos niveles, aumenta la captación de glucosa en tejidos responsivos a insulina como el tejido adiposo, afectando los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3 y GLUT4.

AKT/PKB induce la expresión de GLUT1 y GLUT3 en células de hematoma de ratón (Hepa1c1c7) y la translocación de GLUT4 a nivel de membrana plasmática en músculo esquelético y adipocitos. ^(49,50, 52)

TBCD1, TBCD4/AS160 y las proteínas Rabs

AKT tiene diversos blancos susceptibles a ser fosforilados, sin embargo los relacionados a la translocación de GLUT4 son dos miembros de la familia de proteínas con dominios tre-2/USP6, BUB2, cdc16 (TBC1D1), el sustrato de AKT de 160 kDa (también conocido como AS160 o TBC1D4).⁽⁵³⁾ (Figura 16)

Comparten solo el 50% de homología entre estas dos proteínas, los dominios GAP son 79% idénticos y existen sitios comparables de fosforilación susceptibles a ser fosforilados por AKT. Estas proteínas contienen dominios de unión a fosfotirosinas (PTB) en la región N-terminal y un dominio RAP-GAP (Proteína activadora de GTPasas) en la región C-terminal. (Figura 21)

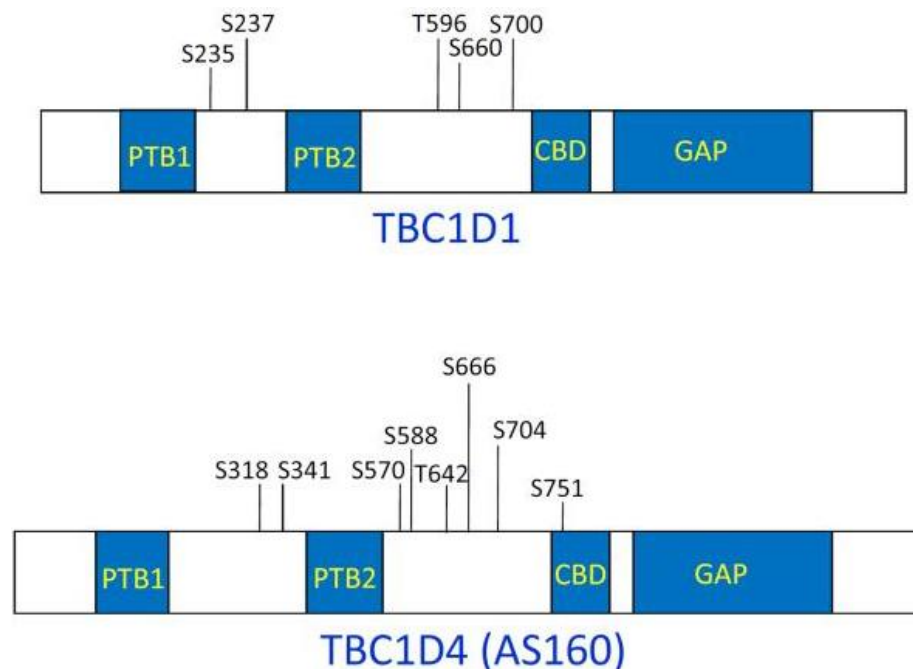


Figura 16 Organización estructural de los dominios de TBC1D1 y TBC1D4. Ambas proteínas comparten el motivo PTB, dominio de unión a calmodulina (CBD) y un dominio con actividad de GTPasa (GAP). Se muestra cada sitio que puede ser fosforilado en respuesta a insulina o ejercicio en músculo esquelético.⁽⁵⁵⁾

Son proteínas activadoras de GTPasas que actúan sobre pequeñas proteínas G de la familia Rab. La actividad del dominio GAP actúa sobre pequeñas proteínas

G de la familia Rab y se han señalado a las proteínas Rabs 2, 8, 10 y 14 como sus blancos. Las proteínas Rab G son interruptores moleculares, en su forma unida al GTP transmiten señales río abajo a sus efectores y por lo tanto son elementos esenciales en la señalización dependiente de insulina. Por lo que las GTPasas de Rab son reguladores esenciales del tráfico vesicular intracelular a través de la atracción de efectores mecánicos responsables de la movilización y fusión de vesículas. ⁽⁵⁵⁾

La insulina incrementa la fosforilación en AS160 en adipocitos 3T3-L1 y músculo esquelético. En un estado basal, la actividad GAP de AS160 mantiene su blanco Rab inactivo, unido a la forma de GDP, consecuentemente retiene a GLUT4 en compartimentos intracelulares. Debido al estímulo por insulina, la fosforilación de AKT sobre AS160 desactiva su actividad GAP, por lo que las proteínas Rab adquieren su conformación activa unida a GTP, de este modo permitiendo el tráfico de GLUT4. ⁽⁵⁴⁾ (Figura 17)

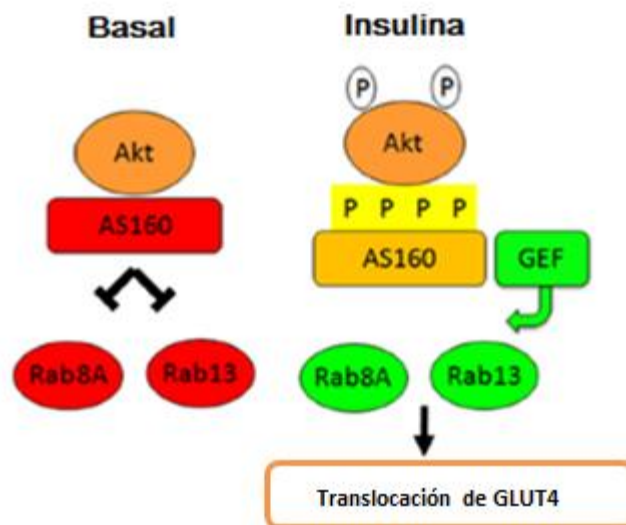


Figura 17 Esquema de interacción entre AS160 y las proteínas Rabs. El estímulo con insulina ocasiona que AKT transfiera un fosfato a AS160 e inhibe la actividad GAP. Esto permite que el factor de intercambio de GDP/GTP y conducen la activación río abajo de AS160 de las Rabs para la translocación de GLUT4. ⁽⁵⁴⁾

En un estado basal, la proteína con actividad de GTPasa (GAP) de AS160 suprimen la actividad de Rab8A y Rab13. Mientras que el estímulo con insulina, la

proteína AKT fosforila a AS160 e inhibe su actividad GAP. Esto permite el intercambio GDP/GTP mediado por el factor de intercambio de GDP/GTP, mediando la actividad de las Rab8A y Rab13, permitiendo la translocación de glucosa. ⁽⁵⁴⁾

Cinasa Dependiente de AMP (AMPK)

AMPK tiene un papel central en la regulación del balance energético, tanto a nivel celular como sistémico. Actúa como un sensor energético en la regulación de la homeostasis de lípidos y glucosa y su activación permite numerosos cambios metabólicos, es por esto que es crítica en el control de desórdenes metabólicos como la obesidad, diabetes mellitus tipo II y por ende en el SM. ⁽⁶⁰⁾

AMPK transfiere fosfatos y regula muchas proteínas concernientes al metabolismo de los nutrientes, en gran parte actuando para suprimir vías anabólicas consumidoras de ATP mientras simultáneamente activa vías catabólicas productoras de ATP. ⁽⁵⁶⁾

Estos efectos pueden ocurrir a través de distintos mecanismos con cursos de tiempo diferentes.

- 1) Efectos agudos sobre el metabolismo debido a la fosforilación directa de enzimas metabólicas.
- 2) Efectos a largo plazo debido a cambios en la expresión de genes
- 3) Combinación de efectos a largo plazo junto con agudos

Estructura de AMPK

AMPK es un heterotrímero que consiste de una subunidad α catalítica y subunidades reguladoras β y γ . Cada una de estas subunidades existe como múltiples isoformas ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \gamma_1, \gamma_2$ y γ_3) dando como resultado 12 posibles combinaciones de heterotrímeros, con variantes de splicing añadiendo además a las variantes de posibilidades. (Figura 18)⁽⁶²⁾

Las dos isoformas de la subunidad α , α_1 y α_2 contienen un dominio cinasa en la mitad de la región N-terminal. La región C-terminal es requerida para formar un complejo con las subunidades β y γ .

Aparentemente no hay diferencia entre las especificidades por los sustratos entre las subunidades catalíticas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, incluso en algunos tipos celulares la subunidad catalítica $\alpha 2$ tiene una localización preferentemente nuclear. En el tejido adiposo la subunidad catalítica predominante es la isoforma $\alpha-1$ y abarca la mayor parte de la actividad de AMPK.

La actividad de AMPK es incrementada por tres mecanismos. Primero, hay un efecto alostérico directo del AMP. Segundo, la unión del AMP permite al asa catalítica ser fosforilada en el residuo *Thr*¹⁷² por alguna de las potenciales AMPKK's (quinasas de AMPK). La fosforilación en la *Thr*¹⁷² es esencial para la activación de AMPK.⁽⁵⁸⁾

El tercer mecanismo es que la unión de AMP inhibe la desfosforilación de la α *Thr*¹⁷² por proteínas fosfatasas, como la proteína fosfatasa 2C- α .

Estos tres efectos sobre AMP hacen al sistema muy sensible a pequeños incrementos en AMP.

Las subunidades β contienen dos regiones conservadas localizadas en el centro de la región C-terminal. La región C-terminal es requerida para formar un complejo funcional $\alpha\beta\gamma$ que es regulado por AMP, mientras que la región central conservada es reconocida como un dominio de unión a glucógeno.

Las subunidades γ (γ_1 , γ_2 y γ_3) contienen una región N-terminal variable, seguida de 4 repeticiones en tándem de una secuencia de 60 aminoácidos llamados motivos CBS. Estos actúan para formar dos dominios denominados dominios Bateman, cada uno de los cuales une a una molécula de AMP.

Cualquier estrés metabólico que inhiba la producción de ATP o acelere el consumo de ATP, tenderá a incrementar la relación celular ADP:ATP, la cual será aumentada por la adenilato cinasa en un mayor incremento de la relación AMP:ATP, con la consecuente activación de AMPK.⁽⁶²⁾

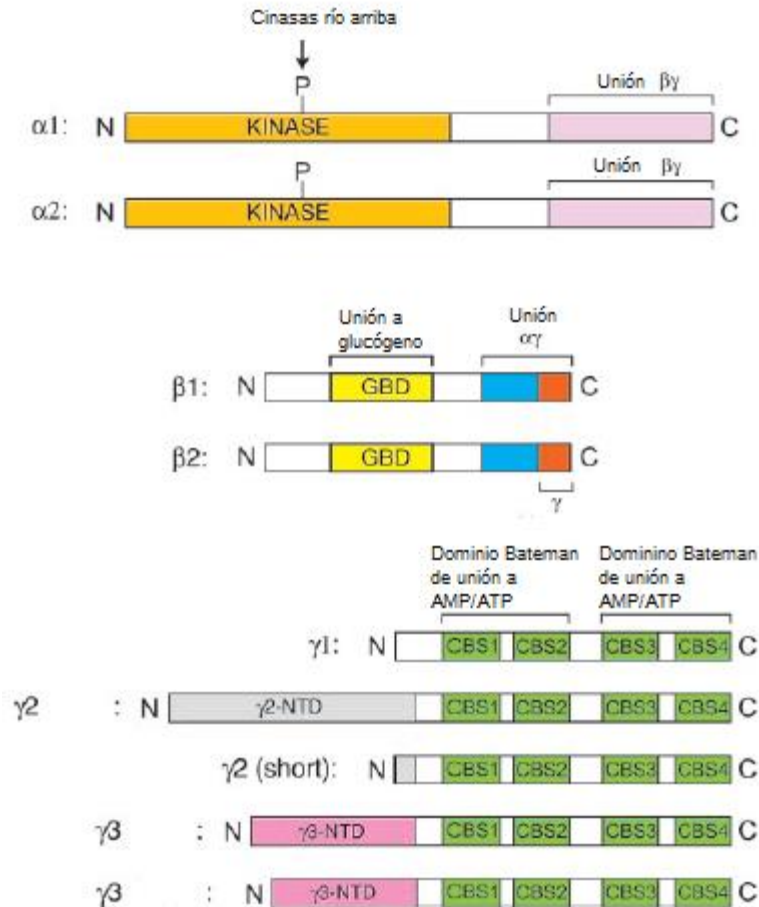


Figura 18 Organización estructural de los dominios de la isoformas de AMPK. Muestra las isoformas de AMPK(α,β,γ) con sus variantes de splicing así como las regiones del mismo color indican que están relacionadas con la misma función.⁽⁶²⁾

Se han identificado dos cinasas que median la fosforilación de AMPK en la subunidad catalítica α en la Thr¹⁷², la primera es un complejo formado por la LKB1 (cinasa de hígado B1) y dos subunidades accesorias denominadas STRAD y MO25, la fosforilación de AMPK involucra los cambios en los niveles de AMP, aunque no activan al complejo de LKB1, el efecto de los nucleótidos es hacer a AMPK un mejor sustrato para ser fosforilado por LKB1.

