



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Implicación de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* en la regulación de la secreción de insulina en las células INS1 (832/13)

TESIS

Que para obtener el título de
Química Farmacéutico Bióloga

Presenta

Ilze Dayann Pineda Jiménez

DIRECTOR: Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

TUTOR: QFB. Patricia Vidal Millán

Ciudad de México

2021





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.

Jurado Asignado

Presidente

Dra. Mirna Ruiz Ramos

Vocal

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Secretaria

Q.F.B. Patricia Vidal Millán

1era. Suplente

Q.F.B. Gildardo Herrera Quiroz

2do. Suplente

M. en C. Jesús Aguilar Castro

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG)

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar
Director de tesis

QFB. Patricia Vidal Millán
Asesor interno

Ilze Dayann Pineda Jiménez
Sustentante

ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico.....	5
3.1. Obesidad y su prevalencia	5
3.2. Genética de la obesidad.....	6
3.3. Vía de la biosíntesis de las hexosaminas (HBP)	9
3.4. <i>GFAT1</i>	11
3.5. <i>GNPDA2</i>	12
3.6. Insulina	14
3.7. La secreción de insulina.....	14
3.8. La resistencia a la insulina	16
3.9. Cascada de señalización de la insulina.....	18
3.10. Las células INS-1 (832/13).....	21
4. Planteamiento del problema	22
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos.....	23

6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos particulares.....	23
7. Material y métodos	24
7.1. Tipo de estudio	24
7.2. Criterios de inclusión.....	24
7.3. Criterios de exclusión.....	24
7.4. Variables.....	24
7.5. Metodología	25
7.5.1. Cultivo celular	25
7.5.2. Conteo celular.....	26
7.5.3. Transfección de siRNAs <i>GNPDA2</i> y <i>GFAT1</i>	27
7.5.4. Extracción de RNA.....	28
7.5.5. Síntesis de cDNA por transcripción reversa (RT).....	30
7.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).	31
7.5.7. Ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, “glucose stimulated insulin secretion”).....	32
7.5.8. Determinación de la concentración de insulina por ELISA	33
8. Resultados.....	36
8.1. Optimización de las sondas <i>GNPDA2</i> y <i>GFAT1</i>	36
8.2. Optimización de la transfección con siRNA contra <i>GNPDA2</i> y siRNA contra <i>GFAT1</i> en la línea celular INS-1 (832/13)	41
8.3. Expresión de <i>GNPDA2</i> y <i>GFAT1</i> en la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento.	46

8.4. Expresión relativa de los genes <i>GNPDA2</i> y <i>GFAT1</i> en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa.....	47
8.5. Medición de la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células INS1 (832/13) en presencia o ausencia parcial de <i>GNPDA2</i> o <i>GFAT1</i>	51
9. Discusión.....	55
9.1. Expresión de <i>GNPDA2</i> y de <i>GFAT1</i> en condiciones de hiperglucemia y después de ser silenciado en las células INS-1(832/13)	56
9.2. Implicación de <i>GNPDA2</i> y <i>GFAT1</i> en la secreción de insulina.....	58
10. Conclusiones.....	60
11. Perspectivas.....	61
12. Referencias.....	62

Índice de Figuras

Figura 1. Expresión relativa de RNAm de distintos genes asociados con la obesidad en el hipotálamo.

Figura 2. Vía de biosíntesis de las hexosaminas.

Figura 3. Desaminación de la glucosamina -6- fosfato catalizada por GNPDA2 para convertir a fructosa-6-fosfato.

Figura 4. Mecanismo de la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células beta.

Figura 5. La señalización de la insulina vía fosfatidilinositol-3- cinasa (PI3K/Akt).

Figura 6. Esquema de los experimentos realizados durante el desarrollo de este proyecto.

Figura 7. Curvas de amplificación del gen *GNPDA2* en células INS-1 (832/13).

Figura 8. Curvas de amplificación del gen *GFAT1* en células INS-1 (832/13).

Figura 9. Optimización de la transfección con diferentes concentraciones de siRNA contra *GNPDA2* en la línea celular INS-1 (832/13).

Figura 10. Optimización de la transfección con diferentes concentraciones de siRNA contra *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13).

Figura 11. Optimización de la transfección de los siRNAs contra *GNPDA2* y *GFAT1* a diferentes tiempos en la línea celular INS-1 (832/13).

Figura 12. Porcentaje de la expresión relativa de *GNPDA2* y *GFAT1* posterior a las 72h de transfección.

Figura 13. Microscopía de las células silenciadas de los genes *GNPDA2* o *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13).

Figura 14. Expresión relativa de *GNPDA2* en células controles o silenciadas de dicho gen y estimuladas con glucosa.

Figura 15. Expresión relativa de *GFAT1* en células controles o silenciadas de dicho gen y estimuladas con glucosa.

Figura 16. Participación de *GNPDA2* en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Figura 17. Participación de *GFAT1* en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Figura 18. Posible mecanismo de la implicación de *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina en condiciones de hiperglucemia.

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación del estado nutricional respecto al IMC.

Tabla 2. Reactivos para la reacción de transcriptasa reversa (RT).

Tabla 3. Reactivos para la reacción de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Tabla 4. Valores de CTs y condiciones para la optimización de sonda *GNPDA2*.

Tabla 5. Valores de CTs y condiciones para la optimización de sonda *GFAT1*.

Abreviatura	Significado
ADMSC	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
ADP	Adenosín difosfato
AKT	Proteína cinasa B
AMDHD2	N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa 2
ATP	Adenosín trifosfato
Cdna	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FADH2	Flavín adenín dinucleótido reducido
F6P	Fructosa-6 fosfato
GFAT1	Glutamina fructosa-6-fosfato aminotransferasa
GlcNAc1P	N-acetil-alfa-D-glucosamina-1-fosfato
GlcNAcP	N-acetilglucosamina-6-fosfato
GlcN6P	Glucosamina-6- fosfato
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GNPDA2	Glucosamina-6-fosfato desaminasa 2
GNPNAT1	Fosfato de glucosamina N-acetiltransferasa 1
G6P	Glucosa-6-fosfato
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
HBP	Vía de la biosíntesis de la hexosamina, por sus siglas en inglés
IMC	Índice de masa corporal
INS-1	Células de insulinoma de rata

Abreviatura	Significado
IRS	Sustrato receptor de insulina
MAPK/RAS	Vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NPY	Neuropéptido Y
OGA	O-GlcNAc hidrolasa
OGT	O-GlcNAc transferasa
O-GlcNAcylation	Glicosilación ligada a O
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGM3	Fosfoglucomutasa 3
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PIP2	Fosfatidil inositol-3,4-difosfato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RI	Resistencia a la insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Reacción de la transcripción reversa
siC	siRNA control
siGF	siRNA <i>GFAT1</i>
siGN	siRNA <i>GNPDA2</i>
SNC	Sistema nervioso central
SiRNA	RNA corto de interferencia
TCA	Ácido tricarboxílico
UAPI	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina
UTP	Uridina trifosfato

1. Resumen

Por medio de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) se identificaron una gran cantidad de genes asociados con la obesidad, entre ellos *GNPDA2*. En ensayos *in vivo* se encontró que, al someter a ratas a una dieta alta en grasa, la expresión del gen *GNPDA2* se reduce en el hipotálamo, sugiriéndolo como un gen regulador de la homeostasis de la glucosa.

GNPDA2 es una enzima implicada en la vía de la biosíntesis de las hexosaminas y ejerce la reacción inversa de la enzima *GFAT1*. Se encontró que al sobre-expresar a *GFAT1*, se genera resistencia a la insulina. Sin embargo, aún se desconoce la función específica de *GNPDA2* y su rol en la secreción de la insulina.

Objetivo: Evaluar la expresión de los genes *GNPDA2* Y *GFAT1* en presencia de glucosa, así como su efecto en la secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS1(832/13).

Material y métodos: Se silenciaron los genes *GNPDA2* y *GFAT1* por medio de siRNAs en la línea celular INS-1 (832/13). Posteriormente, se sometieron las células transfectadas (con sus respectivos siRNAs) a ensayos de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS).

Resultados: Se encontró que ambos genes se expresan en las células INS1 (832/13). El gen *GNPDA2* aumentó su expresión bajo una alta concentración de glucosa en condiciones normales. Sin embargo, al silenciar parcialmente a *GNPDA2* y someter las células a diferentes concentraciones de glucosa, el transcrito no se modificó. Por otra parte, *GFAT1* aumentó su transcrito al igual que *GNPDA2*, conforme se incrementa la concentración de glucosa, en condiciones normales.

Pero al silenciar parcialmente a *GFAT1* y estimularlo con glucosa, solamente aumentó su expresión con una concentración baja de glucosa y no así con una alta concentración de glucosa.

Así mismo, las células controles secretaron más insulina cuando se estimularon con una concentración alta de glucosa, como era de esperarse. Para las células donde se silenció parcialmente a *GNPDA2*, se observó el mismo efecto que las células controles. Sin embargo, las células donde *GFAT1* fue silenciado parcialmente, se observó que la secreción de insulina aumentó 5.1 veces con respecto a las células control, al ser estimuladas con una alta concentración de glucosa.

Conclusión: *GNPDA2* y *GFAT1* se expresan en las células INS-1(832/13). Además, se observó que *GNPDA2* incrementa su expresión significativamente al ser estimulada por una alta concentración de glucosa y no así en una baja concentración. En cambio, la expresión de *GFAT1* aumenta paulatinamente conforme se incrementa la concentración de glucosa.

El silenciamiento de *GNPDA2* demostró que no influye en la secreción de insulina. Por el contrario, *GFAT1*, enzima limitante de la vía de las hexosaminas, al ser silenciada aumenta la secreción insulina.

2. Introducción

Actualmente, la obesidad es un grave problema de salud pública a nivel global, debido a su incremento de manera alarmante en las últimas décadas. En México, la obesidad es la enfermedad metabólica más frecuente en la población escolar, adolescente y adulta. La prevalencia del sobrepeso y obesidad en mayores de 20 años es de 72.5%. Esto contribuye a desarrollar enfermedades no transmisibles o comorbilidades como la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico, e incluso cáncer.

En la última década, se descubrieron nuevos genes asociados a la obesidad por medio de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés “Genome Wide-Association Studies”). Sin embargo, no se conoce la función de la mayoría de estos genes y su implicación en la obesidad y sus comorbilidades. Uno de estos genes es glucosamina-6-fosfato desaminasa 2 (*GNPDA2*), el cual es parte de la vía de señalización de la biosíntesis de las hexosaminas (HBP, por sus siglas en inglés “Hexosamine Biosynthesis Pathway”). *GNPDA2* es la enzima con acción inversa a la glutamina fructosa-6-fosfato aminotransferasa (*GFAT1*), la cual cataliza el paso de fructosa-6 fosfato (F6P) a glucosamina 6- fosfato (GlcN6P), siendo una reacción de paso limitante. A pesar de que existe información sobre la función enzimática para *GFAT1*, no se conoce exactamente la función de su enzima inversa, *GNPDA2*.

El gen *GNPDA2* disminuye su expresión en el hipotálamo en presencia de una dieta alta en grasas. Además, al inhibir a esta enzima en el tercer ventrículo del hipotálamo, se observó que los animales se vuelven intolerantes a la glucosa. Sin

embargo, al inhibir a *GFAT1*, no hubo cambios en la glucosa. Por lo tanto, en este proyecto se estudia el impacto de *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular INS1 (832/13). Además, se analiza la expresión de ambos genes en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.

3. Marco teórico

3.1. Obesidad y su prevalencia

La obesidad es una enfermedad multifactorial donde se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida¹. Esta enfermedad representa una de las patologías endocrino-metabólicas más importantes para la salud pública.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad están definidos como enfermedades sistémicas, que se caracterizan por la acumulación anormal y excesiva de tejido adiposo, y que además, conllevan a efectos adversos a la salud². Esto se da por un desequilibrio entre una ingesta de alimentos con alta cantidad energética y/o en grandes porciones; y una deficiente actividad física o el sedentarismo.

Uno de los métodos más utilizados para evaluar el estado nutricional de una persona, es el índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene al dividir el peso (kg) entre el cuadrado de la estatura (m²). Para poder clasificar el estado nutricional, la OMS estableció los puntos de corte, los cuales establecen el grado de nutrición respecto al IMC mostrados en la siguiente tabla:

Tabla1. Clasificación del estado nutricional respecto al IMC².

Grado de nutrición	IMC (kg/m ²)
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	≥ 25
Obesidad	≥ 30

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino 2016, en México se encontró una prevalencia combinada entre sobrepeso y obesidad del 72.5% en adultos mayores de 20 años, al afectar a 7 de cada 10 adultos. Por otro lado, en el caso de los niños entre 5-11 años la prevalencia de obesidad fue de 33.2% y en adolescentes de 12 a 19 años fue de 36.3%³.

La obesidad presenta diversas comorbilidades como: la hipertensión arterial, el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), dislipidemias, e incluso el cáncer, lo que ocasiona que disminuya drásticamente la calidad de vida⁴.

3.2. Genética de la obesidad

Anteriormente, las variantes genéticas que se conocían asociadas al IMC eran muy limitadas⁵. Sin embargo, hoy en día es posible conocer las variantes de genes asociadas con la obesidad, a través de estudios de asociación de genoma completo (GWAS). Los GWAS son una metodología que permite investigar a miles o millones de polimorfismos o variantes presentes en el genoma humano, donde se compara la frecuencia de estas variantes entre individuos casos o controles⁶. Hasta el momento, se conocen un total de 941 variantes asociadas con el IMC⁷. Además de estar asociado con obesidad, *GNPDA2* también se encontró asociado con el desarrollo de diabetes tipo 2⁸.

La mayoría de los nuevos genes asociados a la obesidad están relacionados funcionalmente a genes implicados en el sistema nervioso central (SNC)⁹.

La mayor parte de los genes reportados por Willer et al. están involucrados en

aspectos funcionales y estructurales de neurotransmisión, los cuales pueden afectar de alguna forma los componentes del control neuronal encargados de la ingesta de energía y la regulación del peso corporal¹⁰. Dentro del SNC se encuentra el hipotálamo, el cual es capaz de integrar señales de adiposidad, para regular la homeostasis energética, dada por la ingesta de alimentos y el gasto energético¹¹.