La segunda es la CaMKKβ (Ca²⁺ /proteína cinasa dependiente de la calmodulina cinasa β) lo que hace que los incrementos intracelulares de la concentración de Ca²⁺ sean capaces de activar a AMPK independientemente de los cambios en los

nucleótidos de adenina en células que expresan la proteína cinasa- β de la cinasa dependiente de calmodulina (CaMKK β).

Por otro lado, las proteínas fosfatasa PP2a y PP2c tienen un papel importante en la regulación de la fosforilación en la Thr¹⁷² y consecuentemente con la actividad de AMPK, aunque el mecanismo exacto que modulan su acción permanece aún poco entendido. ⁽⁵³⁾ (Figura 19)

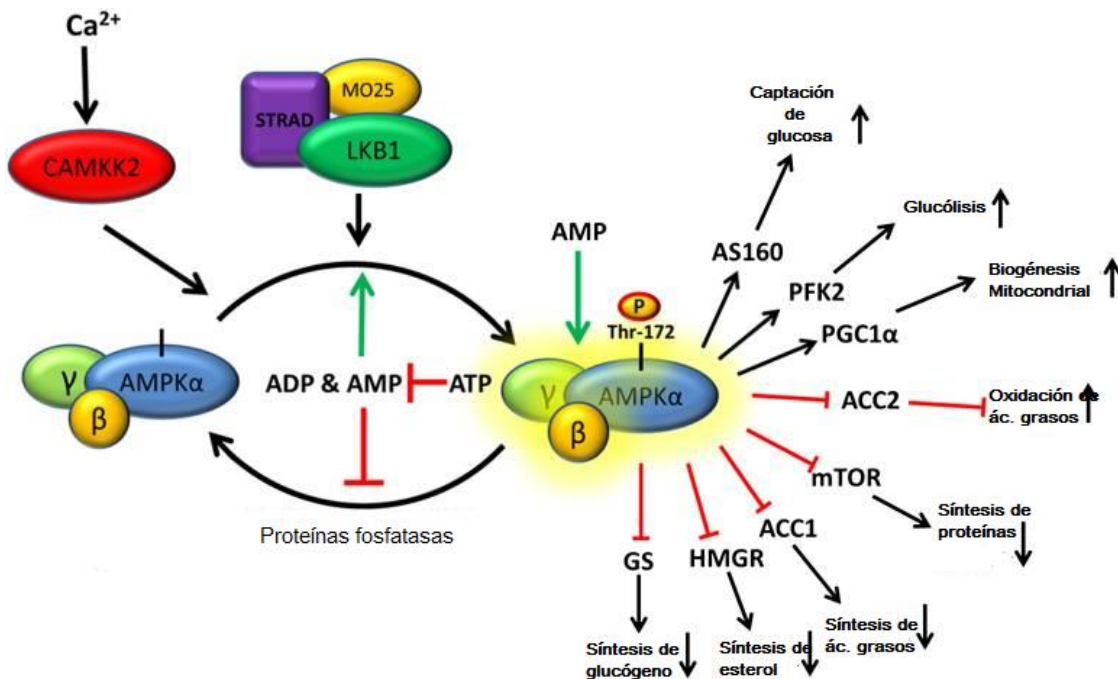


Figura 19 Vía de señalización de AMPK. El complejo constitutivamente activo de LKB1-STRAD-MO25 continuamente transfiere un fosfato a AMPK, la cual, en ausencia de señales de baja energía es rápidamente desfosforilado por proteínas fosfatasa.

En condiciones de estrés metabólico, cuando las concentraciones, cuando la tasa de consumo de ATP excede la producción, por lo que la relación ADP:ATP incrementa. Lo que provoca un cambio conformacional en AMPK y la hace susceptible a ser fosforilada. La activación de AMPK media su control sobre el metabolismo por la fosforilación de muchos blancos río abajo, (AS160, PFK2, PGC1 α , ACC2, mTOR, ACC1, HMGR, y GS entre otras) resultando en el restablecimiento de la homeostasis energética, inhibiendo vías anabólicas y promoviendo vías catabólicas. ⁽⁶³⁾

Activadores de AMPK

Numerosos activadores de AMPK fisiológicos, naturales, farmacológicos y hormonales son conocidos.⁽⁶¹⁾

Fisiológicos

En tejido adiposo muscular, tanto el ejercicio como la restricción calórica, son factores estresantes metabólicos que pueden activar a AMPK. De manera muy interesante, se ha encontrado que contracciones de alta intensidad activan preferentemente a heterotrímeros que contienen la isoforma catalítica $\alpha 1$; mientras que los conformados por la isoforma $\alpha 2$ son activados por ejercicios de baja intensidad.

Hormonales

Existen hormonas endógenas que también pueden activar a AMPK dentro de las que destacan:

La Leptina, que es una hormona sintetizada y secretada por los adipocitos que actúan sobre el cerebro y regula la ingesta de comida y el peso corporal.

La activación de AMPK por leptina ha sido demostrada en tejido adiposo y músculo esquelético, aunque puede actuar en casi todos los tejidos debido a que casi todos expresan el receptor a la leptina, el mecanismo por el cual activa a AMPK es por el incremento de la relación AMP/ATP, esto se demostró en músculo esquelético y de manera muy importante esto solo ocurre en los heterotrímeros que contienen a la isoforma $\alpha 2$. La adiponectina es una proteína secretada por el tejido adiposo, esta hormona actúa a través de dos receptores (adipoR1 y adipoR2) los cuales son expresados por el tejido adiposo y muscular donde ha sido demostrado que activa a AMPK y regula los niveles de glucosa y oxidación de ácidos grasos.^(64,58)

Farmacológicos

Dada la importancia que la activación de AMPK podría tener en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, numerosos agentes farmacológicos han sido

desarrollados, basados en su mecanismo de acción son divididos en cuatro clases.⁽⁶¹⁾

1. Activadores que actúan indirectamente a través de la inhibición de la síntesis de ATP.

Dado que la depleción de los niveles de ATP causa el incremento en los niveles de AMP y ADP, AMPK es activado por cualquier compuesto que inhibe la síntesis de ATP.

En los últimos años, más de 100 productos naturales o extractos derivados de plantas, han sido reportados como activadores de AMPK, dentro de los que destacan los productos derivados de la planta medicinal Galega officinalis de la cual fueron obtenidos la fenformina y la metformina. (Figura 20)

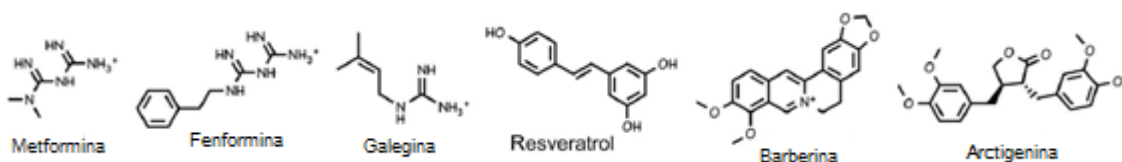


Figura 20 Estructura química de los activadores de la AMPK que actúan indirectamente a través de la inhibición de la síntesis de ATP. Dentro de este grupo se encuentran la metformina, fenformina y el resveratrol entre otros.

En el caso de la metformina, que en su forma farmacéutica es el medicamento de primera elección para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, es un fármaco que entra por el transportador de cationes orgánicos (OCT-1) lo que conduce a la inhibición del complejo 1 de la cadena respiratoria por lo que ocasiona un desbalance en los niveles de AMP/ATP que es sentido por AMPK y tiene como consecuencia la activación de la cinasa.

2. Pro-fármacos que son convertidos en análogos de AMP dentro de la célula.

El 5-Aminoimidazol-4-carboxamida Ribonucleótido (AICAR) es un análogo de adenosina que es tomado por las células por los transportadores de adenosina y fosforilado por la adenosina cinasa y convertido a ZMP. ZMP es un análogo de AMP que se une a AMPK en los mismos sitios que se une AMP y mimetiza todos

los efectos del AMP en el sistema de AMPK, aunque el ZMP tiene una menor potencia comparado con el AMP.

Recientemente se ha desarrollado un compuesto sintético que actúa por un mecanismo tipo pro-fármaco. C13 es un diéster fosfonato, es tomado por las células y convertido por las esterasas celulares en C2, un análogo de AMP que es un activador alostérico dos o tres órdenes de magnitud más potente que el AMP y cuatro órdenes de magnitud más potente que el ZMP. Otra ventaja del C13 sobre el AICAR es que el C2, a diferencia del ZMP, no modula otras enzimas sensibles al AMP como la glucógeno fosforilasa, fosfofructocinasa o la 1,6-bisfosfatasa. (Figura 21)

Sin embargo el C2 es selectivo para los complejos que contienen a la isoforma $\alpha 1$ en lugar de la isoforma $\alpha 2$.

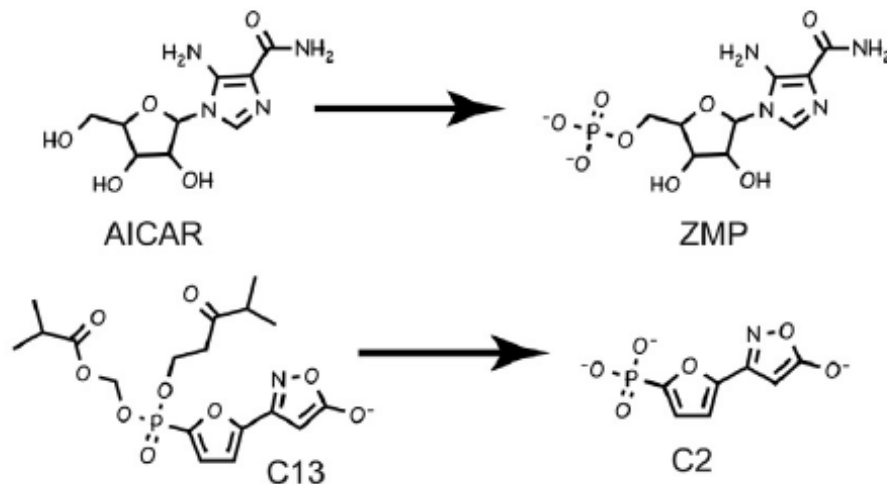


Figura 21 Pro-fármacos que son convertidos en análogos de AMP dentro de la célula. Dentro de este grupo se encuentran al AICAR y el C13.

3. Activadores alostéricos que se unen directamente a AMPK en sitios distintos a los de unión del AMP.

El compuesto A-769662 no incrementa la relación celular de ADP/ATP o AMP/ATP, aunado a esto, activa a AMPK en células mutadas en la S108A en la subunidad $\beta 1$, insensibles al AMP, sin desplazar al AMP de sus sitios de unión en la subunidad γ , sugiriendo que se une a sitios diferentes a los del AMP, aunque, como el AMP, causan tanto la activación alostérica y la protección contra la desfosforilación en la Thr172. Y es selectivo para la fosforilación de los complejos formados por la subunidad $\beta 1$ y no por lo de la $\beta 2$.

Otro activador, incluso más potente, es el 991, este compuesto muestra mayor selectividad por los complejos formados por la isoforma $\beta 1$, sin embargo a concentraciones mayores tiene la capacidad de activar a los complejos que formados con la isoforma $\beta 2$.

Un tercer compuesto, el MT 63-78 también muestra una selectividad por los complejos formados por la isoforma $\beta 1$, sin embargo esto no ha sido totalmente comprobado.

Por último el salicilato, es considerado un pobre activador de los complejos formados por la isoforma $\beta 1$ y la evidencia experimental apunta a que se une al mismo sitio que el A-769662. (Figura 22)

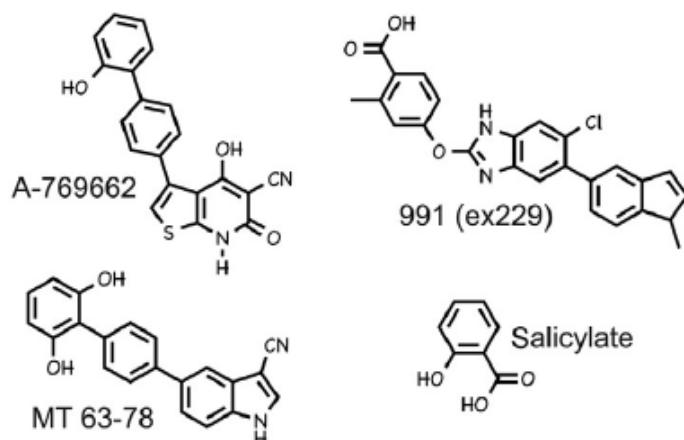


Figura 22 Estructuras químicas de los activadores alostéricos de la AMPK que se unen directamente en sitios distintos a los de unión del AMP. Dentro de los que se encuentran el A-769992 y el salicilato entre otros.

4. Estrés oxidativo.

Este mecanismo es un tanto controversial, debido a que existe la evidencia que AMPK es activada por la oxidación de dos residuos de cisteína (Cys299 y Cys304) presentes en la región de auto inhibición de la subunidad catalítica α , sin embargo, también se ha reportado que este mismo tratamiento modifica la relación AMP/ATP, lo que apuntaría a que la activación de AMPK fuese debida a su mecanismo de activación canónico. Aunque recientemente se ha reportado que AMPK es inactivada por el estrés oxidativo, debido a que la activación de AMPK fue prevenida por la tioredoxina, en cardiomiocitos, por lo que el efecto del estrés oxidativo permanece aún incierto. ⁽⁶⁴⁾

AMPK y la captación de glucosa

Adicionalmente a la insulina, el ejercicio/contracción, o las alteraciones en la homeostasis metabólica con agentes estresantes como desacoplantes mitocondriales y bajo condiciones de hipoxia, todos incrementan los niveles de GLUT4 a nivel de membrana plasmática y promueven la captación de glucosa en músculo esquelético.

Sin embargo, a diferencia de la insulina, la cascada de señalización que media los efectos de la contracción muscular y de estresores metabólicos es independiente de la vía PI3K / Akt, lo que es atribuible a la vía de señalización de la cinasa dependiente de AMP (AMPK). ⁽⁶⁶⁾ (Figura 23)

Esta convergencia provee el mecanismo y punto de encuentro entre el transporte de glucosa estimulado por el ejercicio y por la insulina.

AS160 y TBC1D1 comparten muchas características en común, sin embargo dentro de sus diferencias destacan que AS160 tiene más fosfomotivos responsivos de AKT, teniendo un papel más importante que TBC1D1 en la translocación de glucosa mediado por insulina. A diferencia de TBC1D1 que tiene un fosfomotivo de AMPK, que es fuertemente fosforilado, cuando cultivos celulares

son incubados con AICAR un compuesto que activa a AMPK. Aunque AMPK puede fosforilar tanto a AS160 como a TBC1D1 el sitio S237 es únicamente encontrado en TBC1D1, por lo que la fosforilación de TBC1D1 por AMPK se ha propuesto por un mecanismo independiente de AS160 para el transporte de glucosa mediado por el ejercicio.⁽⁵³⁾

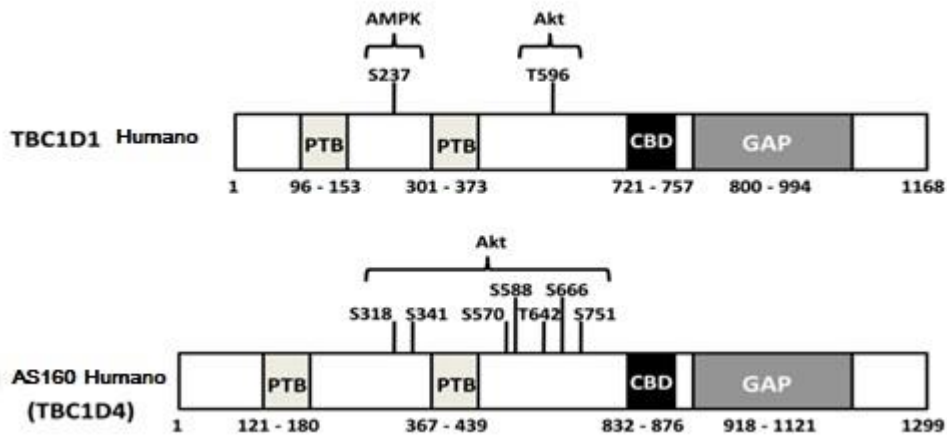


Figura 23 Residuos de aminoácidos fosforilados por AKT y AMPK. Diagrama de TBC1D1 y TBC1D4 en humanos, donde se evidencia que TBC1D1 incluye un fosfomotivo de AMPK entre los dominios PTB, que está ausente en AS160.⁽⁵³⁾

OBJETIVO:

- Evaluar las posibles alteraciones en las vías de señalización de la insulina y la AMPK y su impacto en la captación y utilización de glucosa a través del transporte mediado por GLUT4 en un modelo de SM.

Objetivos particulares

- Inducir el síndrome metabólico en ratas mediante una dieta alta en carbohidratos.
- Evaluar la activación de la vía de la insulina en adipocitos de ratas con síndrome metabólico, mediante el estado de fosforilación de sus componentes (AKT, IRS).
- Evaluar la activación de la vía de AMPK en adipocitos de ratas con síndrome metabólico, mediante el estado de fosforilación de AMPK.
- Evaluar el transporte de glucosa en respuesta al estímulo de metformina, AICAR e insulina, utilizando un análogo fluorescente de glucosa.

HIPÓTESIS:

- Las vías de señalización de **insulina** y **AMPK** que controlan la captación y utilización de glucosa en el tejido adiposo, se encuentran alteradas en un modelo de síndrome metabólico.

ANTECEDENTES

La resistencia a la insulina es un aspecto fundamental para la etiología de la diabetes tipo 2 y de manera muy importante también está ligada a la obesidad,^(67, 68) que actualmente es un problema de salud que ha alcanzado proporciones epidémicas.⁽⁶⁹⁾

Aunque el mecanismo que relaciona la obesidad y la resistencia a la insulina permanece aún sin esclarecerse, se asocia con un metabolismo anormal de carbohidratos y lípidos.⁽⁷⁰⁾

En lo que respecta al metabolismo de carbohidratos, en particular con la captación de glucosa, la idea de que el tejido adiposo pudiera tener un efecto considerable sobre el control glicémico global no fue en un principio una premisa aceptada.

Sin embargo, estudios recientes demostraron que el tejido adiposo comprende una fracción de la disposición de la glucosa postprandial alrededor del (10-15%) con la mayoría del resto tomado por el músculo.⁽¹⁷⁾ Sin embargo, las alteraciones en el tejido adiposo tienen profundas implicaciones en la homeostasis de la glucosa. Aunque se desconocen las alteraciones que subyacen la disfunción del adipocito y como es que impactan en el transporte de glucosa.⁽¹⁷⁾

El principal transportador de glucosa es la proteína GLUT4 y juega un papel primordial en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Es expresado principalmente en músculo esquelético y tejido adiposo y juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa. El transporte vesicular de GLUT4 ocurre en respuesta al estímulo con insulina y a cambios metabólicos que desencadenan cambios en el estatus energético celular a través de la vía de la AMPK.⁽⁷¹⁾

Se han demostrado alteraciones en la captación de glucosa del tejido adiposo mediado por insulina en humanos obesos en comparación con individuos delgados⁽⁷³⁾ sin embargo la captación de glucosa mediada por AMPK, en adipocitos es controversial.⁽⁷²⁾

Debido a que la mayoría de la evidencia experimental de la captación de glucosa en adipocitos, se ha realizado en adipocitos 3T3-L1 ^(74,77) y los resultados en esta línea celular son contundentes al señalar que la activación de AMPK promueve la captación de glucosa. Sin embargo, experimentos en adipocitos aislados de rata han evidenciado que la activación de AMPK tanto promueve como inhibe la captación de glucosa. ^(75,76)

METODOLOGÍA

Modelo de estudio

A 20 ratas Wistar macho, de 200-250g, se les indujo el síndrome metabólico mediante una dieta alta en carbohidratos que contenía 30% de sacarosa en el agua de beber, ad libitum, y alimento sólido estándar, la cual les fue administrada durante 16 semanas.

Veinte ratas de igual sexo y peso fueron utilizadas como control y se alimentaron con una dieta sin sacarosa en el agua de beber y alimento sólido estándar durante el mismo tiempo.

Al término de las 16 semanas de dieta se extrajo una muestra de sangre total proveniente de las ratas en ayuno durante toda la noche, a la cual se le separó el plasma por centrifugación a 12,000 xg durante 15 minutos a 4°C con la finalidad de evaluar parámetros como: glucosa, insulina, leptina, adiponectina.

Determinación de triacilgliceroles

La determinación de los triacilgliceroles se realizó por punción de la cola al término de las 16 semanas con 5 horas de ayuno mediante el empleo del instrumento Accutrend GCT con el uso de tiras reactivas donde los triglicéridos son cortados por una estearasa en glicerol y ácidos grasos libres. Dos pasos enzimáticos adicionales convierten al glicerol en dihidroxiacetona fosfato y en peróxido de hidrógeno. En la presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida un indicador y su concentración es después medida por reflectancia fotométrica.

Determinación de insulina

La determinación de insulina se realizó a partir del plasma por medio del ALPCO Inmunoassays, Insulin (Rat) High Range ELISA, Cat 80-INSRTH-E01, E10 realizado mediante un formato tipo sandwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una microplaca de 96 tubos, después de haber detenido la reacción, la microplaca se coloca en un lector de luminiscencia Turner Biosystems.

Determinación de leptina

La determinación de leptina se realizó a partir de plasma, por medio del ALPCO Inmunoassays, Leptin (Mouse and Rat) High Range ELISA, realizado mediante un formato tipo sandwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una microplaca de 96 tubos, después de haber detenido la reacción la microplaca se coloca en un lector de luminiscencia Turner Biosystems.

Determinación de adiponectina

La determinación de adiponectina se realizó a partir de plasma por medio del ALPCO Inmunoassays, Adiponectin (Rat) High Range ELISA, realizado mediante un formato tipo sándwich de doble anticuerpo monoclonal, dos niveles de controles y una placa de 96 tubos, después de haber detenido la reacción , la microplaca se coloca en un lector de luminiscencia Turner Biosystems.

Determinación de glucosa

La determinación de Glucosa se realizó a partir de sangre total, por medio del kit enzimático de glucosa oxidasa SIGMA GAGO-20, donde la glucosa es oxidada a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la glucosa oxidasa, el peróxido de hidrógeno reacciona con el o-dianisidino en presencia de la peroxidasa y produce un producto colorido (café).

El o-dianisidino óxidado reacciona con el ácido sulfúrico y forma un producto con un color más estable. El color rosa intenso se mide en el espectrofotómetro a 540 nm y es proporcional a la concentración de glucosa.

Aislamiento de adipocitos

A 40 mL de Amortiguador Krebs- Ringer que contiene 118mM de NaCL, 4.8mM de KCL, 1.3mM KH_2PO_4 , 1.3mM de MgSO_4 , 10mM de NaHCO_3 , 10mM de HEPES se agregó 50 μL de 1M de CaCl_2 y 400 μL de 1M de glucosa. Se saturó 95% O_2 y 5% CO_2 y se tomaron 10 mL de KBH para agregarle 0.2g de BSA. En 7 mL de KBH con BSA se disolvieron 10 mg de colagenasa tipo II.

Se anestesió a la rata con pentobarbital para disectar el abdomen y extraer el tejido adiposo retroperitoneal, el cual se pesó y se transfirió a los 3mL restantes de KBH con BSA, donde se cortó en pequeños trozos para incubarlos durante 40 min 37°C con colagenasa y con agitación constante, para después filtrar el tejido utilizando malla de toll, después se realizaron tres lavados con KBH sin BSA desechando el infranadante entre cada lavado, por último se resuspendió en KBH sin BSA y se repartió 1 mL en una placa multipozos, para incubarlos 1 h con concentraciones crecientes de Insulina de 0, 10 y 100 nM, 4h con con concentraciones crecientes de metformina de 0, 0.5 y 1 mM y 1h con concentraciones crecientes de Aicar 0, 0.5 y 1.0 mM.

Por último los adipocitos de cada pozo se transfirieron a un tubo Eppendorf para quitar el infranadante. Y se agregó amortiguador de extracción que contiene 50mM de HEPES, 50mM de KCl, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 5mM de fosfato β -glicerol, 0.1% (v/v) de Triton X-100, Inhibidores de proteasas (Complete, Roche), 50 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de ortovanadato de sodio, 5 mM de pirofosfato de sodio, 0.2mM PMSF (todos de Sigma-Aldrich).