En ensayos *in vivo*, se sometieron a ratas *Long- Evans* a una dieta alta en grasas por 8 semanas. Se analizó la expresión de 19 genes, los cuales fueron asociados a la obesidad por medio de GWAS, de los cuales se desconocía su función. Se comparó la expresión de estos genes en el hipotálamo, tejido adiposo, hígado y dos diferentes tipos de músculo de ratas alimentadas con una dieta normal y una dieta alta en grasas. Se observó que en el hipotálamo existe una disminución del transcrito de *GNPDA2* en presencia de una dieta alta en grasas comparado con una dieta normal (Figura 1)¹². Además, se observó que no existe diferencia de la expresión del gen *GFAT1*, enzima opuesta a *GNPDA2*, bajo una dieta alta en grasas o control en el hipotálamo¹³.

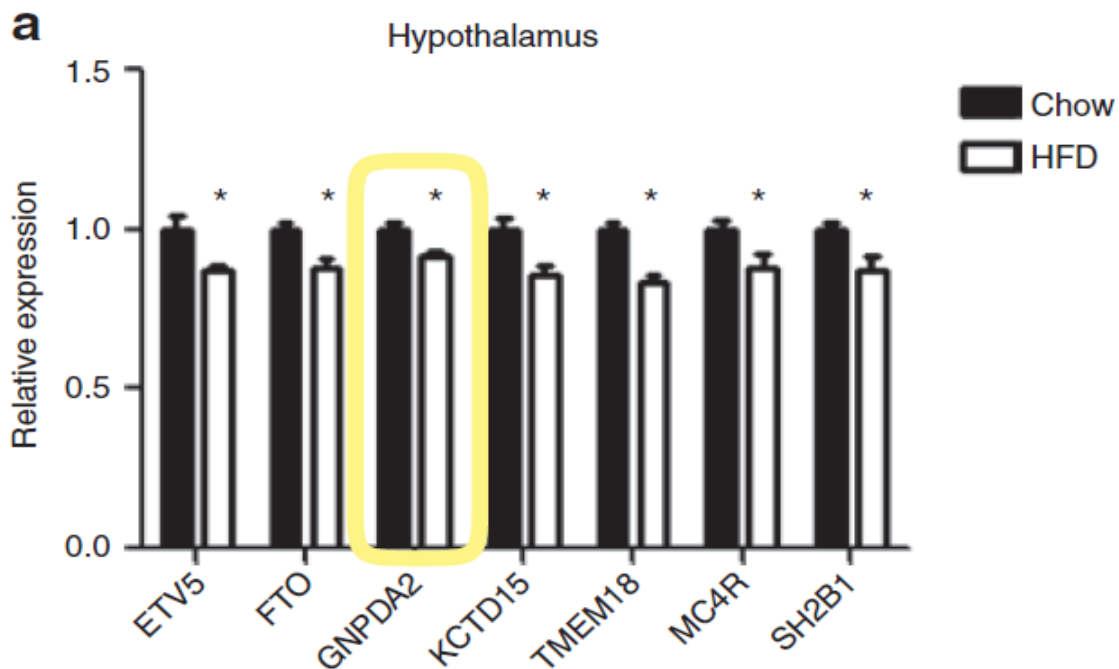


Figura 1. Expresión relativa de RNAm de distintos genes asociados con la obesidad en el hipotálamo. En ratas alimentadas con una dieta alta en grasas respecto a la dieta control (“chow”), existe una disminución de la expresión de *GNPDA2* en el hipotálamo. $p < 0.05^{12}$.

También, se observó que *GNPDA2* se expresa mayoritariamente en el hipotálamo y tejido adiposo, seguido de músculo esquelético y minoritariamente en hígado¹². Sin embargo, en dicho estudio no se investigó la expresión de *GNPDA2* en páncreas, ni su impacto en la secreción de insulina.

3.3. Vía de la biosíntesis de las hexosaminas (HBP)

Las enzimas codificadas a partir de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* pertenecen a la vía de biosíntesis de las hexosaminas.

En el metabolismo de los carbohidratos, la glucosa al ingresar a la célula se fosforila rápidamente a glucosa-6-fosfato (G6P), por medio de la hexocinasa¹⁴. Posteriormente la fosfoglucosa isomerasa convierte a la G6P en fructosa-6-fosfato (F6P), y por medio de varios pasos más, se oxida a la glucosa para obtener ATP, como fuente de energía¹⁵.

Una vez formada la F6P, un 2-5% de este sustrato se desvía hacia la ruta biosintética HBP (Figura 2)¹⁶. La F6P es convertida en glucosamina 6-fosfato (GlcN6P) por medio de la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT1), donde F6P recibe en el C2 un grupo amino de L-glutamina. La reacción inversa de la GFAT1 es catalizada por la enzima GNPDA2, la cual convierte GlcN6P a F6P¹⁷.

Una vez obtenida la GlcN6P, el grupo amino es acetilado y se forma N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc6P). Posteriormente, se isomeriza en N-acetil-alfa-D-glucosamina-1-fosfato (GlcNAc1P), la cual reacciona con UTP para generar UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que se utiliza en la glucosilación de proteínas y la formación de proteoglicanos¹⁸.

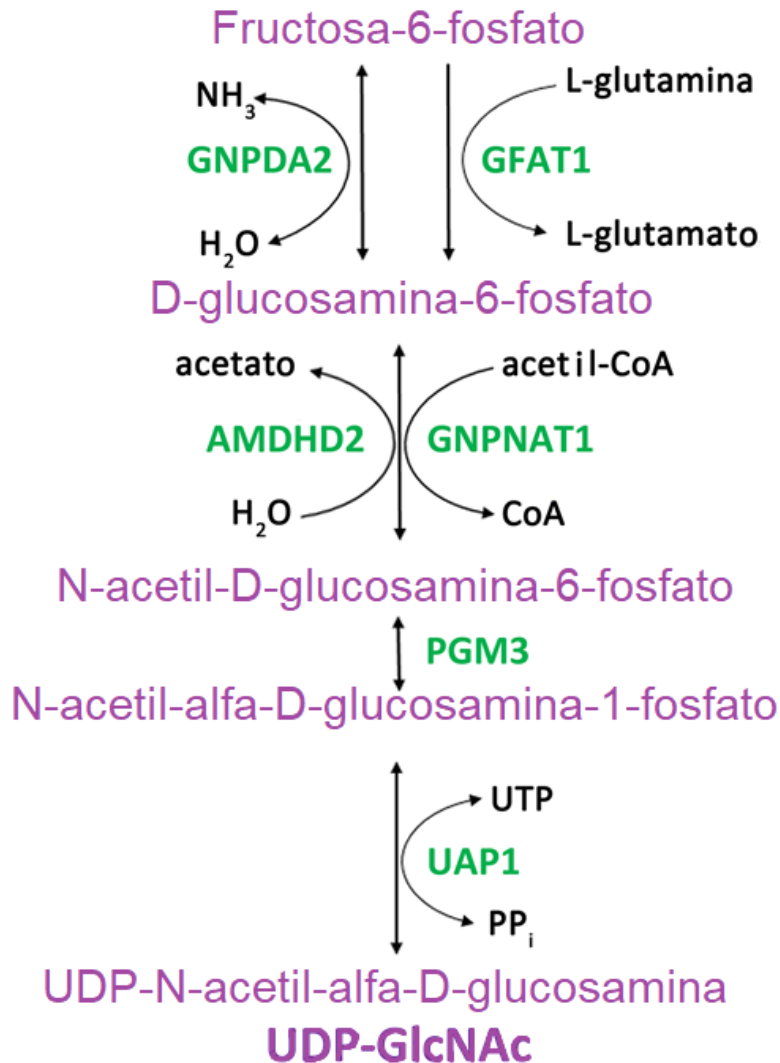


Figura 2. Vía de biosíntesis de las hexosaminas. A partir de la fructosa-6-fosfato, a través de una serie de reacciones enzimáticas, se produce UDP-GlcNAc, el cual es un sustrato clave para la glicosilación de proteínas. GFAT y GNPDA2 son las enzimas encargadas convertir F6P a glucosamina- 6- fosfato y viceversa, respectivamente, por lo que una trabaja a la inversa de la otra. Glucosamina-6-fosfato desaminasa 2 (GNPDA2); glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasas 1(GFAT1); N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa 2 (AMDHD2); fosfato de glucosamina N-acetiltransferasa 1 (GNPNAT1); fosfoglucomutasa 3 (PGM3); UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1(UAP1). Modificado de Oikari, S. et al 2016¹⁹.

3.4. GFAT1

La enzima GFAT1 está codificada por 2 genes no alélicos (*GFPT1* y *GFPT2*) y se expresa en el páncreas, hígado, riñón y músculo esquelético¹⁴.

La sobreexpresión de *GFAT1* se relaciona en la disminución de la función celular, la resistencia a la insulina y en complicaciones de la diabetes²⁰.

El aumento de la vía de HBP debido a condiciones de hiperglucemia, ocasiona que *GFAT1* se sobreexpresa, lo que conlleva a la resistencia a la insulina²¹. Estudios realizados en ratones transgénicos donde se sobreexpresó a *GFAT1* en los adipocitos, ocasionó que los ratones desarrollaron hipertrofia de los adipocitos, aumento de la leptina plasmática y disminución de la adiponectina, así como resistencia a insulina²². Otro estudio de sobreexpresión de *GFAT1* en músculo y tejido adiposo demostró que se generaba resistencia a la insulina, debido a la alteración de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática muscular, lo que impide la captación de glucosa ^{23,24}.

Los cambios en el flujo de HBP, por el incremento en la expresión de *GFAT1*, ocasionan un incremento en la formación de UDP-GlcNAc. Este sustrato actúa como complejo para diferentes enzimas, lo que permite la incorporación del acetilglucosamina a la cadena de oligosacáridos de la proteína. Esta incorporación se hace por medio de un enlace N-glicosídico, cuando se une a una asparagina, o bien, enlace O-glicosídico si se une a una serina/treonina de la proteína blanco²⁵.

Por lo tanto, al sobreexpresarse *GFAT1* provoca el aumento de la O-glicosilación, lo cual conlleva a la glicosilación de proteínas importantes de la vía de señalización de insulina como IRS1 y AKT2, lo que resulta en el desarrollo de la resistencia a la insulina²⁶.

En un estudio realizado en células aisladas de islotes beta pancreáticos, se encontró que al silenciar farmacológicamente a *GFAT1*, ocurre un aumento en la secreción de insulina²⁷.

A pesar de que se conoce la función de la enzima *GFAT1*, se desconoce la función y la regulación de la enzima inversa, la *GNPDA2*. Hasta el momento existen muy pocos estudios donde se demuestre la implicación de *GNPDA2* en el metabolismo.

3.5. *GNPDA2*

GNPDA2 pertenece a la vía de biosíntesis de hexosaminas y es una enzima que cataliza la conversión reversible de D-glucosamina-6-fosfato a D-fructosa-6-fosfato y amonio (Figura 3)¹⁷.

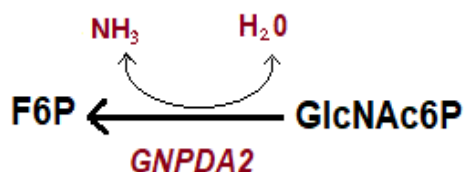


Figura 3. Desaminación de la glucosamina -6- fosfato catalizada por *GNPDA2* para convertir a fructosa-6-fosfato.

Aún son escasos los estudios reportados sobre la función de *GNPDA2*. Uno de ellos, describe las características fisicoquímicas y la conformación de la proteína de *GNPDA2* de la bacteria *E. coli*. En dicho artículo, se describe la interacción entre la enzima *GNPDA2* con su sustrato GlcNAc6P para su transformación a F6P²⁸.

Posteriormente, estudios genéticos demostraron que *GNPDA2* está asociado a la obesidad y con la *DMT2*^{9,29}. Sin embargo, se desconoce la función de este gen y la forma como influye sobre el metabolismo.

Un estudio reciente demostró que la sobreexpresión de *GNPDA2* afecta la adipogénesis y la acumulación de gotas de lípidos en las células madre mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) humanas. Sin embargo, aún no se conoce cuál es su papel para el metabolismo de los lípidos y de la glucosa³⁰.

Por otra parte, Gutiérrez-Aguilar et al. demostraron que la expresión de *GNPDA2* disminuyó en el hipotálamo en animales obesos inducidos por dieta (dieta alta en grasas) comparada contra animales controles¹². Sin embargo, la expresión de *GFAT* no mostró diferencia entre los dos tratamientos¹³.

Con el fin de entender la función de *GNPDA2* en el metabolismo, se inyectó en el tercer ventrículo del hipotálamo los inhibidores farmacológicos, tanto de *GNPDA2*, como de *GFAT1*. Se observó que las ratas tratadas con el inhibidor de *GNPDA2* se volvieron intolerantes a la glucosa. Sin embargo, al inhibir a *GFAT1* en hipotálamo, no hubo diferencia en la prueba de tolerancia a la glucosa¹³.

Esto sugiere que, estos genes pueden estar involucrados en la regulación de la homeostasis de la glucosa. La intolerancia a la glucosa observadas en las ratas, se

podría deber a una disminución en la secreción de la insulina, o bien, a una resistencia de la insulina.

Por lo tanto, la importancia de este proyecto es estudiar si estos dos genes, *GNPDA2* y *GFAT1*, se expresan en células pancreáticas y regulan la secreción de insulina.

3.6. Insulina

La insulina es una hormona peptídica que se sintetiza en las células pancreáticas β de los islotes de Langerhans³¹. La insulina se encarga de mantener los niveles normales de glucosa en sangre, al facilitar la absorción de glucosa celular. Además, regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos³².

3.7. La secreción de insulina

Una adecuada secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas es de vital importancia para lograr un adecuado equilibrio energético. Normalmente, estas células están adaptadas para detectar la glucosa en sangre y ajustar la secreción de insulina de acuerdo con las necesidades del organismo³³.