Análisis por Western blot

Las muestras obtenidas por el aislamiento se centrifugaron a 12,000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó en tubos nuevos y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry, usando BSA como estándar. Las muestras fueron precipitadas con DOC 0.4% y TCA 70% para ser resuspendidas en amortiguador de carga 1X que contiene 1.5M de Tris pH6.8, 10% de SDS Glicerol+Azul de Bromofenol, β -mercaptoetanol, 1M de DTT, 500mM de EDTA y separar las proteínas (90 μ g de proteína total) mediante SDS-PAGE en un gel al 10% de acrilamida mediante una electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF(0.45 μ M). Para detectar las proteínas de interés con los anticuerpos que reconocen a la AMPK total y AMPK fosforilada (Thr172) se utilizaron en una dilución de 1:1000 cada uno (Cell Signaling). IRS-1 total e IRS-1 fosforilada (Ser 302) se utilizaron a una dilución de 1:500 y 1:1000 (BD Transduction Laboratories y Cell Signaling) respectivamente. AKT total y AKT fosforilada (Thr 308) se utilizaron a una dilución de 1:1000 cada uno (BD Transduction Laboratories y Cell Signaling) .

La visualización de las bandas se realizó a través de un anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000, de Cell Signaling).

Y se reveló con el reactivo Chemiluminescent HRP Substrate (MILLIPORE) que consiste en luminol y solución de peróxido en el Fotodocumentor ChemiDOC XRS (Biorad).

Las bandas observadas se cuantificaron usando el analizador de imágenes Quantityone (Bio-Rad).

Captación de glucosa

Los adipocitos aislados por la metodología ya mencionada fueron resuspendidos en KBH sin BSA y sin glucosa y se repartieron en placas multipozos que se incubaron 1 hora y después se estimularon 20 minutos con concentraciones crecientes de Insulina de 0.0, 10.0 y 100.0 nM y 1h con con concentraciones crecientes de metformina (AICAR) de 0.0, 0.5 y 1.0 mM. Después de este tiempo se añadió 2-NBDG 30 μ M en cada pocillo y después de 15 minutos se añadió Citocalacina B 50 μ M para inhibir el transporte de glucosa. Los adipocitos se transfirieron a tubos falcon de 15 mL y se lavaron una sola vez con 7 mL de KBH con glucosa y sin BSA desechando el infranadante. Se transfirieron 100 μ L de adipocitos a una placa de 96 pocillos y se midió la fluorescencia en el lector Turner Biosystems con un filtro que comprende rangos de excitación de 490nm y de emisión de 550nm. Cada condición se evaluó al menos por triplicado y cada ensayo se normalizó por la cantidad de proteína por el método le Lowry.

Análisis Estadístico

La prueba estadística utilizada para el análisis de Western blot así como para los ensayos de captación y ELISA fue un ANOVA de una vía con $P \leq 0.05$ para lo que se consideró significativo.

Para la tabla de características del modelo de SM se utilizó una t-student, * $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Tabla 4 Características del modelo de rata con SM. Ratas macho wistar de 200-250 g de peso fueron alimentadas con sacarosa al 30% y alimento estándar durante 16 semanas con su respectivo grupo control.

Variable	Control	SM
Peso de ratas(g)	437.08 ± 34.1 n=21	425.06 ± 47.3 n=21
Grasa abdominal (g)	11.89 ± 4.69 n=21	*16.91 ± 4.32 n=21
% Grasa abdominal	2.66 ± 1.02 n=21	*3.93 ± 1.01 n=21
Triglicéridos (mg/dL)	115.2 ± 13.3 n=9	*238.2 ± 53 n=10
Leptina (pg/mL)	238.8 ± 33.30 n=9	*572.1 ± 30.2 n=10
Glucosa (mg/dL)	132.1 ± 5.5 n=9	131.3 ± 9.1 n=10
Insulina (ng/mL)	5.64 ± 0.38 n=9	*9.20 ± 0.25 n=10
HOMA	1.8 ± 0.35	*2.98 ± 0.28

Se muestran los parámetros evaluados en el modelo de SM.

*P≤0.05, t de student.

HOMAIR=(Glucosammol/LxInsulina ng/mM/22.5)

Evaluación del estado de activación de AKT y de la expresión de la proteína AKT e IRS-1 en adipocitos de rata con SM.

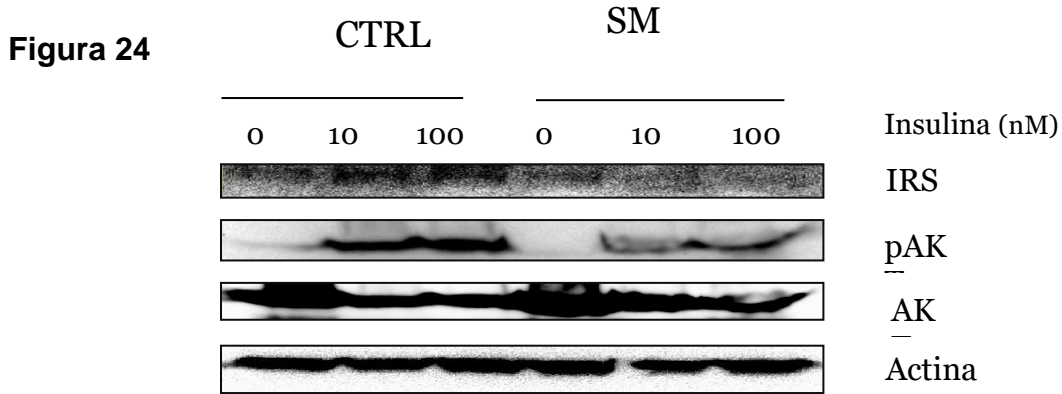


Figura 24 Inmunoblot representativos de la proteína pAKT, AKT, IRS y Actina de adipocitos estimulados con insulina en el SM.

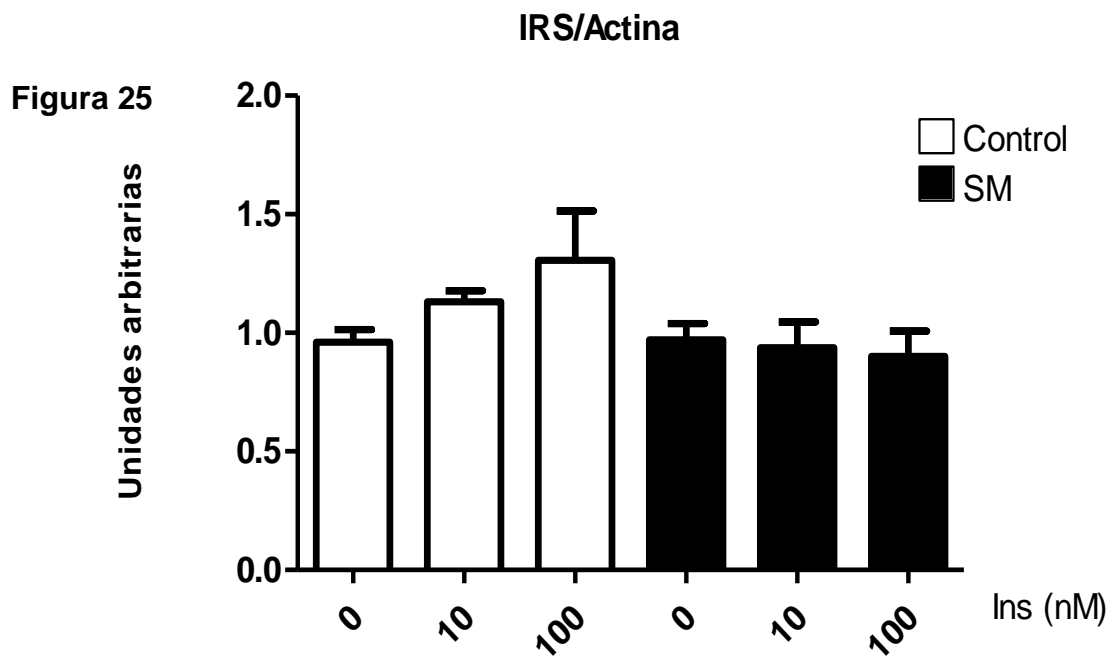


Figura 25 Análisis densitométrico de la expresión de IRS relativo a la Actina de adipocitos estimulados con insulina en el SM.

Figura 26)

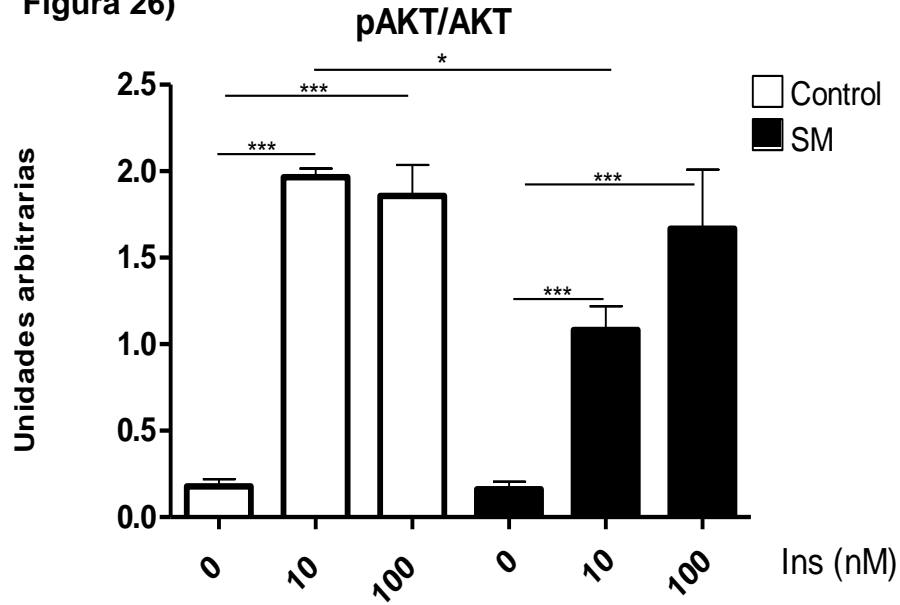


Figura 26 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AKT de adipocitos estimulados con insulina en el SM.

Figura 27)

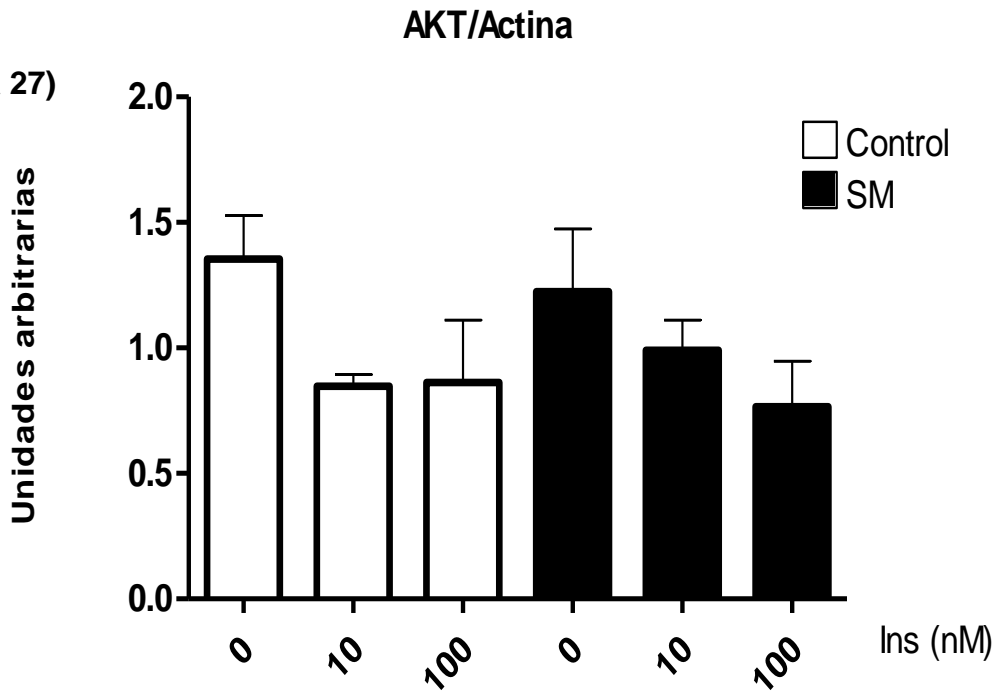


Figura 27 Análisis densitométrico de la expresión de AKT relativo a Actina de adipocitos estimulados

Análisis de la vía de la insulina en adipocitos de ratas con SM por medio de la activación de AKT Los adipocitos aislados de rata CTRL y con SM fueron estimulados con insulina a concentraciones de (0, 10 y 100) nM durante 5 min, para después por medio del Western blot analizar la expresión de IRS-1 y AKT-1 la cual se realizó mediante el cociente de la densitometría del blot de IRS-1 y AKT-1 (Figura 25 y Figura 27) entre el de Actina. El análisis densitométrico evidenció que los niveles de expresión de IRS-1 y PKB-1/AKT-1 no fueron afectados en la condición del SM.

El estado de fosforilación de la proteína AKT-1 se realizó mediante el cociente de la densitometría del blot de pAKT-1 entre AKT-1. (Figura 26) Los adipocitos CTRL alcanzaron su mayor estado de fosforilación desde la concentración de 10nM y se mantuvo con el estímulo de 100nM mientras que los adipocitos con SM alcanzaron el máximo de su activación hasta la concentración de 100nM.

* $P \leq 0.05$, $n=3$, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

Alteración en la captación de glucosa (2NBDG) en adipocitos estimulados con insulina en el SM.

Figura 28)

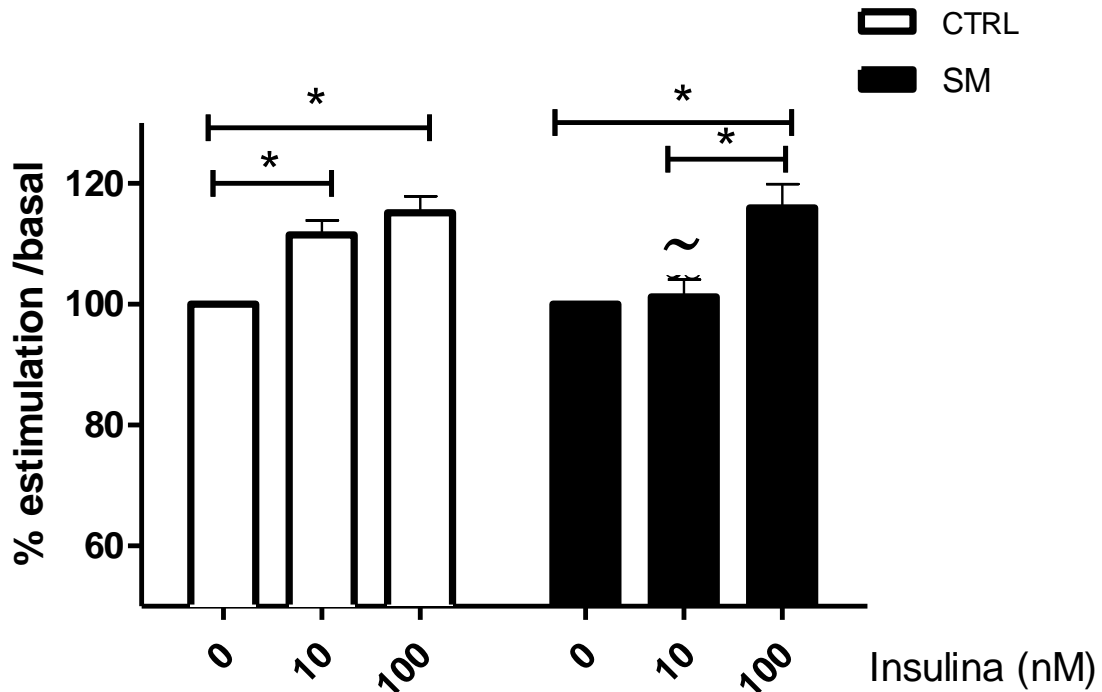


Figura 28 Alteración en la captación de glucosa (2NBDG) en adipocitos estimulados con insulina en el SM.

Adipocitos fueron aislados del tejido adiposo retroperitoneal de ratas Wistar, posteriormente fueron estimulados con insulina a concentraciones de 10 y 100 nM durante 30 min, posteriormente se cambió la glucosa del medio por un análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG) durante 10 minutos, por último se adicionó citocalasina B y se lavaron los adipocitos para medir la fluorescencia intracelular de los adipocitos en la condición con SM de igual manera que su respectiva condición control.

En congruencia con el Western blot los adipocitos de rata con SM lograron captar glucosa hasta la concentración de 100 nM mientras que los adipocitos de rata control lo hicieron desde la concentración de 10 nM.

* $P \leq 0.05$ vs CTRL, ~ $P \leq 0.05$ vs CTRL10nM Ins , $n=3$, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con metformina en el SM.

Figura 29

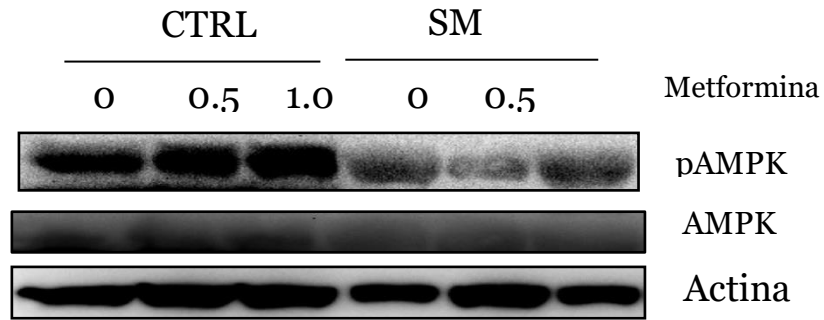


Figura 29 Inmunoblot´s representativos de la proteína pAMPK, AMPK y Actina de adipocitos estimulados con metformina en el SM.

Figura 30)

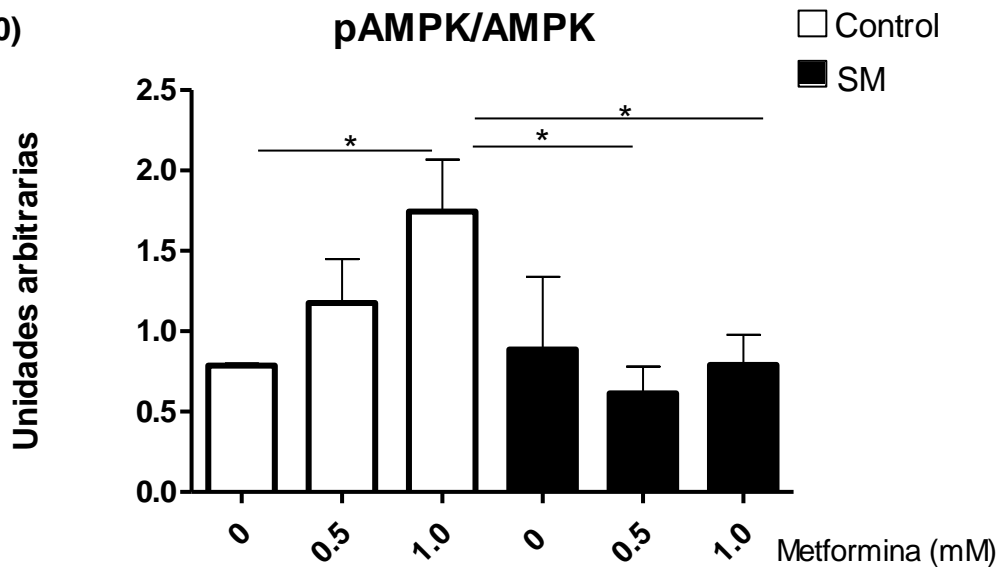


Figura 30 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AMPK de adipocitos estimulados con metformina en el SM.

Figura 31)

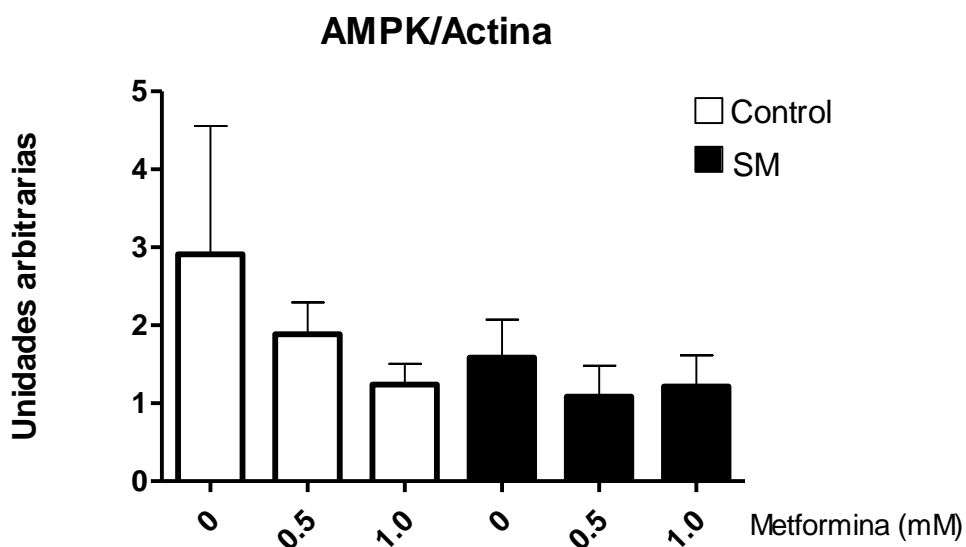


Figura 31 Análisis densitométrico de la expresión de AMPK relativo a Actina de adipocitos estimulados con metformina en el SM.

Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con metformina en el SM. Los adipocitos aislados de rata CTRL y con SM estimulados con metformina a concentraciones de (0, 0.5 y 1.0) mM durante 4 h, para después por medio del Western blot (Figura 29) se analizó la expresión de AMPK mediante el cociente de la densitometría del blot de AMPK entre el de Actina. (Figura 31) El análisis densitométrico evidenció que los niveles de expresión de AMPK no fueron afectados en la condición del SM. El estado de fosforilación de la proteína AMPK se realizó mediante el cociente de la densitometría del blot de pAMPK entre AMPK. (Figura 30) Los adipocitos control respondieron de manera dosis dependiente mientras que los adipocitos de rata con SM no respondieron ante el estímulo con metformina, evidenciando la alteración de la vía de la AMPK ante el estímulo con metformina. * $P \leq 0.05$, $n=5$, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con Metformina en adipocitos con SM

Figura 32)

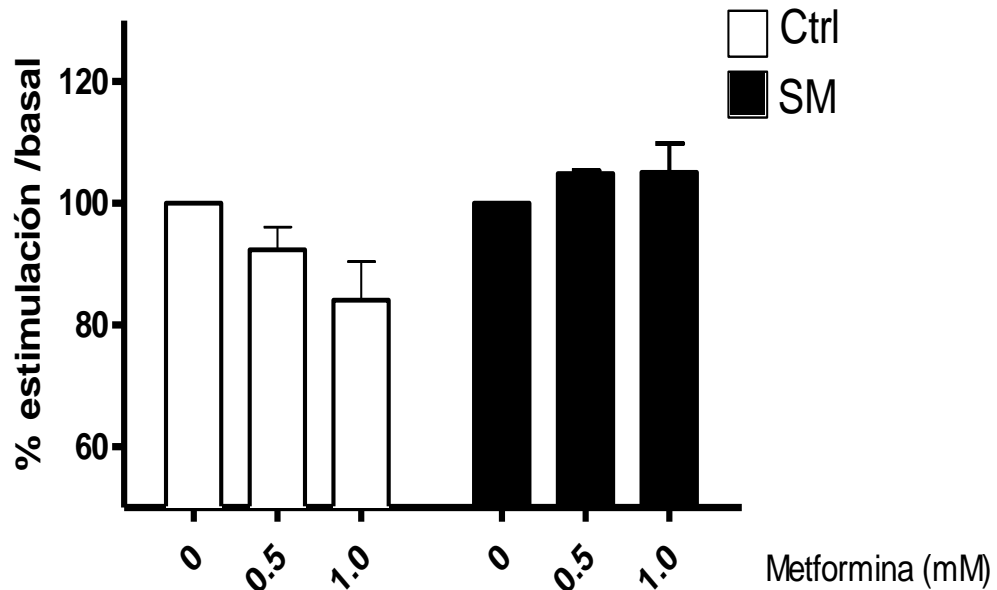


Figura 32 Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con Metformina en adipocitos con SM.

Adipocitos fueron aislados del tejido adiposo retroperitoneal de ratas wistar, posteriormente fueron estimulados con metformina a concentraciones de 0.5 y 1.0 mM durante cuatro horas, posteriormente se cambió la glucosa del medio por un análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG) durante 10 minutos, por último se adicionó citocalasina B y se lavaron los adipocitos para medir la fluorescencia intracelular de los adipocitos en la condición con SM de igual manera que su respectiva condición control. En los adipocitos de rata CTRL se observó una disminución en la captación de glucosa como resultado del estímulo con metformina mientras que los adipocitos con SM no reaccionaron ante ninguna de las concentraciones de metformina.

* $P \leq 0.05$, $n=3$, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con AICAR en el SM.