La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés) es un mecanismo metabólico que mantiene la homeostasis de la glucosa. Esta secreción ocurre en dos fases. La primera fase comienza a los pocos minutos (5 min) de la estimulación y ocurre con la liberación de la insulina ya sintetizada y

almacenada en los gránulos secretores. La segunda fase comienza unos pocos minutos después de haberse llevado a cabo la primera fase (15 min)³⁴.

La secreción de insulina comienza cuando la glucosa ingresa a las células β , por difusión facilitada a través de transportadores de glucosa (GLUT 1 y 2)³⁵. Una vez adentro de las células, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa, para llevar a cabo la glucólisis y producir piruvato como producto final (Figura 4). Posteriormente, el piruvato ingresa a la mitocondria donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, generando un incremento de ATP. El ATP sale al citoplasma, lo que provoca un aumento de la relación ATP: ADP, lo cual ocasiona el cierre del canal de potasio sensible al ATP (K_{ATP}). El cierre de K_{ATP} provoca la despolarización la membrana plasmática, lo que desencadena la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje. Esto tiene como consecuencia la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula y desencadena la exocitosis de los gránulos de insulina³³.

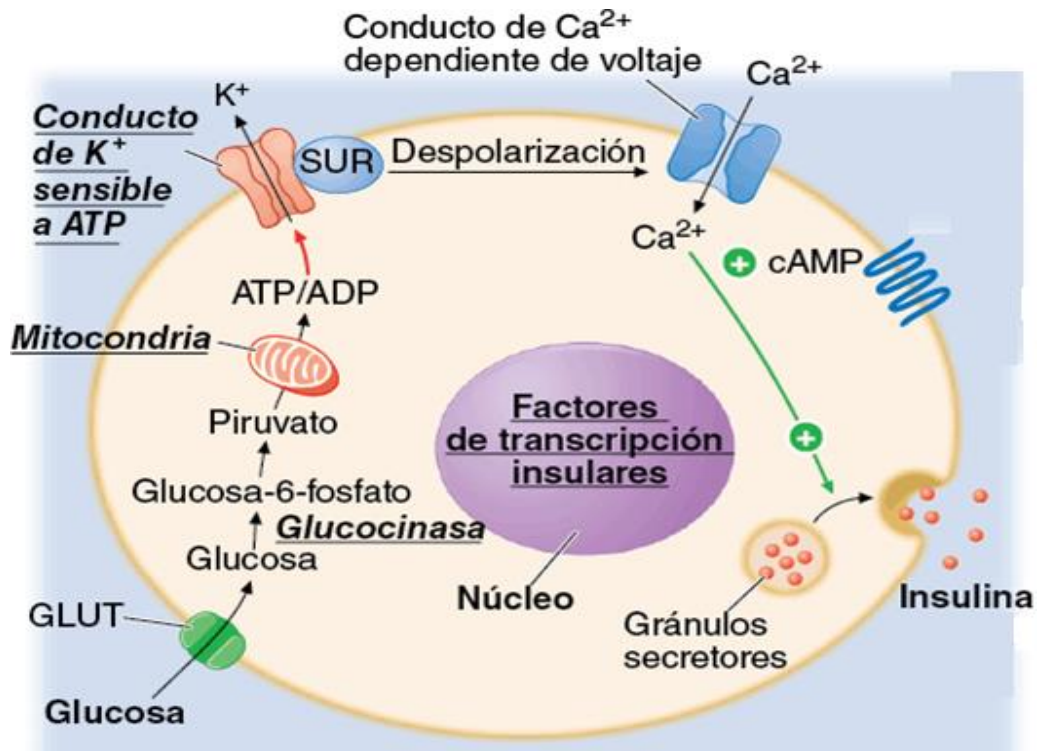


Figura 4. Mecanismo de la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células beta. La glucosa es transportada por un transportador de glucosa (GLUT1, GLUT2), para su transformación a ATP por medio de la glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. La obtención de ATP modifica la relación ATP:ADP, causando el cierre del canal de potasio (K_{ATP}). Esto provoca la despolarización de la membrana y consecuentemente, permite la entrada de calcio, lo que conlleva a que la insulina sea secretada por los gránulos de insulina³⁶.

3.8. La resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina (RI) se describe como la capacidad disminuida de la insulina para llevar a cabo sus funciones. La RI es ocasionada por un defecto en la unión de la insulina a su receptor y en su cascada de señalización¹⁵.

La RI crónica es un rasgo común de numerosas enfermedades metabólicas como la DMT2 y la obesidad³⁷.

En la DMT2, la principal causa que conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina, ocurre por la deficiencia en la señalización de la insulina, causada por distintas alteraciones³⁸. Estas alteraciones pueden ser mutaciones y/o modificaciones post-traduccionales del receptor de insulina o de moléculas efectoras localizadas río abajo del mismo³⁹. Estas alteraciones reducen la incorporación de glucosa en el tejido muscular y adiposo y promueven alteraciones a nivel metabólico.

La secreción de insulina aumenta inicialmente en respuesta a la RI, con la finalidad de compensar y mantener la homeostasis de la glucosa³⁶. Al principio, el defecto en la secreción de insulina es leve y afecta de manera selectiva la secreción de insulina estimulada por glucosa. Sin embargo, este defecto, conforme avanza, provoca que la insulina producida por el páncreas sea insuficiente para metabolizar el azúcar en la sangre, por lo que el nivel de glucosa se mantiene elevado incluso en ayunas (glucosa con niveles mayores de 100 a 125 mg/dL), lo que conlleva a la resistencia a la insulina y posteriormente a la DMT2¹⁵.

La mayoría de las acciones biológicas de la insulina, después de unirse a su receptor, se llevan a cabo mediante la activación de dos vías de señalización principales: 1) la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt), que tiene un papel central en la regulación de la adipogénesis, transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y proteínas; 2) la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPK/Ras), que regula la expresión de genes relevantes a los efectos finales de proliferación, diferenciación celular y los efectos mitógenos asociados a la insulina⁴⁰.

Los estudios para conocer la etiología y los mecanismos moleculares de la RI se centran en las alteraciones de los componentes de la cascada de señalización de la insulina.

En particular para este proyecto, el gen *GFAT1* afecta directamente a la vía de señalización de insulina PI3K/AKT, la cual se describe a continuación.

3.9. Cascada de señalización de la insulina

Vía de la fosfatidilinositol-3- cinasa (PI3K/Akt)

La vía de señalización de PI3K/AKT, es estimulada fisiológicamente por la activación de receptores de membrana tirosina cinasa, ocasionando una fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS)⁴¹. Este sustrato fosforila la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3- cinasa (PI3K), lo que provoca cambios en la conformación de la subunidad p85 y favorece la unión de la subunidad catalítica (p110). La PI3K activa por fosforilación al fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP₂), y lo convierte en fosfatidil inositol 3,4, trifosfato (PIP₃). PIP₃ es el segundo mensajero que conduce a la activación de la proteína Akt, mediante su fosforilación en el residuo de treonina 308 ocasionada por la cinasa PDK-1 (Figura 5)^{32,42}. Akt1 desempeña un papel en la acción de la insulina en los adipocitos y en el metabolismo de los lípidos en las células del músculo esquelético⁴³. En el músculo esquelético, la activación de PI3K es un paso esencial para la translocación de GLUT4 inducida por insulina, que conduce a la absorción de glucosa⁴⁰.

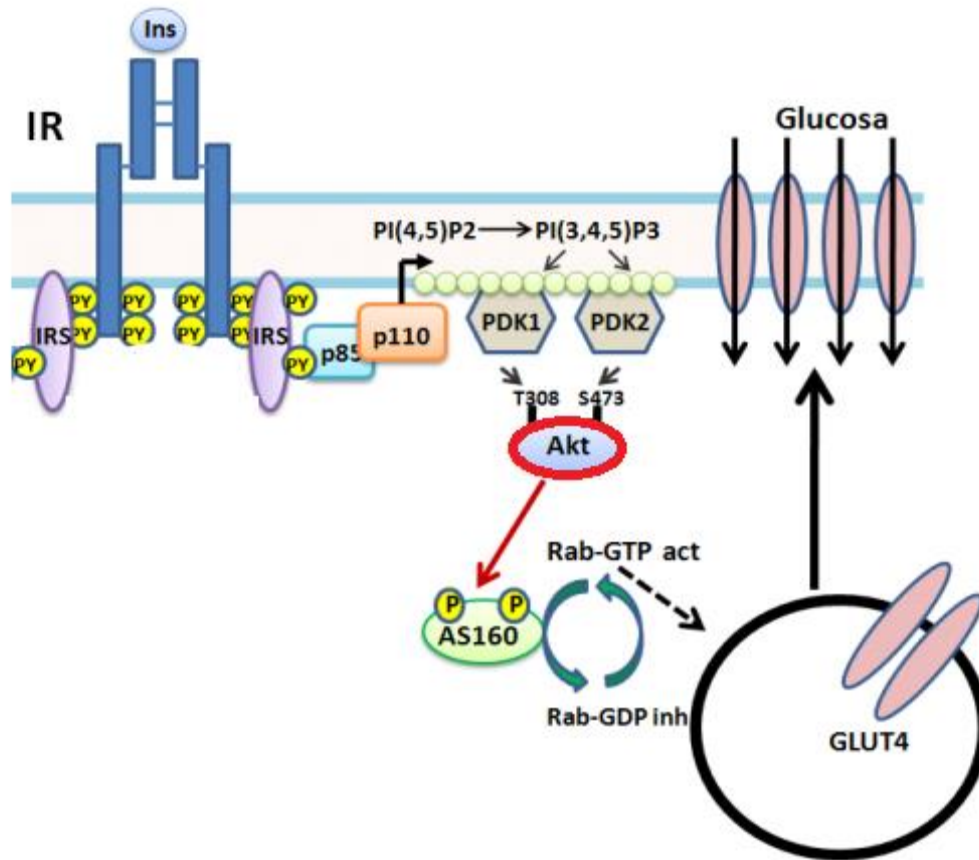


Figura 5. Vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/Akt). La insulina se une a su receptor y causa su autofosforilación. Esto provoca que IRS se una a los sitios fosforilados por el receptor de insulina. Posteriormente, IRS se fosforila y se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2, como PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 ocasiona la activación de p110, dándole acceso a su sustrato PI(4,5)P2. Dicho sustrato es fosforilado en la posición 3 del inositol, genera PI(3,4,5)P3, el cual sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induce una primera fosforilación en la Ser473, seguida por una fosforilación en la Thr308, esta última inducida por PDK1. Akt es responsable de regular varios efectos metabólicos de la insulina como la translocación de GLUT4 para la internalización de la glucosa a la célula³².

En presencia de hiperglicemia, la vía de la biosíntesis de las hexosaminas se activa y provoca la glucosilación de IRS, que es la adición de GlcNAc a residuos de serina/treonina de la proteína⁴⁴. IRS1 glucosilada reduce la interacción con PI3K, además altera la fosforilación y activación de la cinasa de Akt y provoca que la señalización de la insulina no se lleve a cabo. Todo esto conduce a hiperglicemia y posteriormente a un estado de hiperinsulinemia compensadora, que conlleva al agotamiento de la célula beta y al desarrollo de RI y DTM2⁴⁵.

Por otra parte, se reportó que, en adipocitos primarios de rata, IRS1 y AKT2 sufren glucosilaciones, por medio de O-GlcNAc, reduciendo su fosforilación al ser estimuladas por insulina. Estos cambios post-traduccionales conllevan a una mala señalización de la insulina y por lo tanto, provoca la resistencia a la insulina²⁶.

Entonces, GFAT1 está involucrado en la vía de las HBP, como un regulador clave de esta vía. La sobreexpresión de esta enzima, causada por condiciones de hiperglucemia, conduce a la glucosilación de proteínas reguladoras de la señal de la insulina, lo que provoca que ocurra la resistencia a la insulina. Por el contrario, GNPDA2, como enzima inversa, en condiciones de hiperglucemia su actividad estaría baja, ya que se promovería la de GFAT.

3.10. Las células INS-1 (832/13)

Las INS-1 (832/13) es un derivado de las células INS-1, originalmente establecido a partir de un insulinoma inducido por rayos X en ratas⁴⁶.

Para poder obtener estas clonas, las células INS-1 se transfectaron con un plásmido que contenía el gen de la insulina humana. Esta selección de clonas, permitió obtener células con la capacidad de sintetizar y secretar tanto insulina de rata, como humana³⁷. Estas características hacen que las células INS-1 (832/13) sean un modelo utilizado para investigar mecanismos de secreción celular de insulina.

Por lo tanto, esta línea celular se utilizará como modelo experimental, para ser sometido a ensayos de secreción de insulina estimulada por glucosa. Esto se hará en células control, así como en células donde los genes *GNPDA2* y *GFAT1* serán silenciados. De esta forma, se podrá conocer si estos genes influyen en la secreción de insulina.

4. Planteamiento del problema

GNPDA2 es un gen que ha sido asociado con la obesidad y diabetes, por medio de estudios de asociación del genoma completo. Sin embargo, se sabe muy poco sobre su función e implicación en el metabolismo.

GNPDA2 es una enzima implicada en la vía de HBP y ejerce la reacción inversa de la *GFAT1*. La sobreexpresión de *GFAT1* provoca resistencia a la insulina, por medio de la glucosilación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina.

Por otra parte, la expresión de *GNPDA2* se encuentra disminuida en el hipotálamo en ratas obesas inducidas por dieta. Sin embargo, *GFAT1* no cambió su expresión. Esto pudiera deberse a que, la disminución de *GNPDA2* pueda provocar que la vía HBP se encuentre activa, lo que conlleva a la glucosilación de proteínas implicadas en la señalización de insulina y *por ende* la resistencia a la insulina característica en las ratas obesas.

La inhibición de *GNPDA2* en tercer ventrículo ocasionó intolerancia a la glucosa; sin embargo, la inhibición de *GFAT1* no tuvo efectos en la homeostasis a la glucosa. Además, se sabe que al inhibir a *GFAT1* en los islotes pancreáticos, incrementa la secreción de la insulina.