Figura 33)

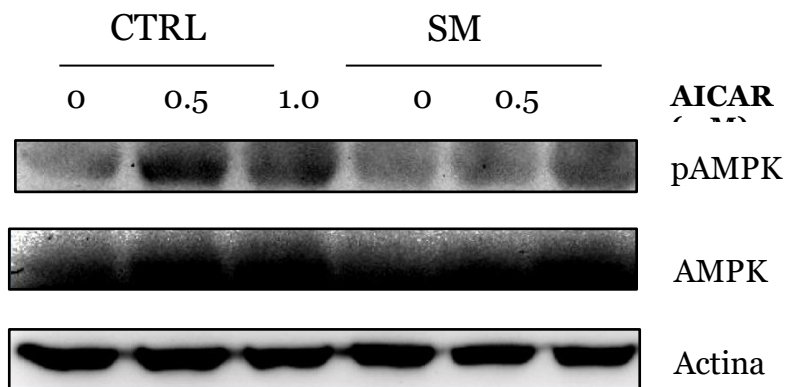


Figura 33 Inmunoblots representativos de la proteína pAMPK, AMPK y Actina de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.

Figura 34)

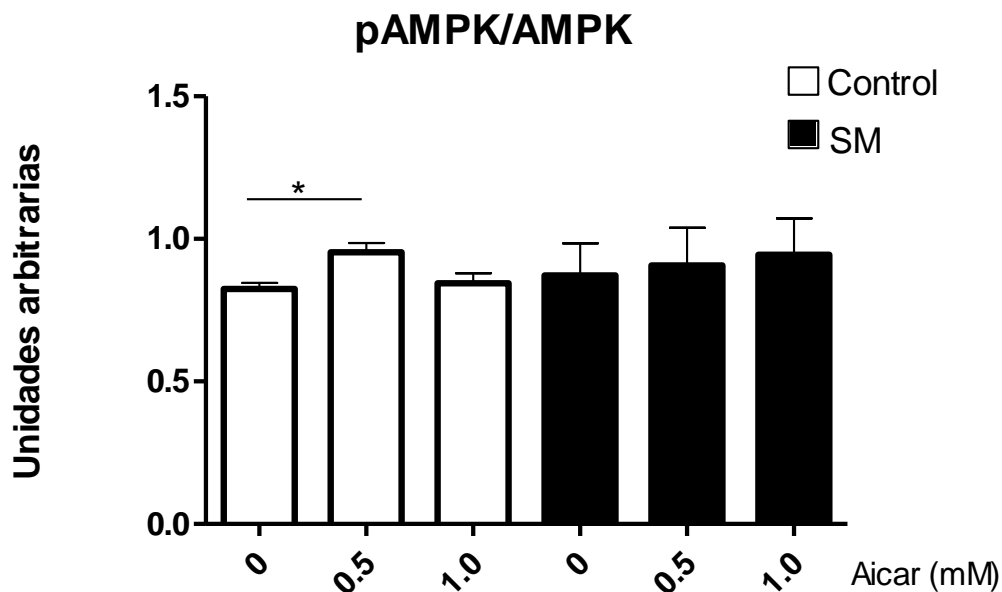


Figura 34 Análisis densitométrico del estado de fosforilación de la proteína AMPK de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.

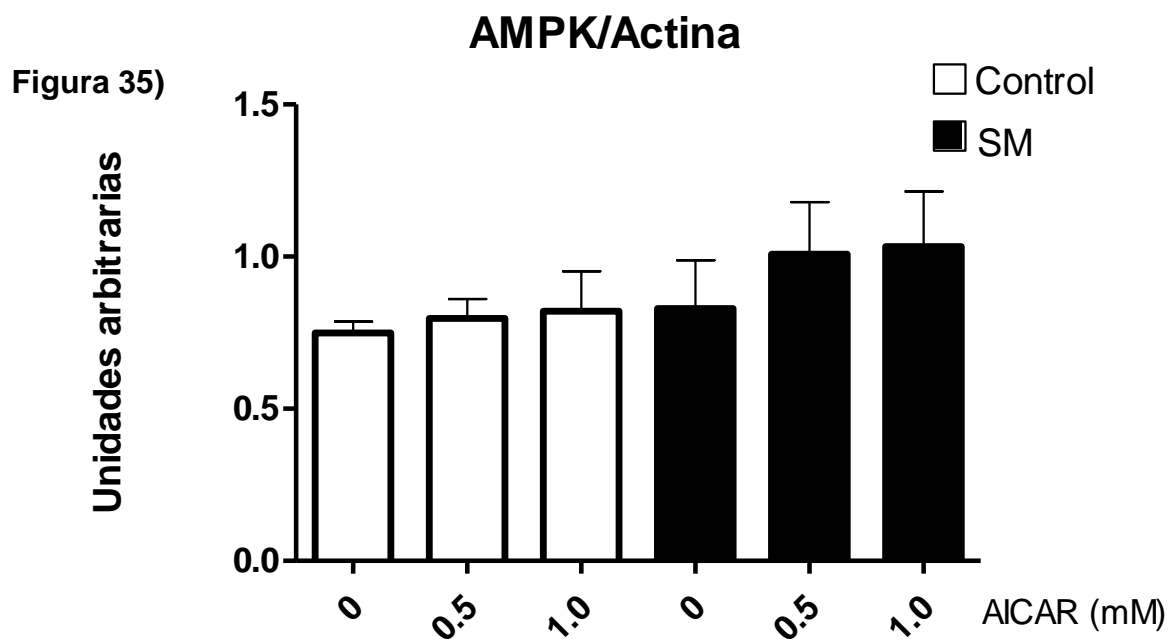


Figura 35 Análisis densitométrico de la expresión de AMPK relativo a Actina de adipocitos estimulados con AICAR en el SM.

Alteraciones en el estado de activación y expresión de AMPK en adipocitos de rata estimulados con AICAR en el SM. Los adipocitos fueron aislados de rata CTRL y con SM, posteriormente fueron estimulados con Aicar a concentraciones de (0, 0.5 y 1.0) mM durante 1h, para después por medio del Western blot (Figura 33). La expresión de AMPK se evaluó mediante el cociente de la densitometría del blot de AMPK entre el de Actina.(Figura 35) El análisis densitométrico evidenció que los niveles de expresión de AMPK no fueron afectados en la condición del SM. El estado de fosforilación de la proteína AMPK se realizó mediante el cociente de la densitometría del blot de pAMPK entre AMPK. (Figura 34) Los adipocitos de rata CTRL respondieron al estímulo de 0.5mM mientras que los adipocitos de rata con SM no respondieron ante el estímulo con Aicar en ninguna de sus concentraciones. En cuanto a la expresión de AMPK no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. *P≤0.05, n=4, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con AICAR en adipocitos con SM

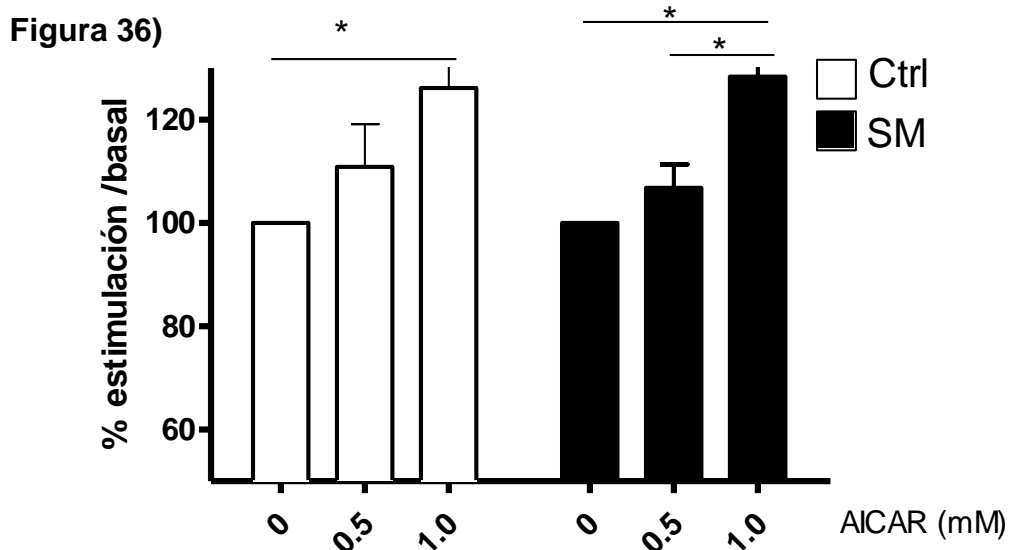


Figura 36 Alteración de la captación de glucosa (2NBDG) estimulados con AICAR en adipocitos con SM

Adipocitos fueron aislados del tejido adiposo retroperitoneal de ratas wistar, posteriormente fueron estimulados con AICAR a concentraciones de 0.5 y 1.0 mM durante una hora, posteriormente se cambió la glucosa del medio por un análogo fluorescente de glucosa (2-NBDG) durante 10 minutos, por último se adicionó citocalasina B y se lavaron los adipocitos para medir la fluorescencia intracelular de los adipocitos en la condición con SM de igual manera que su respectiva condición control. * $P \leq 0.05$, $n=3$, ANOVA 1 vía, prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares. Los adipocitos provenientes de ratas CTRL y SM aumentaron la captación de glucosa de manera dosis dependiente en función del estímulo con AICAR. * $P \leq 0.05$, $n=4$, ANOVA 1 vía prueba de: Bonferroni: Comparación de todas las columnas pares.

DISCUSIÓN

El SM actualmente y de manera creciente es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, por lo que ha adquirido cada vez más importancia y por lo que ha surgido una serie de controversias en cuanto a su definición, valores de corte, criterios de inclusión y de manera muy importante, más allá de señalar las diferencias; la importancia radica en evidenciar las coincidencias entre las distintas definiciones propuestas por las diversas asociaciones, como por ejemplo la congruencia en señalar a la obesidad como uno de los factores de riesgo de mayor incidencia; y el planteamiento que de manera consensual señala la alteración en el metabolismo de la glucosa y lípidos, que están influenciados directamente por la insulina, y por ende la resistencia a la insulina, que juntos se comprenden como los componentes de mayor importancia entre todos los factores de riesgo que involucra el SM.

El mecanismo que involucra la acumulación del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y como esta relación impacta en la homeostasis de la glucosa es de vital importancia para la comprensión de la fisiopatología del SM.

La insulina es una hormona anabólica que ejerce distintas acciones celulares, sin embargo en lo que concierne a este estudio, se centra en su papel en la captación de glucosa en un tejido no tan ampliamente estudiado como lo es el tejido adiposo y como es que proteínas clave dentro de esta vía de señalización se comportan dentro del SM. Sin embargo la vía de la insulina no es la única vía de señalización involucrada en la captación de glucosa; otra vía que regula el metabolismo energético denominada vía de la AMPK también involucra la captación de glucosa.

Para entender cómo es que el metabolismo de la glucosa, en particular su captación se ve afectada por la condición de SM y cómo es que las vías de señalización relacionadas con este proceso están actuando, se trabajó con un modelo de rata Wistar alimentada con sacarosa al 30% en el agua de beber

durante 16 semanas con la finalidad de inducir el SM, al finalizar este periodo de tiempo se extrajo una muestra sanguínea del animal para evaluar parámetros de interés relacionados con el SM como los triglicéridos donde el grupo con SM demostró una elevación significativa con respecto al CTRL demostrando la presencia de una dislipidemia en el modelo, otro parámetro evaluado fue la glucosa sanguínea y lo que se encontró fue que no habían diferencias significativas entre ambos grupos a pesar de la dieta alta en sacarosa, sin embargo al evaluar los niveles de insulina plasmática, se encontró que el grupo con SM presentaba niveles de insulina significativamente mayores con respecto a su grupo control, por lo que el siguiente paso fue la evaluación mediante una prueba indirecta la presencia de resistencia a la insulina con los datos de glucosa e insulina plasmática mediante el índice HOMA lo que resultó en que el grupo con SM se encontraba en una condición de resistencia a la insulina, uno de los principales factores de riesgo en el SM. Sin embargo y esto resulta ser de vital importancia, no es necesario tener los niveles de glucosa sanguíneos alterados para presentar una alteración en el metabolismo de la glucosa por lo que los animales se encuentran en un estado de SM temprano o en etapa de compensación donde es posible mantener los niveles de glucosa sanguínea debido a los altos niveles de insulina.

La obesidad fue evaluada por el peso del tejido adiposo retroperitoneal con respecto a su condición CTRL, donde se encontró que el grupo con SM presentaba obesidad con respecto al CTRL, lo que es congruente con la evidencia experimental publicada en las últimas décadas que muestra que la acumulación del tejido adiposo abdominal está asociada con la resistencia a la insulina, como en este modelo.

Durante las últimas tres décadas, estudios sobre las alteraciones moleculares en la vía de señalización de la insulina, han permitido establecer una relación entre las alteraciones y el metabolismo de glucosa observadas en la resistencia a la insulina. El tejido muscular y el adiposo, los dos principales sitios dependientes de insulina para la disposición de glucosa.