Por lo tanto, es importante estudiar la implicación de la vía de las hexosaminas, no solamente en la resistencia a la insulina, sino también en la secreción de la insulina, para comprender mejor los mecanismos de ambos genes en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuál es la implicación de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina al ser silenciados mediante siRNAs en la línea celular INS-1 (832/13)?

5. Hipótesis

Se espera que el silenciamiento de *GNPDA2* disminuirá la secreción de insulina, mientras que al silenciar a *GFAT1* aumentará la secreción de insulina, todo esto al ser sometidos a un estado de hiperglucemia en la línea celular INS-1 (832/13).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar la implicación de *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina en la línea celular INS1(832/13).

6.2. Objetivos particulares

- Medir la expresión de *GNPDA2* y *GFAT1* en la línea celular INS1 (832/13).
- Transfectar las células con siRNA contra *GNPDA2* y *GFAT1*.
- Verificar la expresión de *GNPDA2* y *GFAT1* después de 72 horas de transfección.
- Someter las células transfectadas a ensayos de GSIS.
- Medir la expresión de los genes en presencia y ausencia de glucosa.
- Medir la secreción de insulina mediante la técnica de ELISA en ausencia o presencia de los genes *GNPDA2* y *GFAT1*.

7. Material y métodos

7.1. Tipo de estudio

Se llevó a cabo un estudio experimental transversal.

7.2. Criterios de inclusión

- Línea celular INS-1 (832/13), entre el pasaje 22 al 30, con una confluencia del 80%.
- Genes *GNPDA2* y *GFAT1*.

7.3. Criterios de exclusión

- Cualquier otra línea celular.
- Células viejas.
- Células que sobrepasen o no alcancen la confluencia adecuada.

7.4. Variables

Dependiente: secreción de insulina y expresión de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* en las células INS1 (83213).

Independiente: tratamiento de las células con siC vs si*GFAT* o si*GNPDA2* y tratamiento con glucosa a 0 mM, 3 mM y de 15 mM.

7.5. Metodología

7.5.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular INS-1 (832/13), derivada de células β pancreáticas de rata, caracterizadas por ser secretoras de insulina ³⁷.

Estas células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma R8758), suplementado con (FBS) suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (Gibco, 10082), buffer HEPES 10 mM (Gibco, 15630-080), L-glutamina 2 mM (Gibco, 25030-081), piruvato sódico 1mM (Sigma, S8636), 2-mercaptoetanol 0.05 mM (Gibco, 21985023) y antibióticos penicilina-estreptomina a 100 U/mL-10mg/mL (HyClone™ SV30010). Se mantuvieron en un ambiente húmedo a 37°C y con 5% de CO₂, hasta obtener una confluencia adecuada (80%).

Cuando se obtuvo la confluencia ideal, se retiró el medio y se lavó con 2 mL de PBS (pH= 7.4), se agregó por los bordes para no desprender las células. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. Se agregó 1 mL de tripsina (HyClone™, SH30042.02) y se incubó a 37°C por 2 min, para desprender las células vivas de la base de la placa. Las células se colectaron en tubos falcón de 15mL y fueron centrifugadas por 3 min a 2000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de medio completo con antibiótico.

7.5.2. Conteo celular

De las células resuspendidas se tomaron 10 μL y se adicionaron a un tubo Eppendorf con 90 μL de PBS, se realizó así una dilución 1:10. A partir de este tubo, se tomaron 10 μL más 90 μL de PBS, para obtener una dilución final de 1:100. De esta última dilución, se colectaron 10 μL para cargar en la cámara de Neubauer (MARIENFELD® 0610010) y se realizó el conteo celular.

El conteo de células se realizó en 3 campos distintos de los cuadrantes con un área de 1 mm^2 . Se sumaron las células contadas para aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{\sum(\# \text{ de células})}{(\# \text{ Campos} * \text{Área de conteo}(\text{mm}^2) \times \text{Profundidad}(\text{mm}) \times \text{factor dilución})} = \text{Cél.}/\mu\text{L}$$

Donde:

Profundidad = 0.1 mm

#Campos = 3

Área de conteo = 1 mm^2

Factor dilución = 1/100

7.5.3. Transfección de siRNAs *GNPDA2* y *GFAT1*

Para realizar la transfección, se colocaron 6×10^5 células/ pozo, en cajas de 6 pozos con 2 mL de medio completo. Se incubaron en un ambiente húmedo a 37°C y con 5% de CO_2 . Al siguiente día del plaqueo, se realizó la transfección con los siRNAs contra *GNPDA2* (*siGNPDA2*), *GFAT1* (*siGFAT1*) y un siRNA control (*siC*). Los siRNAs son segmentos de 20 a 30 nucleótidos, que al internalizarse en la célula, tienen por objetivo silenciar un gen específico⁴⁷. Este silenciamiento ocurre cuando los siRNAs son introducidos en las células con ayuda de agentes de transfección, que son compuestos de lípidos catiónicos o polímeros⁴⁸. Estos lípidos catiónicos poseen una cabeza cargada positivamente unida a dos cadenas alifáticas, por lo que se favorece la interacción entre el lípido y los fosfatos de los ácidos nucleicos, lo que resulta en la formación de un complejo RNA-liposomas. Una vez unido este complejo a la membrana, es ingresado a la célula por endocitosis mediante la formación de vesículas ⁴⁹.

A 99 μL de medio sin suplementos, se le agregó 1 μL de agente de transfección (Thermo Scientific T-2001-02) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos (reactivo A). Por otra parte, se preparó la cantidad de siRNA control y de los siRNAs contra *GNPDA2* y *GFAT1*, a una concentración final de 40 nM, se agregó 99 μL de medio sin suplementos y un 2 μL de siRNA del stock (reactivos B). Dado que se tienen 3 siRNAs diferentes (control, *GNPDA2* y *GFAT1*) se prepararon 3 tubos con sus respectivo siRNA.

Posteriormente, se agregó 100 μL del reactivo “A” a cada tubo con el reactivo “B,” para obtener un volumen final de 200 μL para cada pozo por transfectar. Esto se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Durante dicha incubación, se retiró el medio de las cajas plaqueadas y se añadieron 1800 μL de medio completo. Transcurridos los 20 minutos de incubación, se tomaron 200 μL de la mezcla A + B y se agregaron a los respectivos pozos. Se incubaron en un ambiente húmedo a 37°C y con 5% de CO_2 . Al cabo de 24 horas de la transfección, se cambió el medio de cultivo por medio completo y se incubaron nuevamente hasta las 72h después de la transfección.

7.5.4. Extracción de RNA

Este ensayo se realizó por medio del kit de purificación total de RNA, de acuerdo con las instrucciones del inserto (Jena Bioscience, PP-210S).

Se retiró el medio de los pozos que contenían las células transfectadas. Se colocaron las cajas sobre hielo para evitar que se degrade el RNA y se agregaron 500 μL de buffer de lisis a cada pozo. Con ayuda de unas espátulas planas, se desprendieron las células manualmente y se tomó este homogenizado, colocándolo en un tubo Eppendorf. Se agregaron 300 μL de isopropanol a los tubos y se homogenizó nuevamente.

A continuación, se prepararon las columnas de extracción, se colocaron 90 μL de buffer de activación y se centrifugan a 10,000 g durante 30 s. Al término de este procedimiento, se desechó el filtrado.

Con las columnas activadas, se colocó el homogenizado de las muestras a su columna correspondiente. Se centrifugó a 10,000 g durante 30 segundos y se descartó el eluído. En este paso, el RNA queda retenido en la membrana de sílica de la columna y con ayuda de los lavados posteriores, se purificó de contaminantes que pudiera tener.

Se realizaron 2 lavados uno con 700 μ L de buffer de lavado primario, centrifugando nuevamente a 10 000 g por 30 s y se desechó el eluído. Se repitió este paso, pero ahora se agregó el buffer de lavado secundario. Al término de este procedimiento, se centrifugó nuevamente durante 2 min, para eliminar todo el excedente de buffer que se encuentra en la columna.

Para eluir el RNA de la columna, se colocaron las columnas en tubos Eppendorf nuevos y se agregaron 30 μ L de agua libre de RNAsas y se centrifugó a 10000 g por 1 min.

Para poder conocer la pureza y concentración de RNA extraído, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm con ayuda del espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO).

7.5.5. Síntesis de cDNA por transcripción reversa (RT)

La retrotranscripción es una técnica, que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA, por medio de la enzima transcriptasa reversa⁵⁰.

Este procedimiento se realizó de acuerdo con el inserto del kit de síntesis de cDNA (Jena Bioscience, PCR-511S), se ajustaron los reactivos para un volumen final de 20µL por reacción y a una concentración final de 1000 ng de RNA por reacción (Tabla 2).

Tabla 2. Reactivos para la reacción de transcripción reversa (RT)

Reactivo	Volumen (µL)
Hexámeros aleatorios	0.5
Buffer completo para la Script RT	4.0
Mezcla de NTPs	1.0
Ditiotreitol (DTT)	1.0
Inhibidor de RNAsas	1.0
Transcriptasa reversa Script	0.5
RNA 1000 ng	c.b.p
Agua libre de RNAsas	c.b.p. 20 UI

Las reacciones fueron incubadas en un termociclador (Axygen Maxygene II, PCR convencional). Se utilizaron las siguientes condiciones: 10 min a 42°C, seguido de 60 min a 50 °C; finalmente, se inactiva la transcriptasa reversa a 70°C por 10 min.

7.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para amplificar o hacer muchas copias de un gen o una región de ADN en específico. En la qPCR en tiempo real, la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción va transcurriendo, es decir, la detección sucede en cada ciclo de la reacción ⁵¹. De esta forma, se detecta la cantidad de transcrito existente en la muestra.

Para poder llevar a cabo esta reacción, se requiere de una serie de componentes como: 1) las sondas TaqMan, las cuales son sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un «quencher» (apagador), los cuales se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no se hibride a su secuencia blanco. Cuando la sonda específica se hibrida al cDNA del gen de interés, la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa ocasiona que se rompa la unión de la sonda, lo que provoca que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo⁵². 2) El material genético de la muestra de interés que se desea amplificar (cDNA). 3) Se requiere también de la Taq polimerasa, primers, dNTPs, magnesio, buffer y agua, los cuales se encuentran en mezcla para la reacción.

Para la amplificación se utilizó la mezcla de reacción fast qPCR Probes Master high ROX (Tabla 3, Jena Biocence, cat. PCR-384L). Además, las sondas utilizadas fueron para *GNPDA2* (RN01413703_M3), *GFAT1* (Rn01765495_m3) y *L32* (Rn00820748_g1).

Tabla 3. Reactivos para la reacción de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Reactivo	Volumen (μL)
Mezcla para qPCR ProbesMaster UNG (Jena Bioscience $\text{\textcircled{R}}$)	5.0
Agua libre de RNAsas/DNAsas	3.5
Muestra (cDNA)	1.0
Sonda para el gen específico	0.5

Este experimento se llevó a cabo en el termociclador (Agilent AriaMX, PCR en tiempo real) con los siguientes parámetros de incubación: 2 min a 50°C, seguido de 2 min a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Los datos obtenidos fueron analizados por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$, con la finalidad de obtener valores de expresión relativa, que son normalizados por los valores obtenidos del gen de referencia *L32*.

7.5.7. Ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, “glucose stimulated insulin secretion”)

La secreción de la insulina es muy sensible a los cambios de concentración de glucosa. Esto se logra, ya que el metabolismo de la glucosa se acopla a la secreción de la insulina, a través de los cambios en los niveles intracelulares de ATP y la actividad eléctrica de las células β -pancreáticas.

Para el ensayo de GSIS, primero se realizó la transfección de las células con los respectivos siRNAs (siRNA contra *GNPDA2*, *GFAT1* o siControl). A las 72 horas posteriores a la transfección, se eliminó el medio y se enjuagó con solución salina balanceada de Hanks (HBSS). Se dejaron las células en incubación con HBSS por 2 horas.

Transcurrida esa incubación, se quitó esa solución y se añadieron a los pozos la glucosa a una concentración de 3 mM o de 15 mM, ya sea para los tratamientos con el siC o siRNAs para cada gen. Se dejó incubar por 1 hora. Se recolectaron 500 μ L del sobrenadante de cada pozo para realizar la medición de la secreción de insulina por ELISA.

Se eliminó el resto del medio y se extrajo RNA de las células para la cuantificación de los transcritos de ambos genes estimuladas por diferentes concentraciones de glucosa.

7.5.8. Determinación de la concentración de insulina por ELISA

A partir de la recolección del medio de las células sometidas al ensayo de GSIS, se realizó la medición de la concentración de insulina secretada mediante el kit para ELISA (ALPCO 80-INSRT-E01).

Las muestras se diluyeron para correrlas en el ELISA. Las diluciones fueron: 1:3 para los medios estimulados con 3 mM de glucosa y 1:7 para los medios estimulados con 15 mM de glucosa.

De las diluciones anteriores, se pipetearon 10 μ L de cada muestra y se colocaron en las placas de ELISA que contiene el kit. Se agregaron 75 μ L de la solución con anticuerpo conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) a cada pozo. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se mantuvo la placa en agitación.

Trascurrido el tiempo, se decantó el contenido de los pozos y se lavó 6 veces con 350 μ L de buffer de lavado. Después, se colocaron 100 μ L de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a cada pozo y se incubó durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100 μ L de la solución de paro y se midió la absorbancia a 450 nm. Cabe mencionar que, en la placa también se colocaron los estándares de concentraciones de insulina para obtener la curva estándar. Los resultados obtenidos, se interpolaron en la curva estándar, para conocer la concentración de insulina secretada por las células bajo los diferentes tratamientos de glucosa y de presencia o ausencia de los genes *GNPDA2* y *GFAT1*.

El resumen de la logística de todos los experimentos se muestra en la Figura 6.