En este trabajo se evaluó la expresión de las proteínas IRS-1 y PKB- α /AKT-1 así como el estado de fosforilación de la proteína PKB- α /AKT-1, debido a que las proteínas IRS juegan un papel central en la regulación en la cascada de señalización de la insulina, ya que son activadas directamente por el receptor de insulina y de manera muy importante también sensan señales inhibitorias de la vía. Y en el caso de AKT existe una evidencia sustancial que argumenta que actúa como mediador de las acciones metabólicas de la insulina y juega un papel en la dirección de vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática y de esta manera promueve el transporte de glucosa.

Mediante el estímulo de los adipocitos con dos concentraciones 10 nM y 100 nM de insulina, en una condición con SM con su respectiva condición control, y el resultado muestra una disminución en la respuesta ante el estímulo con insulina en el adipocito de ratas con SM, evaluado por el estado de fosforilación de la proteína AKT/PKB y de manera muy importante esta respuesta disminuida impacta en el transporte de glucosa, esto sin existir alteraciones en los niveles de expresión de IRS-1 y PKB- α /AKT-1, este resultado coincide con lo reportado en la revisión realizada por Sara Fröjdö, et al ⁽⁷⁸⁾ en donde ellos señalan que existe disparidad en cuanto a la actividad de AKT en pacientes con diabetes mellitus tipo II contra una condición control y en el caso de IRS-1 se reportó una disminución en la actividad, sin embargo, en este trabajo únicamente se evaluó la expresión de IRS-1 y no se encontró diferencia significativa entre ambas condiciones. De manera muy importante, estas alteraciones impactan en la captación de glucosa, necesitando la concentración más alta (100nM de Insulina) para lograr la

captación de glucosa lograda en una condición control a una concentración de 10 nM de Insulina, evidenciando a nivel molecular y celular, la presencia de resistencia a la insulina en el adipocito. Por lo que la función del adipocito está alterada en un estadio temprano del SM y esta condición sugiere que la disfunción del tejido adiposo podría jugar un papel importante en el desarrollo y progreso de la resistencia a la insulina.

Dada la importancia metabólica del tejido adiposo, resulta relevante conocer la acción de AMPK en este tejido y cómo estas acciones impactan sobre todo el cuerpo en el ajuste fisiológico y fisiopatológico en particular del SM.

La evidencia experimental en el estudio del tejido adiposo ha arrojado una controversia con el uso de distintos activadores farmacológicos de AMPK en cuanto a su efecto en la captación de glucosa. En lo que respecta al presente trabajo se utilizó metformina y AICAR con la finalidad de activar AMPK y evaluar la respuesta en el SM con su respectiva condición CTRL en la captación de glucosa. Existe evidencia experimental donde se ha utilizado tanto metformina como AICAR para estimular AMPK en adipocitos y los resultados han sido contradictorios con los encontrados en músculo esquelético en ensayos de captación de glucosa. Esta disparidad en el comportamiento en cuanto a la captación de glucosa por los adipocitos al ser estimulados con los diferentes fármacos, puede ser atribuible a la expresión tejido específica de las isoformas de AMPK, siendo los heterotrimeros formados por la isoforma catalítica $\alpha 1$ la más abundante, y la cual es responsable de la mayor parte de la actividad de AMPK en el tejido adiposo y se le han atribuido funciones distintas a los heterotrimeros formados por la isoforma $\alpha 2$, que es la isoforma predominante en músculo esquelético y el corazón.^(79,80,81) o bien a la afinidad que pudieran tener los distintos heterotrimeros formados por isoformas de AMPK ante los agentes farmacológicos empleados.^(61,82)

En lo que concierne a los adipocitos tratados con AICAR en este trabajo, los adipocitos aislados de ratas CTRL así como con SM; fueron estimulados a concentraciones de (0, 0.5 y 1.0) mM de AICAR durante 1h y se observó que en

los adipocitos de rata control, el mayor estado de fosforilación se obtuvo a la concentración de 0.5 mM de AICAR, mientras que los procedentes de ratas con SM no respondieron ante ninguna de las concentraciones utilizadas.

Como se mencionó anteriormente, los heterotrímeros formados por la isoforma $\alpha 2$ se encuentran en menor cantidad en el tejido adiposo que en otros tejidos (músculo esquelético y cardiaco).^(80,81) Existe la posibilidad que los heterotrímeros de la isoforma $\alpha 2$ tengan mayor afinidad por el AICAR a las concentraciones usadas que los heterotrimeros formados por la isoforma alfa 1 y por esta razón haya quedado enmascarada la activación de AMPK, evaluada por su estado de fosforilación y es por esto que la concentración de 1 mM no reflejo diferencias significativas con respecto a la condición no estimulada.

En cuanto al resultado de la captación de glucosa mediada por el estímulo con AICAR, esta fue de manera dosis dependiente en ambas condiciones tanto en el SM como en la CTRL y la incongruencia en cuanto al resultado del estado de fosforilación de AMPK puede ser explicada por dos motivos, el primero es el anteriormente mencionado donde la activación de los heterotrímeros con la isoforma $\alpha 2$ se encuentren enmascarados por cantidad mucho mayor de heterotrimeros $\alpha 1$ que no fueron susceptibles a ser fosforilados a las concentraciones de AICAR utilizadas, sin embargo esto no evitó que los heterotrimeros con la isoforma alfa 2 que fueron activados por el AICAR pudieran promover la captación de glucosa en ambas condiciones tanto en el SM como en la CTRL.

Esta aseveración es posible, debido a que existe evidencia experimental aportada por Nakano M et al ⁽⁸²⁾ que muestra que en músculo esquelético de ratón el AICAR estimula preferentemente la fosforilación y activación de la isoforma catalítica alfa 2 de AMPK y aumenta el transporte de glucosa mediado por GLUT4.⁽⁸²⁾ Incluso Salt et al ⁽⁸³⁾ encontraron que los heterotrímeros conformados con la isoforma α -1 son menos sensibles al AMP^(f), por lo que basados en estas premisas, es posible que al AICAR a las concentraciones utilizadas

preferentemente este activando a los heterotrimeros conformados por la isoforma $\alpha 2$ y siendo esta la isoforma que se expresa en mucho menor proporción en el tejido adiposo el estado de fosforilación resultó ser enmascarado, sin embargo el estímulo con AICAR fue capaz de promover la captación de glucosa a través de los heterotrimeros conformados por la isoforma alfa 2.

La segunda opción es que es que la captación de glucosa estimulada por AICAR es mediada por un mecanismo independiente a la AMPK, debido a que los adipocitos con SM utilizados en este trabajo no respondieron ante el estímulo con AICAR en cuanto al estado de fosforilación de la AMPK, sin embargo, sí aumentó la captación de glucosa de manera dosis dependiente. Aunado a este resultado, existe un estudio realizado por Sakoda et al ⁽⁷⁴⁾, realizado en adipocitos 3T3-L1, donde de manera contundente evidenció que los adipocitos 3T3-L1 no requerían de ninguno de los dos heterotrimeros de AMPK para promover la captación de glucosa al ser estimulados con AICAR, lo que coincide con el resultado de este trabajo.

Por otro lado, también podría ser que el AICAR este ejerciendo un estímulo alostérico en ambas o en solo alguna de las isoformas, tomando en cuenta que que el efecto alostérico se lleva a cabo a través de la subunidad gamma y este estímulo alostérico no se vea reflejado en el aumento en el estado de fosforilación. Sin embargo sí en la actividad de la AMPK, aunque no existe evidencia reportada de este tipo de regulación por el AICAR.

Por lo que respecta a los adipocitos estimulados con metformina, estos fueron aislados de ratas CTRL y así como con SM y fueron estimulados a concentraciones de (0, 0.5 y 1.0) mM de metformina durante 4 h. Lo que se observó fue que los adipocitos de ratas CTRL respondieron de manera dosis dependiente a la metformina, evaluado por el estado de fosforilación en el residuo Thr 172, mientras que los procedentes de una rata con SM no fueron capaces de responder ante ninguna de las concentraciones utilizadas de este fármaco.

En los resultados obtenidos en este trabajo los adipocitos de ratas control al ser estimulados con metformina muestran una tendencia a disminuir el transporte de glucosa de manera dosis dependiente y de manera muy importante en el grupo con SM donde no se observa cambio en la fosforilación de AMPK, tampoco tuvo efecto en la captación de glucosa. Este resultado parece contradecir lo que se ha venido describiendo de la función de AMPK en músculo y corazón, donde la premisa versa en el sentido que la activación de AMPK se traduce en un aumento en la captación de glucosa, de manera muy importante y a diferencia del estímulo con AICAR Lindsey D. Bogachus et al⁽⁸¹⁾ evidenciaron que la metformina activa preferentemente a los heterotrimeros conformados por la isoforma $\alpha 1$ esto en células musculares L6, lo que tendría como consecuencia un efecto distinto por lo que en el caso de los adipocitos esto inhibiría el transporte de glucosa. La explicación de este comportamiento proviene desde la perspectiva general de la función de AMPK, la cual es restablecer los niveles energéticos suprimiendo las vías anabólicas y promoviendo las vías catabólicas, en el caso particular del metabolismo del adipocito, tiene sentido la inhibición de la captación de glucosa. Debido a que pudiera servir como un mecanismo de conservación de energía, la explicación es el costo energético que conlleva la síntesis de lípidos en el adipocito.⁽⁷²⁾ De esta forma suprimiendo la captación y metabolismo de glucosa, AMPK no solo previene el consumo de energía a través de la reesterificación de ácidos grasos, sino que también facilita la exportación de ácidos grasos para ser usados como recurso energético por otros tejidos periféricos.

Por lo que el mecanismo por el que esto sería posible es como Mandeed et al⁽⁷²⁾ sugieren que la activación de AMPK tiene como consecuencia una disminución en la fosforilación de AS160 en el residuo T642, un residuo que es fosforilado por la AKT a consecuencia del estímulo con insulina aunado a que el adipocito expresa en cantidades casi imperceptibles a TBCD1, una de las dos proteínas activadoras de GTPasas, a la cual se le han atribuido ser el blanco de AMPK relacionado con la translocación GLUT4 y por ende con la promoción de la captación de glucosa.

Por otro lado fue contundente el resultado en cuanto a que en el SM la fosforilación de AMPK se ve completamente abatida y no responde ante ninguno de los estímulos, lo que correlaciona con la evidencia experimental que ha muestra una correlación entre la resistencia a la insulina y la inhibición de AMPK ⁽⁸⁴⁾ lo que podría explicarse por la actividad de la proteína fosfatasa 2a que es la fosfatasa responsable de la desfosforilación del residuo *Thr*¹⁷² de las isoformas catalíticas de AMPK , la cual como la Yong Wu et al ⁽⁸⁵⁾ sugieren que en una condición de exceso de lípidos como la que caracteriza al modelo de SM inhibe la fosforilación de AMPK por la activación de la fosfatasa de serina / treonina PP2a.

CONCLUSIONES

La condición del SM presenta alteraciones a nivel celular en la vía de señalización de la insulina que controlan el transporte de glucosa en el adipocito, reflejado en una respuesta disminuida entre el estímulo de esta señal que se refleja en una captación menos eficiente de glucosa, lo que indica que los adipocitos con SM se encuentran en un estado de resistencia a la insulina.

En cuanto a la vía de AMPK el impacto fue mayor debido a que la respuesta ante los estímulos con metformina y AICAR fue totalmente abatida en la condición de SM. Este trabajo aún sin ser concluyente, plantea la existencia de una disyuntiva que sugiere dos posibilidades: la primera es que los heterotrímeros formados por las isoformas catalíticas de AMPK en el adipocito ejercen un papel contrario en función al estímulo con los distintos agentes, donde la metformina podría activar preferentemente a la isoforma alfa 1 mientras que el AICAR activa preferentemente a la isoforma alfa 2 y es la responsable de la captación de glucosa, la otra posibilidad es que AMPK en adipocito ocasione la inhibición del transporte de glucosa mientras que la captación de glucosa mediada por el estímulo con AICAR tendría un mecanismo independiente a la AMPK. Por lo que la disparidad de los resultados encontrados puede ser atribuible al desconocimiento en cuanto a la significancia funcional de los complejos formados lo cual permanece aún sin esclarecerse. Por lo que este trabajo evidencia la necesidad del estudio de los heterotrímeros de AMPK por separado, mediante el silenciamiento de la expresión de las isoformas catalíticas de AMPK o bien mediante el uso de activadores específicos como el pro- fármaco C13.