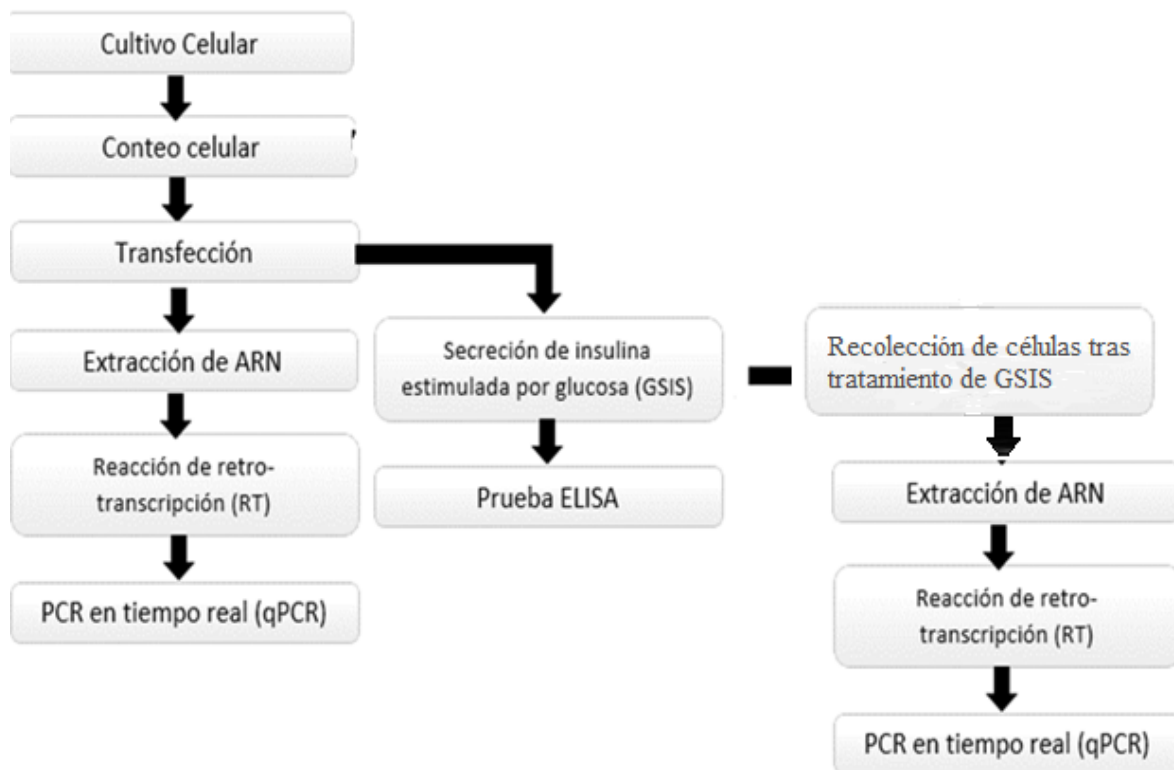


Figura 6. Esquema de los experimentos realizados durante el desarrollo de este proyecto.

8. Resultados

8.1. Optimización de las sondas *GNPDA2* y *GFAT1*

Al ser la primera vez que se estudian los genes *GNPDA2* y *GFAT1* en la línea celular INS1 (832/13), se necesitaba saber si estos genes se expresan en esta línea celular.

Para poder medir la expresión de los genes *GNPDA2* y *GFAT1*, fue necesario optimizar la reacción de qPCR, tanto la cantidad de sonda y como la concentración de cDNA utilizadas por cada reacción.

Las condiciones que se probaron fueron: a) diferentes concentraciones de las sondas de *GNPDA2* y *GFAT1*. Se utilizaron sondas concentradas o diluidas 1:5 y 0.5 μ L de cada concentración. b) Diferentes concentraciones del cDNA, donde se utilizó 2 μ l o 1 μ l del cDNA concentrado o 1 μ l cDNA diluido 1:5.

En la Figura 7, se muestra la optimización de la reacción para medir el transcrito de *GNPDA2*. Se observó que al utilizar la sonda concentrada (1, 2 y 3), las curvas son mayores comparadas con la sonda diluida (4, 5, 6), ya que emiten una fluorescencia mayor. Sin embargo, para las sondas diluidas se obtiene señal suficiente para obtener buenas lecturas. Las condiciones y los resultados de los CTs obtenidos se muestran en la Tabla 4.

En cuanto a la optimización de la cantidad de cDNA, se observó que para la condición de la sonda concentrada (curvas 1, 2 y 3) y cuando se agregó 2 μ l, 1 μ l de cDNA concentrado o 1 μ l de cDNA diluido 1:5, se obtienen CTs de 26.44, 28.86

y 30.64, respectivamente. Mientras que con la sonda diluida 1:5 (curvas 4, 5 y 6) y al colocar 2 μ l, 1 μ l de cDNA concentrado o 1 μ l de cDNA diluido 1:5, se obtienen CTs 24.75, 25.73 y 29.66, respectivamente.

Al comparar las gráficas de las sondas concentradas con las sondas diluidas, se observa que los CTs son mayores, pero se obtuvo la misma tendencia en cada tratamiento. Es por esto que podemos concluir que la sonda diluida se puede utilizar para detectar este gen y de esta forma ahorrar en reactivos.

Por lo tanto, las condiciones óptimas para la detección de *GNPDA2* son: 0.5 μ l de sonda para *GNPDA2* diluida (1:5) y 1 μ l cDNA concentrado.

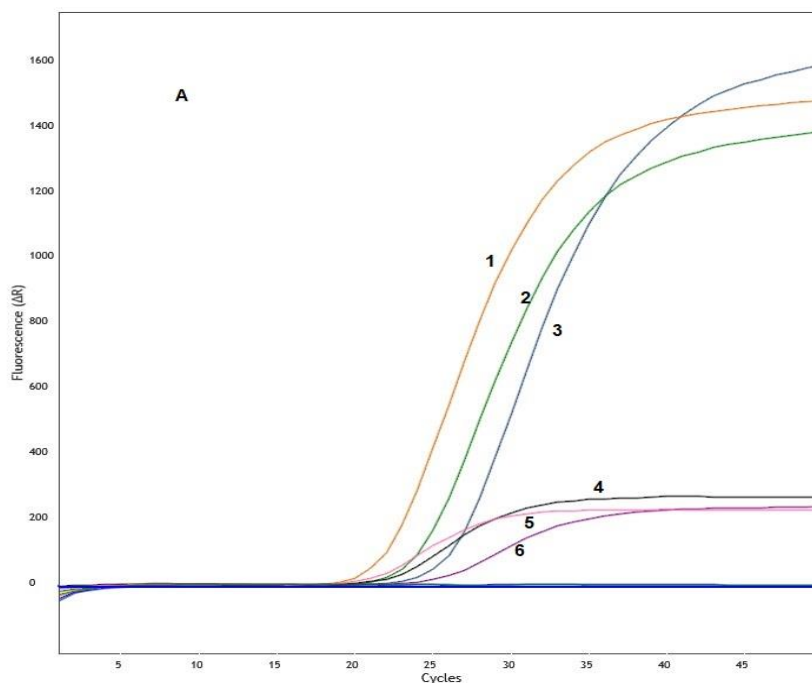


Figura 7. Curvas de amplificación del gen *GNPDA2* en las células INS-1 (832/13). (1) Sonda concentrada con 2 μ l cDNA, (2) Sonda concentrada con 1 μ l cDNA, (3) Sonda concentrada con 1 μ l cDNA diluido 1:5, (4) Sonda diluida 1:5 con 1 μ l cDNA, (5) Sonda diluida 1:5 con 2 μ l cDNA, (6) Sonda diluida 1:5 con 1 μ l cDNA diluido 1:5, línea azul como control negativo.

Tabla 4. Valores de CTs y condiciones para la optimización de la sonda *GNPDA2*

Símbolo	Muestra con Sonda Concentrada	Cq (ΔR)
1	cDNA diluido 1:5, 1 μ L	30.64
2	cDNA concentrado, 1 μ L	28.86
3	cDNA concentrado, 2 μ L	26.66
Símbolo	Muestra con Sonda Diluida 1:5	Cq (ΔR)
4	cDNA diluido 1:5, 1 μ L	29.66
5	cDNA concentrado, 1 μ L	25.73
6	cDNA concentrado, 2 μ L	24.75

Para optimizar la sonda de *GFAT1*, se utilizaron las mismas condiciones que para el gen *GNPDA2*. De igual forma, se observó que existe una mayor fluorescencia de las curvas cuando la sonda está concentrada (Figura 8). En la Tabla 5, se muestran los valores de CTs obtenidos y las condiciones que se emplearon. En estos tratamientos se utilizó la sonda concentrada (curvas 1, 2 y 3) y el cDNA concentrado se agregó 2 μ l, 1 μ l o 1 μ l del cDNA diluido 1:5. Se obtuvieron CTs de 27.86, 28.93 y 32.66, respectivamente. Mientras que con la sonda diluida 1:5 (curvas 4, 5 y 6) y con 2 μ l, 1 μ l de cDNA concentrado o 1 μ l de cDNA diluido 1:5, los CTs fueron de 20.39, 25.44 y 26.87, respectivamente. Estos resultados muestran un comportamiento muy similar a *GNPDA2*, por lo que se decidió emplear para *GFAT1* la condición de 0.5 μ l de sonda para *GFAT1* diluida 1:5 y 1 μ l cDNA concentrado.

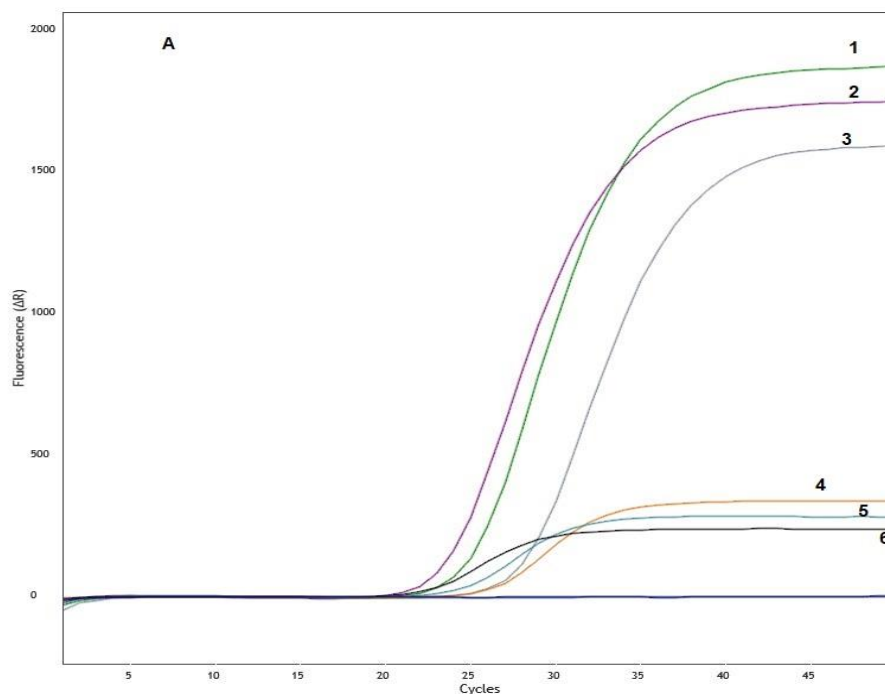


Figura 8. Gráficas de amplificación del gen *GFAT1* en células INS-1 (832/13).
(A)(1) Sonda concentrada/ 1 μ l cDNA, **(2)** Sonda concentrada/ 2 μ l cDNA, **(3)** Sonda concentrada/ 1 μ l cDNA diluido 1:5, **(4)** Sonda diluida 1:5 / 1 μ l cDNA diluido 1:5, **(5)** Sonda diluida 1:5 / 1 μ l cDNA, **(6)** Sonda diluida 1:5 / 2 μ l cDNA.

Tabla 5. Valores de los CTs y las condiciones para la optimización de la sonda *GFAT1*

Símbolo	Muestra con Sonda Concentrada	Cq (Δ R)
1	cDNA diluido 1:5, 1 μ L	32.66
2	cDNA concentrado, 1 μ L	27.86
3	cDNA concentrado, 2 μ L	28.93
Símbolo	Muestra con Sonda Diluida 1:5	Cq (Δ R)
4	cDNA diluido 1:5, 1 μ L	26.87
5	cDNA concentrado, 1 μ L	25.44
6	cDNA concentrado, 2 μ L	20.39

Por lo tanto, las condiciones óptimas para detectar al gen *GNPDA2* es 0.5 µl de sonda diluida 1:5 y 1 µl cDNA concentrado y para el gen *GFAT1* es 0.5 µl de sonda para *GFAT1* diluida 1:5 y 1 µl cDNA concentrado, en un volumen final de 10 µl de reacción.

Estos resultados muestran que los genes *GNPDA2* y *GFAT1* se expresan en la línea celular INS1 (832/13).

8.2. Optimización de la transfección con siRNA contra *GNPDA2* y siRNA contra *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13)

Una vez comprobado que los genes *GNPDA2* y *GFAT1* se expresan en las células INS1 (832/13), lo siguiente era silenciar a los genes, con el fin de estudiar su función.

Para las optimizaciones, se probaron diferentes concentraciones de los siRNAs contra *GNPDA2* (siGN) o contra *GFAT1* (siGF): 10 nM, 20 nM y 40 nM y se agregó 1 µL de agente de transfección. Adicionalmente, en otros pozos se probaron 20 nM de siRNA contra cada uno de los genes de interés en pozos diferentes y con 2 µL de agente de transfección. Así mismo, para el control, se transfectó el siRNA control (siC) a una concentración de 20 nM y 1 µL de agente de transfección. Además, se colocaron células sin tratamiento como referencia de células intactas.

A las 72 horas después de la transfección, se cuantificó la expresión relativa de los genes. En el caso de *GNPDA2*, se observó que el transcrito disminuyó en todas las condiciones donde se utilizó el agente de transfección, comparadas con las células sin tratamiento. Esto indica que el agente de transfección modifica a las células. Por

dicha razón, las condiciones de silenciamiento de *GNPDA2* se compararon contra las células tratadas con el siC. Se observó que en la concentración de 10 nM del siGN existió una disminución del 50 % del transcrito, seguido por una disminución del 54% con una concentración de 20 nM y del 65% con 40 nM del siRNA contra *GNPDA2*. Al utilizar 2 μ L de agente de transfección y una concentración de 20 nM, el transcrito se silenció en un porcentaje igual que con 1 μ L de agente de transfección (Figura 9).

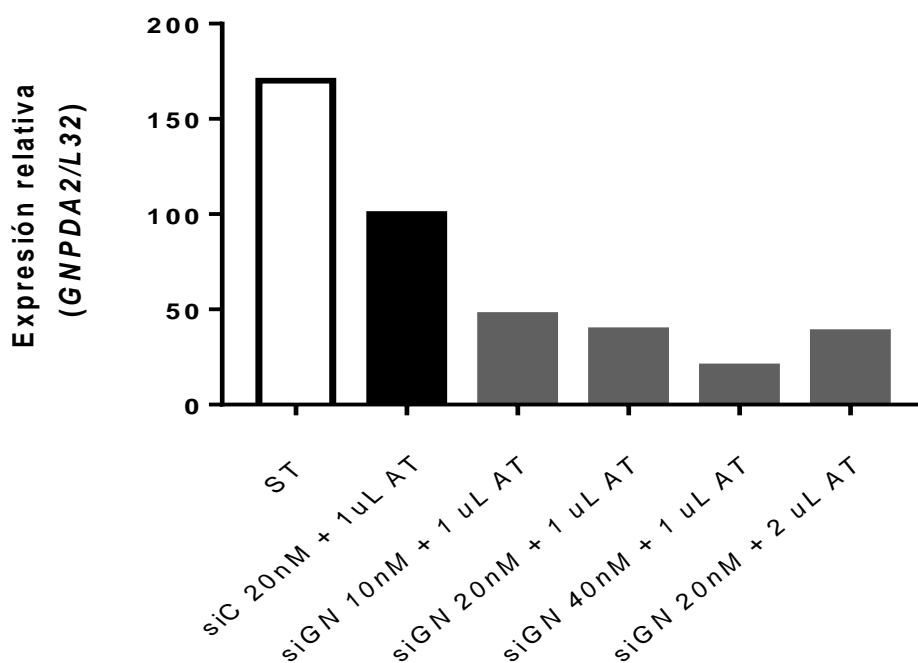


Figura 9. Optimización de la transfección con diferentes concentraciones de siRNA contra *GNPDA2* en la línea celular INS-1 (832/13). Expresión relativa del gen *GNPDA2* posterior a las 72h de la transfección, con concentraciones de 10, 20 y 40 nM de siRNA *GNPDA2*(siGN), comparado con 20 nM de siRNA control(siC) y células sin tratamiento(ST) como referencia de células intactas.

Para *GFAT1*, se observó de igual forma una disminución del transcrito en todas las condiciones donde se utilizó el agente de transfección, comparado contra las células sin tratamiento (Figura 10). Por lo tanto, se compararon las diferentes concentraciones del siGF contra las células transfectadas con el siC. El tratamiento con 10 nM de siRNA contra *GFAT1*, produjo una disminución del 20% del transcrito, seguido de un silenciamiento del 47% con 20 nM de siRNA y del 64% con una concentración 40 nM de siRNA *GFAT1*. Al agregar una mayor cantidad del agente de transfección, la expresión del GFAT disminuye en un 30%.

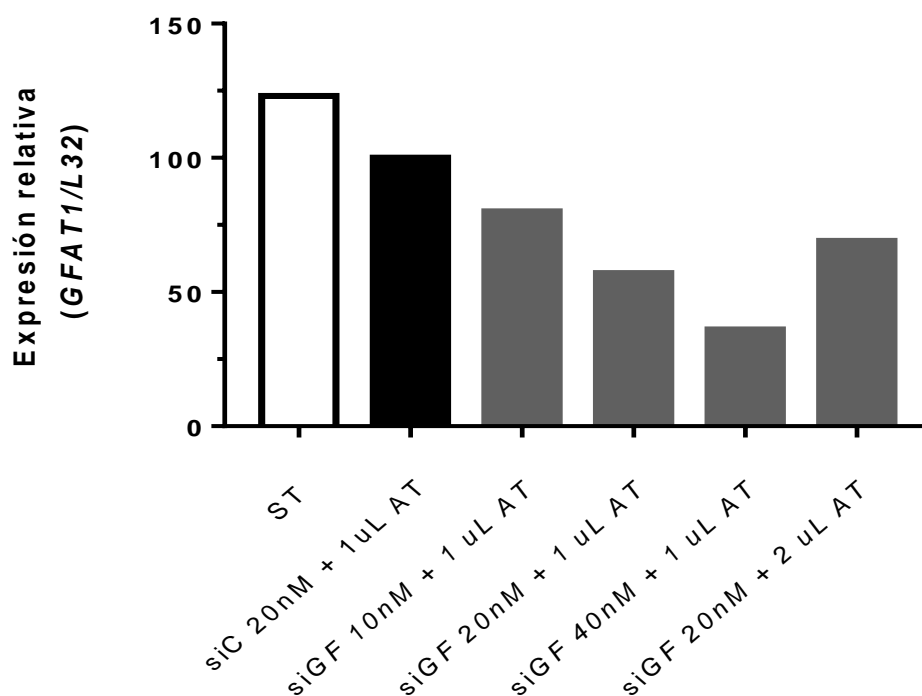


Figura 10. Optimización de la transfección con diferentes concentraciones de siRNA contra *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13). Expresión relativa del gen *GFAT1* posterior a las 72h de la transfección con concentraciones de: 10, 20 y 40 nM de siRNA *GFAT1*(siGF), comparado con 20 nM de siRNA control (siC) y células sin tratamiento (ST) como control negativo.

Por lo tanto, las condiciones óptimas de transfección para silenciar a los genes *GNPDA2* y *GFAT2* son: 40 nM de siRNAs con 1 μ L de agente de transfección.

Una vez optimizado la concentración adecuada de los siRNAs *GFAT1* y siRNAs *GNPDA2* para silenciar parcialmente a dichos genes, lo siguiente fue optimizar el tiempo en el que se logra una mayor disminución de la expresión de los genes. Se utilizaron las condiciones anteriores de 40 nM de siRNAs con 1 μ L de agente de transfección y se recolectaron las células a diferentes tiempos de transfección (24h, 48h y 72h). También, se utilizaron células sin tratamiento como referencia de células intactas y cada tratamiento con los siGN y siGF se analizó respecto al siC.

Se observó que *GNPDA2* redujo su expresión en un 19% a las 24 horas, a las 48 horas existe una disminución del 57% y a las 72 horas, el transcrito descendió un 62% (Figura 11-A). Para *GFAT1*, a las 24 horas de transfección, la disminución del transcrito fue del 23%, a las 48 horas del 55% y finalmente, a las 72 horas del 63% (Figura 11-B). Por lo tanto, para para ambos genes a las 72 horas post-transfección fue cuando se logró la mayor disminución del transcrito.

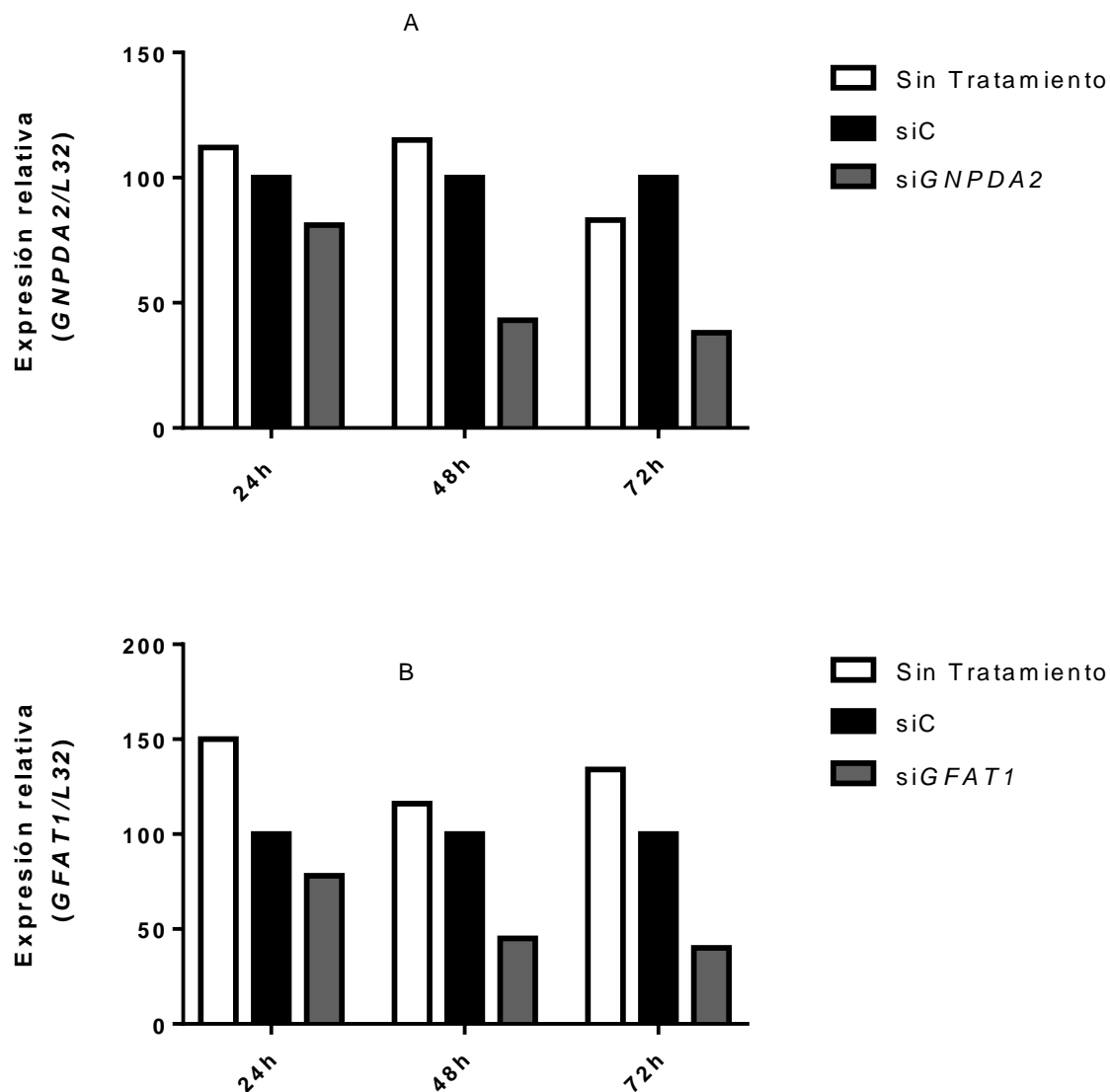


Figura 11. Optimización de la transfección de los siRNAs contra *GNPDA2* y *GFAT1* a diferentes tiempos en la línea celular INS-1 (832/13). (A) Gráficas de la expresión relativa del gen *GNPDA2* a las 24, 48 y 72 horas de la transfección con 40 nM de siRNA *GNPDA2* (siGNPDA2) y 1 µM de agente de transfección, comparado contra 40 nM de siRNA control (siC). (B) Gráficas de la expresión relativa del gen *GFAT1* a las 24, 48 y 72 horas de la transfección con 40 nM de siRNA *GFAT1* (siGFAT1) y 1 µM de agente de transfección, comparado contra 40 nM de siC siRNA control (siC). Se analizaron las células sin tratamiento (ST) como referencia de células intactas.

8.3. Expresión de *GNPDA2* y *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13) posterior al silenciamiento.

Una vez optimizadas las condiciones de transfección, se cuantificaron los transcritos de ambos genes en tres diferentes experimentos. Se observó que, a las 72 h posteriores a la transfección, *GNPDA2* disminuyó su expresión un 65% comparado con el siC (Figura 12-A). Mientras que, para *GFAT1* se logró disminuir la expresión hasta un 54 % (figura 12-B).

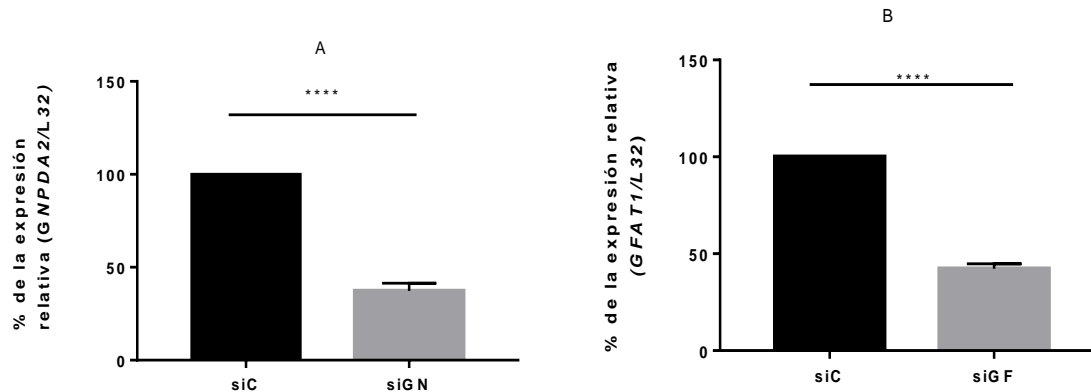


Figura 12. Porcentaje de la expresión relativa de *GNPDA2* y *GFAT1*, posterior a las 72h de transfección. (A) Porcentaje de la expresión relativa de siRNA *GNPDA2* (siGN), respecto al siRNA Control (siC). (B) Porcentaje de la expresión relativa de siRNA *GFAT1* (siGF), respecto al siRNA Control (siC). T-Student, **** $p < 0.0001$, $n = 3$.

Además, se estudió el cambio en el fenotipo o la confluencia de las células después del silenciamiento de estos genes a las 72 horas después de la transfección. Como se muestra en la Figura 13, no se notó ningún cambio entre las células controles (siC) y las silenciadas (siGN o siGF).