LITERATURA CITADA

- 1) Barquera C S, Campos N I, Dislipidemias, epidemiología, evaluación adherencia y tratamiento. Primera edición, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2009;19-32.
- 2) World Health Organization, [Health info] [Acceso 20 de octubre 2015], Disponible en: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality/en/>
- 3) Grundy et al, Diabetes and Cardiovascular Disease A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association, Diabetes and Cardiovascular Care, 1999; 100:1134-1146.
- 4) Rakesh M P, Viswanathan M, Changing definitions of metabolic syndrome, Indian Endocrinol Metabolism, 2012; 16(1);7-12.
- 5) Danianil D et al, Síndrome metabólica em crianças e adolescents: dívidas na terminologia, mas não nos riscos metabólicos, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia 2011; 55/8.
- 6) World Health Organization, [Health info] [Acceso 20 de octubre 2015], Disponible en: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
- 7) Sethi J. K. and Vidal-Puig A. J., Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation, Journal of Lipid Research, 2007; 48.
- 8) Foster M T and Pagliassotti M J, Metabolic alterations following visceral fat removal and expansion, Adipocyte, 2012; 1:4, 192–199.
- 9) Castrom A V , Kolka C M, Kim S P, and Bergman R N, Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2014; 58(6): 600–609.
- 10) Ferranti S and Mozaffarian D, The Perfect Storm: Obesity, Adipocyte Dysfunction, and Metabolic Consequences, Clinical Chemistry, 2008; 54:6 945–955.
- 11) Sanchez-Gurmaches J, Guertin D A, Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat, Biochimica et Biophysica Acta, 2014; 1842 (3) 340-351.
- 12) Park A, Kon K W, Bae K-H, Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells, World Journal of Stem Cells, 2014; 26; 6(1): 33-42.
- 13) Hebbachi A and Saggerson D, Acute regulation of 5_AMP-activated protein kinase by long-chain fatty acid, glucose and insulin in rat primary adipocytes, Bioscience Report, 2013; 33
- 14) Khan C R, Insulin Resistance, Insulin Sensitivity and Insulin Unresponsiveness: A Necessary Distinction, Metabolism, 1978; 27(12): 1893-1902.
- 15) Mlinar B, Marc J, Janež A, Pfeifer M, Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases, Clinica Chimica Acta, 2007; 375:20–35.
- 16) Jaswinder K Sethi and Antonio J Vidal-Puig, Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation, Journal of Lipid Research , 2007; 48(6): 1253–1262.
- 17) Rosen E D and Spiegelman B M, Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis, Nature, 2006, 14; 444(7121): 847–853.
- 18) Castro A V, Kolka C M, Kim S P, and Richard N. Bergman, Obesity, insulin resistance and comorbidities Mechanisms of association, Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2014; 58(6): 600–609.
- 19) Musi N and Goodyear L J, Insulin Resistance and Improvements in Signal Transduction, Endocrine, 2006; 29(1): 73–80.
- 20) Fabbro D , Cowan-Jacob S W and Moebitz H, International Union OF Basic and Clinical Pharmacology Review Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14, British Journal of Pharmacology, 2015; 172: 2675–2700.
- 21) Taylor S S and. Kornev A P, Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins, Trends in Biochememichal Science, 2011;36(2): 65–77.
- 22) Hanks S K, Quinn A M, Hunter T, The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains, Science, 1988; 241:42-52.
- 23) Towler M C, Hardie G D, AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling, *Circulation Research*, 2007; 100: 328-341.
- 24) Chang L, Chiang S-H and Saltiel A R, Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport, Molecular Medicine, 2004; 10:7–12.

- 25) Mlinar B, Marc J, Janež A, Pfeifer M, Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases, *Clinica Chimica Acta*, 2007; 375:20–35.
- 26) Towler M C, Hardie G D, AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling, *Circulation Research*, 2007; 100: 328-341.
- 27) Zhao F-Q and Keating A F, Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters, *Current Genomics*, 2007; 8: 113-128.
- 28) Muretta J M and Mastick C C, How Insulin Regulates Glucose Transport in Adipocytes, *Vitamins & Hormones*, 2009; (80): 245–286.
- 29) Huang S and Czech M P, The GLUT4 Glucose Transporter, *Cell Metabolism*, 2007; 237-252.
- 30) Blodgett D M, Julie K. De Zutter, Kara B. Levine, Pusha Karim, and Anthony Carruthers, *The Journal of General Physiology*, 2007; (130)2: 157–168.
- 31) Sadler B A J , Bryant J N, Gould W G and Welburn R C, Posttranslational Modifications of GLUT4 Affect Its Subcellular Localization and Translocation, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013; 14: 9963-9978.
- 32) Krüger M, Kratchmarova I, Blagoev B, Tseng Y-H, Kahn C R, and Mann M, Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics, *PNAS*, 2008;19(105)7: 2451–2456.
- 33) Wilcox G, Insulin and Insulin Resistance, *Clinical Biochemistry*, 2005; 26: 19-39.
- 34) Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, et al. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 2002;51 Suppl. 1:S83-90.
- 35) Correia M , Neves-Petersen M T, Jeppesen P B , Gregersen S , Petersen S B, UV-Light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis, *Plos One*, 2012; 7 : (12) e50733-50733.
- 36) Lizcano J M and. Alessi D R, The insulin signalling pathway, 2002; *Current Biology*, (12) 7: R233-R238.
- 37) Lee J and Pilch P F, The insulin receptor: structure, function and signaling, *The American Physiological Society*, 1994; 319-334.
- 38) Wilden P A, Siddles K, Haring E, Backer J M, Whitell M F, and Kahn V R, The Role of Insulin Receptor Kinase Domain Autophosphorylation in Receptor-mediated Activities, *The Journal of Biological Chemistry*, 1992; 267: (19)13719-13727.
- 39) Sun X J and Liu F, Phosphorylation of IRS Proteins: Yin-Yang Regulation of Insulin Signaling, *Vitamins and Hormones*, 2009; 80: 351- 387.
- 40) *Taniguchi C M, Emanuelli B and Kahn C R, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2006; 7:85-96.
- 41) Shepherd P R, Withers D J and Siddle K, Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling, *Biochemical Journal* ,1998; 333: 471–490.
- 42) B. Geering B, Cutillas P R and Vanhaesebroeck B , Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits?, *Biochemical Society Transactions*, 2007; 35: pp 199-203.
- 43) Alessi D R , Downes C P, The role of PI 3-kinase in insulin action, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998; 1436: 151-164.
- 44) Rameh L E and Cantley L C, The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function, *The journal of biological chemistry*, 1999; 274(13): pp. 8347–8350.
- 45) Biondi R M and Angel R. Nebreda, Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions, *Journal of Biochemistry*, 2003; 372: 1–13.
- 46) Vanhaesebroeck B and Alessi D R, The PI3K–PDK1 connection : more than just a road to PKB, *Journal of Biochemistry*, 2000; 346, 561-576.
- 47) Gonzalez Eva and McGraw T E, The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer, *Cell Cycle*, 2009; 15:8(16): 2502–2508.
- 49) Siddle K, Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players, *Journal of Molecular Endocrinology*, 2011; 47: R1–R10
- 50) Kandel E S and Hay N, The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB, *Experimental Cell Research*, 1999; 253: 210–229.
- 51) Hajduch E, Alessi D R, Hemmings B A, and Hundal H S, Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells, *Diabetes*, 1998; 47:1006–1013.

- 52) Barthel A, Okino S T, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock J Jr, and Roth R A, Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274: 20281–20286.
- 53) Cartee G D and Funai K, Exercise and Insulin: Convergence or Divergence at AS160 and TBC1D1?, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2009; 37(4): 188–195.
- 54) Klip A, Sun Y, Chiu T T, and Foley K P, Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2014; 306: C879–C886.
- 55) Gregory D. Cartee, Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle, *Diabetologia*, 2015; 58(1): 19–30.
- 56) Hardie D G, AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism, *International Journal of Obesity*, 2008; 32: 7–12.
- 57) Coughlan K A, Valentine R J, Ruderman N B y Saha A K, AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes?, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2014; 7: 241–253.
- 58) Daval M, Fougelle F, and Ferré P, Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue, *The Journal of Physiology*, 2006; 574(1): 55–62.
- 59) Konga C-S, Kimb J-A, Back S-S, Byund H-G, Kim S-K, Anti-obesity effect of carboxymethyl chitin by AMPK and aquaporin-7 pathways in 3T3-L1 adipocytes, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011; 22 :276–281.
- 60) Hardie G, , How cells sense energy, *NATURE*, 2011; 472: 176-177.
- 61) Hardie D G, Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2016; 6(1):1–19.
- 62) Towler M C and Hardie D G, AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling, *Circ Res.* 2007;100: 328-341.
- 63) Rai Ajit K. Srivastava, Stephen L. Pinkosky, Sergey Filippov, Jeffrey C. Hanselman, Clay T. Cramer, and Roger S. Newton, AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases, *The Journal of Lipid Research*, 2012; 53(12): 2490–2514.
- 64) Shao D, Oka S, Liu T, Zhai PY, Ago T, Sciarretta S, et al. A redoxdependent mechanism for regulation of AMPK activation by thioredoxin1 during energy starvation, *Cell Metabolism* 2014;19:232–45.
- 65) Hallows K R, Mount P. F., Pastor-Soler N. M., and Power D. A., Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010; 298: 1067– 1077.
- 66) Middelbeek R J W, Chambers M A, Tantiwong P, Treebak J T, Hirshman MF, Musi N and Goodyear L J, Insulin stimulation regulates AS160 and TBC1D1 phosphorylation sites in human skeletal muscle, *Nutrition & Diabetes*, 2013; 3(74): 11-4.
- 67) Walker M, Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulindependent diabetes mellitus, *Metabolism*, 1995; 44: 18– 20.
- 68) Kahn B B and Flier J S, Obesity and insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 2000; 106(4): 473-481.
- 69) McAllister E J, Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2009; 49(10): 868–913.
- 70) Rosen E D and Spiegelman B M, Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis, *Nature*, 2006, 14; 444(7121): 847–853.
- 71) Roberts C K, Hevener A L, and Barnard R J, Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training, *Comprehensive Physiology*, 2013; 3(1): 1–58.
- 72) Sakamoto K and Holman G H, Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic, *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* , 2008, 295: E29–E37.
- 72) Gaidhu M P and Ceddia R B, The Role of Adenosine Monophosphate Kinase in Remodeling White Adipose Tissue Metabolism, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2001;39 (2):102-8.

- 73) Stolic M , Russell A , Hutley L , Fielding G, Hay J , MacDonald G , Whitehead J and Prins J, Glucose uptake and insulin action in human adipose tissue — influence of BMI, anatomical depot and body fat distribution, *International Journal of Obesity*,2002; 26:17-23.
- 74) Sakoda H et al, Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. , *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002, 282 (6): E1239-E1244.
- 75) Grisouard J, Timper K, Radimerski TM, Frey DM, Peterli R, Kola B, Korbonits M, Herrmann P, Krähenbühl S, Zulewski H, Keller U, Müller B, Christ-Crain M, Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes, *Biochemical Pharmacology*, 2010, 1;80(11):1736-45.
- 76) Gaidhu M P, Perry L S, Noor F, and Ceddia R B, Disruption of AMPK_1 Signaling Prevents AICAR-Induced Inhibition of AS160/TBC1D4 Phosphorylation and Glucose Uptake in Primary Rat Adipocytes, *Molecular Endocrinology*, 2010, 24(7):1434–1440.
- 77) Yamaguchi S, Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2005, 289(4): E643-E649.
- 78) Fröjdö S, Vidal H, Pirola L, Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*,2009; 1792(2): 83–92.
- 79) a) Winder W W and Hardie D G, AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in Type 2 diabetes, *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 1999; 277: E1–E10.
- 80) b) Bijland S, Mancini S J and SAL I P, Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation, *Clinical Science*, 2013; 124: 491–507.
- 81) c) Bogachus L D and Turcotte L P, Genetic downregulation of AMPK- isoforms uncovers the mechanism by which metformin decreases FA uptake and oxidation in skeletal muscle cells, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*,2010; 299: C1549–C1561.
- 82) Nakano M, α 2 Isoform–specific activation of 5’adenosine monophosphate–activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribose at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle, *Metabolism clinical and Experimental*, 2006; 55(3): 300–308.
- 83) Salt I, Celler J W, Hawley S A, Prescott A, Woods A, Carling D and Hardie D G, AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the α 2 isoform, *Biochem. J.* (1998) 334, 177–187.
- 84) Kraegen E W, Asish K. Saha A K , Preston E, Wilks D,Hoy A J, Cooney G J, and Ruderman N B, Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E471–E479, 2006.
- 85) Wu Y, Activation of Protein Phosphatase 2A by Palmitate Inhibits AMP-activated Protein Kinase, *Journal of Biological Chemistry*, 2007;282(13): 9777–9788.