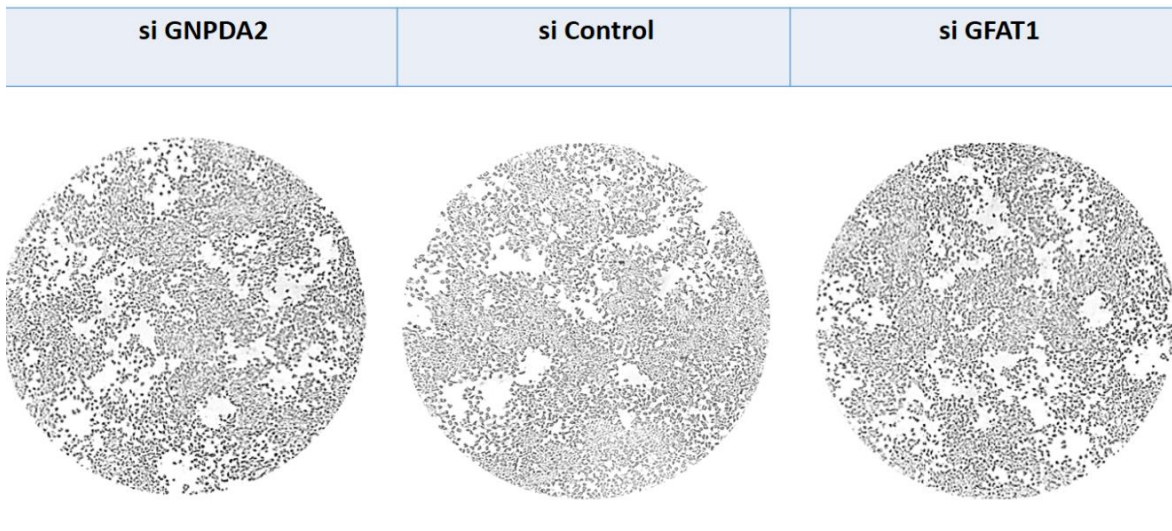


Figura 13. Microscopía de las células silenciadas de los genes *GNPDA2* o *GFAT1* en la línea celular INS-1 (832/13). Imágenes capturadas a través de microscopio óptico invertido, con objetivo 10X. Células transfectadas con el siRNA Control (siC), siRNA contra *GNPDA2* (siN) o contra *GFAT1* (siGF), después de 72 horas de transfección.

8.4. Expresión relativa de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa.

Otro de los objetivos de este proyecto es ver la expresión de los genes *GNPDA2* y *GFAT1*, en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa. Este experimento se hizo por medio del ensayo de GSIS, el cual consiste en estimular a las células con 0 mM, 3 mM o 15 mM de glucosa por una hora. Posteriormente, se recolecta el sobrenadante para medir la concentración de insulina secretada mediante ELISA (resultados mostrados en la sección 8.5) y, por otra parte, se midió el transcrito de las células.

Las células fueron transfectadas con los siGN, siGF o siC y al cabo de las 72 horas de la transfección, se estimularon con las diferentes concentraciones de glucosa.

En el caso de *GNPDA2*, se encontró que en las células controles (siC), la expresión basal del transcrito con 0 mM de glucosa fue del 100%. Al ser estimuladas con 3 mM de glucosa, la expresión no aumentó; sin embargo, hubo un aumento hasta del 100% veces más con una concentración de 15 mM de glucosa. Por otra parte, cuando *GNPDA2* es silenciado, se observó que su expresión residual es del 49% y al ser estimulada con diferentes concentraciones de glucosa su expresión es similar a las células tratadas con 0 mM de glucosa (Figura 14).

Al comparar las células control contra las células silenciadas de *GNPDA2*, se observó que, para la concentración basal de glucosa, el transcrito de *GNPDA2* disminuyó en un 51% su expresión respecto al siC ($p < 0.05$). En el tratamiento con 3 mM de glucosa, la disminución de la expresión no fue significativa. Sin embargo, para el tratamiento con 15 mM de glucosa, se obtuvo una disminución de hasta el 166% respecto al siC vs siGN (Figura 14, $***p < 0.001$).

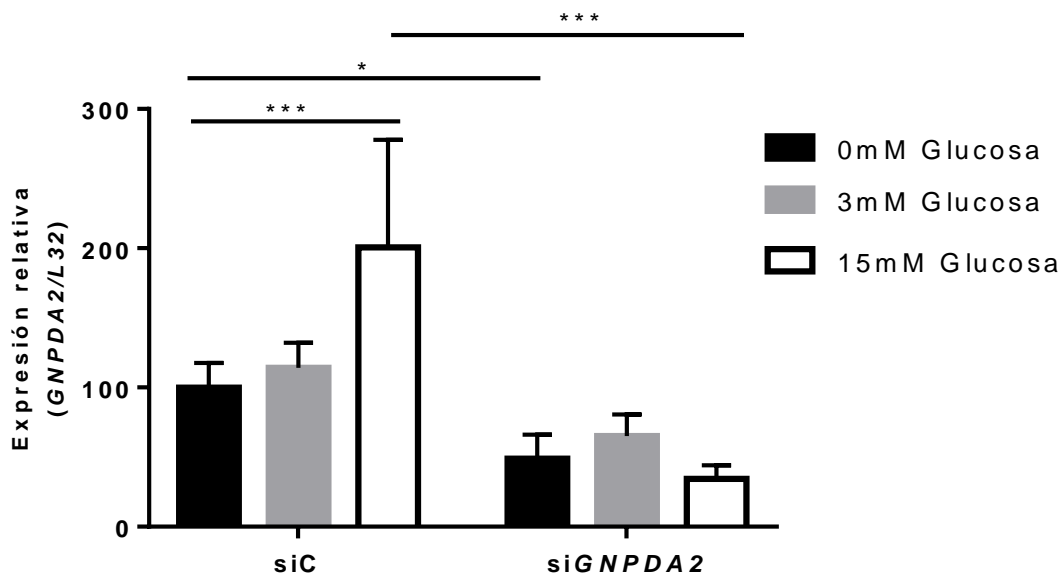


Figura 14. Expresión relativa de *GNPDA2* en células controles o silenciadas de dicho gen y estimuladas con glucosa. Células INS1 (832/13) transfectadas con siRNA control (siC) y siRNA *GNPDA2* (si*GNPDA2*), tratadas con 0 nM, 3 mM, y 15 mM de glucosa. ANOVA de dos vías, análisis Post-Hoc Tukey's. *p < 0.05, ***p < 0.001, n= 3.

Con respecto a *GFAT1*, se observó en las células controles (siC), la expresión basal del transcrito con 0mM de glucosa al 100%. Al estimular las células con 3mM de glucosa, la expresión no aumentó; pero, cuando se estimularon con una concentración de 15 mM de glucosa se produjo un aumento al 100% en el transcrito del gen. Por otra parte, cuando *GFAT1* es silenciado, se observó que su expresión disminuye hasta un 48% a 0mM de glucosa. Esta expresión aumentó a 76.8% a una concentración de 3 mM de glucosa, pero cuando se incrementa la concentración a 15 mM de glucosa, disminuye su expresión a 64.6%.

Al comparar las células control contra las células silenciadas de *GFAT1*, se observó que, para la concentración basal de glucosa, el transcrito de *GFAT1* disminuyó en un 48% su expresión respecto al siC ($p < 0.05$). En el tratamiento con 3 mM de glucosa, no se presentó ningún cambio en la expresión. Sin embargo, para el tratamiento con 15 mM de glucosa, se obtuvo una disminución del 105% respecto al siC vs siGF (Figura 15, $*p < 0.001$).

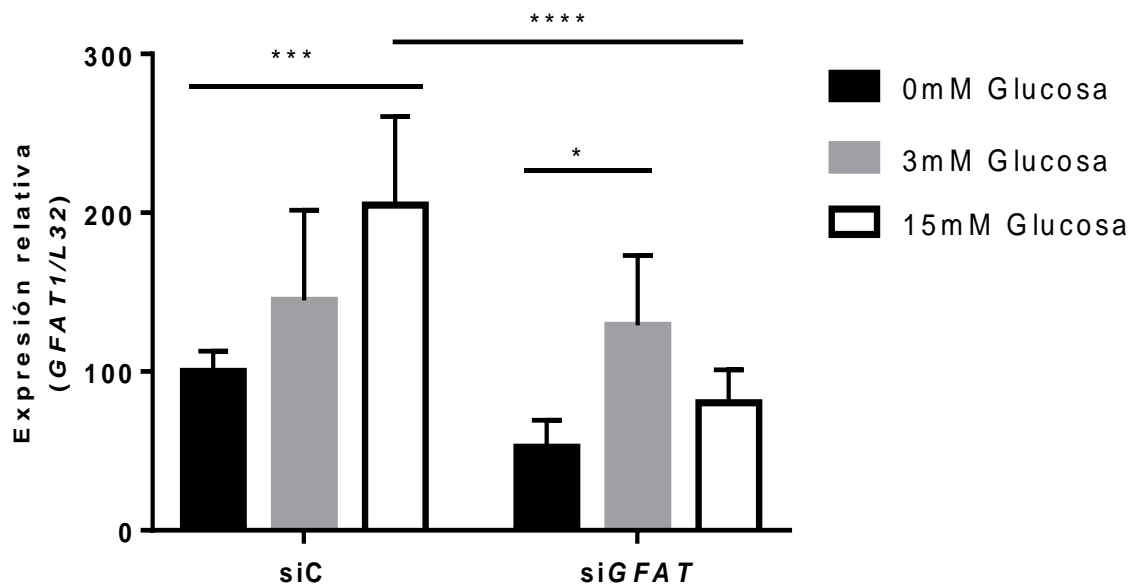


Figura 15. Expresión relativa de *GFAT1* en células controles o silenciadas de dicho gen y estimuladas con glucosa. Células INS1 (832/13) transfectadas con siRNA control (siC) y siRNA *GFAT1* (siGFAT), tratadas con 0 nM, 3 mM, y 15 mM de glucosa. ANOVA de dos vías, análisis Post-Hoc Tukey's. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, $n = 3$.

8.5. Medición de la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células INS1 (832/13) en presencia o ausencia parcial de *GNPDA2* o *GFAT1*

Como se mencionó anteriormente, después de 72 horas de silenciamiento de los genes *GNPDA2* o *GFAT1*, se realizó el experimento de GSIS, esto mediante la recolección del sobrenadante de cada tratamiento. Se midió la concentración de la insulina secretada de las células estimuladas con 3 o 15 mM de glucosa, mediante un ensayo de ELISA.

En la Figura 16, se muestra que las células controles responden al estímulo de 15 mM de glucosa, ya que secretan 2.1 veces más insulina, con respecto a las estimuladas con 3 mM de glucosa. Cuando se compara el siC contra el tratamiento de siGN, se observa una tendencia a disminuir la secreción de insulina con concentraciones de 3 mM y 15 mM de glucosa, pero esta disminución no resulta significativa (Figura 16-A). Para corroborar que al silenciar parcialmente a *GNPDA2*, este gen no influyera en la secreción de insulina, se analizaron los datos en porcentaje de insulina secretada respecto al tratamiento de 3 mM de glucosa. Se observó que tanto para las células controles como las células ausentes de *GNPDA2*, el incremento de la secreción entre 3 mM y 15 mM de glucosa fue de 2.2 veces para ambos (Figura 16 B).

Por lo tanto, al silenciar parcialmente a *GNPDA2*, la secreción de insulina no se ve afectada.

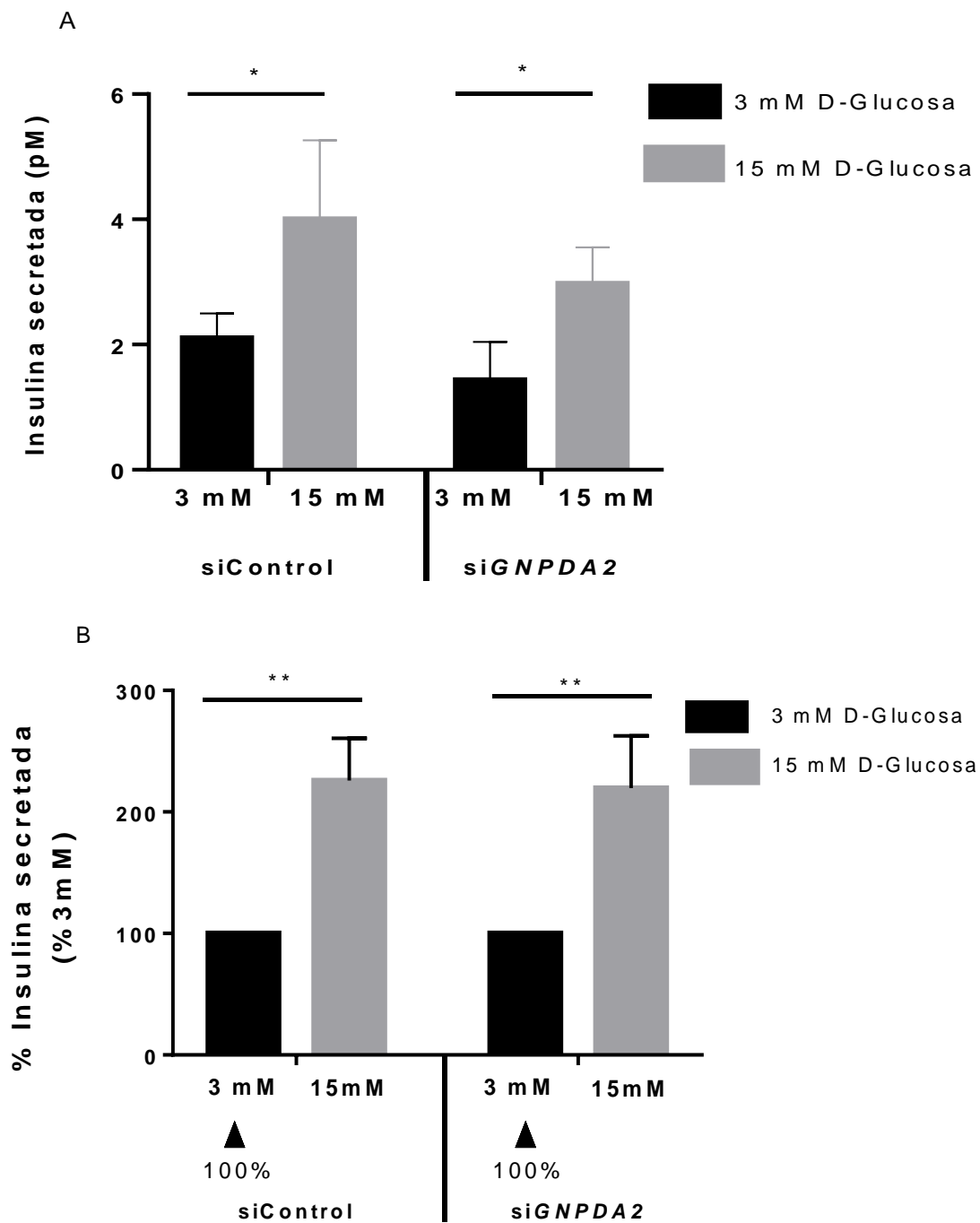


Figura 16. Participación de *GNPDA2* en la secreción de insulina estimulada por glucosa. (A) Cuantificación de insulina secretada en las células INS-1(832/13) posterior a la transfección con siGNPDA2 durante 72h. (B) Porcentaje de insulina secretada con respecto a 3 mM de glucosa. Las barras en negro representan estimulación con 3 mM de glucosa y en gris estimulación con 15 mM de glucosa. ANOVA de dos vías. Análisis Post-Hoc Tukey's. * $p < 0,05$, ** $p < 0.002$, $n = 3$.

En la Figura 17, se muestran los resultados de las células silenciadas parcialmente de *GFAT1* y sometidas a ensayos de GSIS. Las células controles (siC) responden al estímulo de 15 mM de glucosa, donde se secretó 2 veces más insulina con respecto a las estimuladas con 3 mM de glucosa. Sin embargo, en las células donde *GFAT1* está parcialmente silenciado, se observó un incremento de hasta 4.9 veces en la secreción de insulina, entre el tratamiento de 3 mM y 15 mM de glucosa. Por otra parte, cuando se comparan las células control con las células con *GFAT1* parcialmente silenciado, se observa una disminución de 0.64 veces en la secreción de insulina entre el siC y siGF estimulada con 3 mM de glucosa (Figura 17-A). Sin embargo, al comparar el porcentaje de insulina secretada respecto al tratamiento de 3 mM de glucosa para cada tratamiento, se observó que para células controles hubo un aumento de 2 veces en la secreción de insulina entre 3 y 15 mM de glucosa. Para las células en ausencia de *GFAT1*, se observó un aumento de 5.1 veces entre 3 y 15 mM de glucosa (Figura 17-B). Por lo tanto, las células con silenciamiento parcial de *GFAT1* secretan más insulina que las controles al ser estimuladas con 15 mM de glucosa.

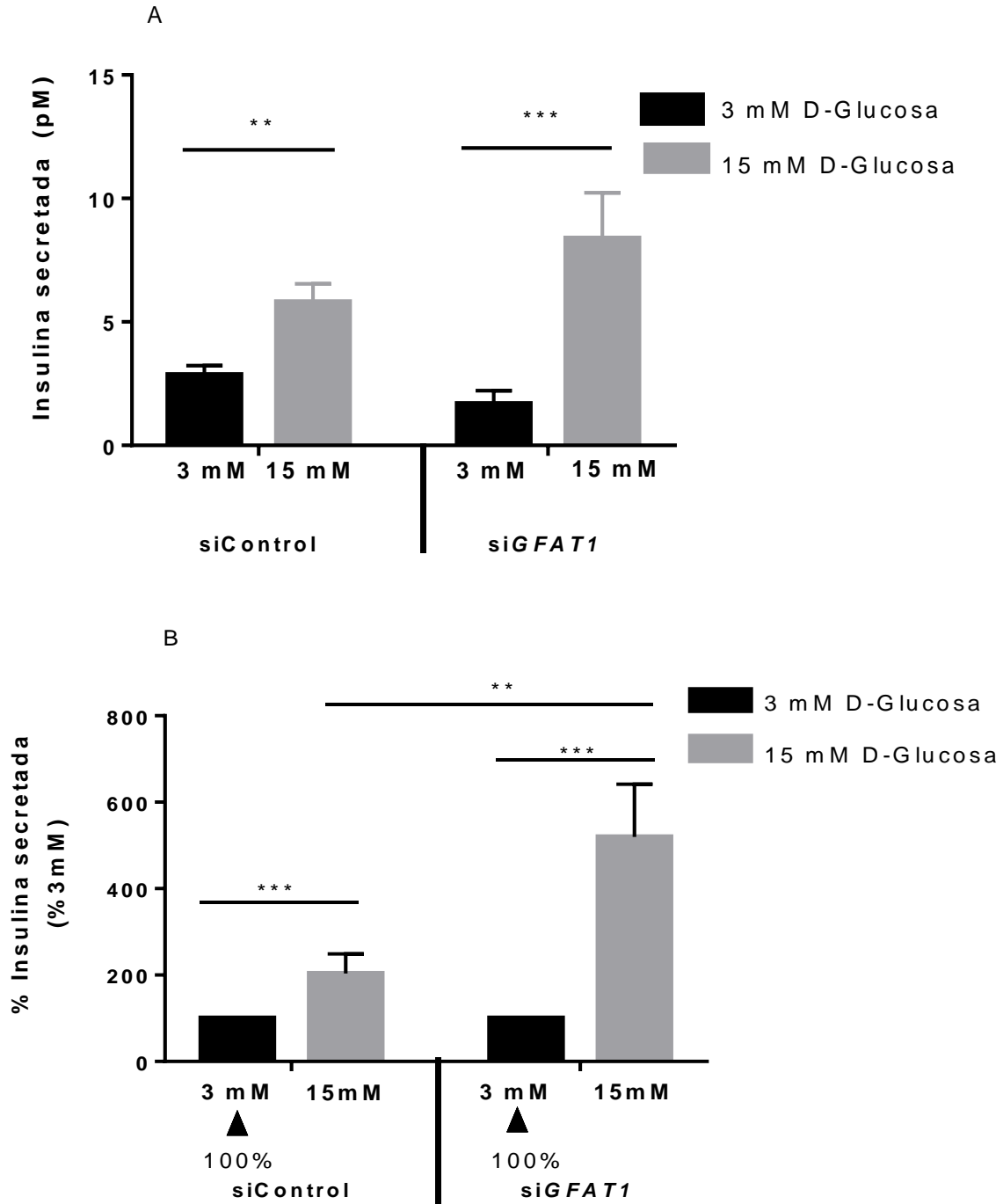


Figura 17. Participación de *GFAT1* en la secreción de insulina estimulada por glucosa. (A) Cuantificación de insulina secretada en las células INS-1(832/13) posterior a la transfección con si*GFAT1* durante 72h. (B) Porcentaje de insulina secretada con respecto a 3 mM de glucosa. Las barras en negro representan estimulación con 3mM de glucosa y en gris estimulación con 15 mM de glucosa. ANOVA de dos vías. Análisis Post-Hoc Tukey's. * $p < 0,05$, ** $p < 0.002$, $n = 3$.

9. Discusión

La vía de las hexosaminas es considerada como una vía importante en la detección de nutrientes⁵³. Los productos de los genes *GNPDA2* y *GFAT1* tienen participación en esta vía.

Anteriormente, se reportó que la sobreexpresión de *GFAT1* está relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina ⁵⁴. Además, al inhibir farmacológicamente a *GFAT1*, se observó un incremento en la secreción de insulina de islotes de rata²⁷. Sin embargo, la función de *GNPDA2*, enzima inversa de *GFAT1*, es desconocida en la homeostasis de la glucosa y específicamente en la secreción de la insulina.

Es por esto, que se quiso estudiar si *GNPDA2* y *GFAT1* se encuentran presentes en las células INS1 (832/13), para ser utilizado como modelo de estudio para la secreción de insulina.

Se encontró que ambos genes son expresados en las células INS1 (832/13) (Figuras 7 y 8). Esto era de esperarse, ya que anteriormente estaba reportado que *GFAT1* se expresa en islotes de Langherhans aislados de ratas²⁷ se sabe que la línea celular INS1 (832/13) fue aislada de islotes de Langherhans de rata⁴⁶.

Después de validar que estos genes se expresan en el modelo propuesto de estudio, se utilizaron los siRNAs como herramienta molecular para silenciar la expresión de los genes *GNPDA2* y *GFAT1*. Se observó que en las células INS1 (832/13), se logró silenciar parcialmente a *GNPDA2* (65%, Figura 12-A) y a *GFAT1* (54%, Figura 12-B) después de 72 horas de transfección. Con estas condiciones, lo siguiente era ver la expresión de estos genes a diferentes concentraciones de

glucosa y el efecto de estos genes en la secreción de insulina. A pesar de que el silenciamiento de *GNPDA2* y *GFAT1* no fue total, hay estudios que demuestran que un silenciamiento parcial de genes (mayor al 50% de silenciamiento), puede tener un efecto significativo en la secreción de insulina⁵⁵.

9.1. Expresión de *GNPDA2* y de *GFAT1* en condiciones de hiperglucemia y después de ser silenciado en las células INS-1(832/13)

La vía de las hexosaminas depende directamente de la cantidad de glucosa que se transforma en F6P para entrar a esta vía. *GFAT1*, es la enzima limitante de la vía, además, en condiciones de hiperglucemia ocurre una sobreexpresión de este gen⁵⁶. Es por esto, que uno de los objetivos era estudiar la expresión de *GFAT1* y su enzima opuesta *GNPDA2*, en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa.

Los resultados obtenidos mostraron que en células control, se presentaba un incremento en la expresión de *GFAT1*, conforme aumenta la concentración de glucosa, después de 1 hora de estimulación (Figura 15). Únicamente un 5% de la glucosa ingresada se va a la vía de las hexosaminas, donde *GFAT1* es la primera enzima que regula el paso hacia esta vía²⁵; por lo que, al detectar niveles elevados de glucosa debe de aumentar su expresión. Por el contrario, con *GNPDA2*, existe un incremento del transcrito solamente con la concentración de 15 mM de glucosa y no con 3 mM (Figura 14). Esto sugiere que *GNPDA2* no es el sensor más sensible e importante de esta vía, ya que no se modifica con una concentración baja de glucosa, a diferencia de *GFAT1*.

Al silenciar parcialmente a *GNPDA2*, la expresión no se modificó al aumentar la concentración de glucosa (Figura 14). Esto puede ser porque su transcripción no se activa y no alcanza a responder a la concentración alta de glucosa. También, se evaluó la expresión de *GFAT1* silenciado parcialmente en un 54%, y estimulado con glucosa. Se observó un incremento al ser estimulado con 3 mM de glucosa, y una tendencia a aumentar con 15 mM. Esto se podría explicar, debido a que, en un estado de hiperglucemia, es la enzima GFAT1 la que se activa, lo que provoca que el exceso de glucosa entre a la vía de las hexosaminas, a diferencia de *GNPDA2*. Cuando se presenta una exposición crónica a estados de hiperglucemia, ocasiona la sobreexpresión de *GFAT1*⁵³, provocando que se acumulen proteínas glicosiladas como IRS1 y AKT2, lo que conlleva a la desregulación de la señalización de la insulina, derivando en el desarrollo de la resistencia a la insulina²⁶. A pesar de que la contribución de la HBP pareciera ser muy poca, su alteración resulta en uno de tantos factores que repercuten en el desarrollo de DMT2. En estos experimentos, la exposición a la glucosa sólo ocurrió durante 1 hora de manera aguda. Sin embargo, fue posible observar la modificación de la expresión de *GFAT1* en presencia de glucosa.

Anteriormente, se encontró que en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, la expresión de *GNPDA2* disminuía en el hipotálamo¹². Sin embargo, la expresión de *GFAT* no se modificó¹³. Esto sugiere que en ratas que presentan obesidad inducida por dieta, la disminución de la expresión de *GNPDA2* provocaría que la vía de HBP se encuentre más activa, a pesar de que *GFAT* no modificó su expresión.

Entonces GFAT1 permitiría la entrada del exceso de F6P a la vía de las HBP, lo que conlleva a la resistencia de la insulina, característica estos modelos⁵⁷.

9.2. Implicación de *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina

Como se vio anteriormente, aunque *GNPDA2* y *GFAT1* participan en el mismo punto de regulación en la HBP, es principalmente *GFAT1*, la responsable en regular el flujo de nutrientes por esta vía. Además, al inhibir farmacológicamente a *GFAT1 in vitro*, se observó que está implicado en el aumento de la secreción de insulina de islotes de rata²⁷.

Por otra parte, al inhibir farmacológicamente a *GFAT1* en el hipotálamo, no tuvo repercusiones en la homeostasis a la glucosa. Sin embargo, la inhibición farmacológica de *GNPDA2* en el hipotálamo, provoca intolerancia a la glucosa¹³. Por lo que, el siguiente objetivo era, ver si *GNPDA2* está implicado en la secreción de insulina y corroborar el rol de *GFAT1* en la secreción de la insulina en un modelo *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que hubo un aumento en la secreción de insulina en las células controles, al ser sometidas a una alta concentración de glucosa. Este resultado era lo que se esperaba, como respuesta normal a la detección de glucosa por parte de las células.

Sin embargo, en la ausencia parcial de *GNPDA2*, se observó que no hay un cambio significativo en la secreción, por lo que *GNPDA2* no tiene implicación en la secreción de insulina.

Lo anterior se podría explicar, debido a que al estar silenciado parcialmente el gen *GNPDA2*, el flujo hacia la vía de las hexosaminas continúa normalmente, con el ingreso de la F6P por la acción de *GFAT1*. Esto no se reflejaría en una mayor producción de ATP, señal necesaria para la secreción de insulina, razón por la cual no se observa diferencia de la secreción de insulina.

Esta reportado que *GNPDA2* está asociado con la obesidad y con la DMT2^{9,29}, pero no afecta la secreción de insulina. Esto sugiere a que este gen podría tener una contribución en el desarrollo de resistencia a la insulina, ya que al estar suprimido y no permitir el retorno de nutrientes hacia la vía glucolítica, se acumularían las proteínas glucosiladas involucradas en la respuesta a la glucosa⁵⁸. Esta glucosilación podría conducir a la alteración de proteínas de la vía de señalización de la insulina, lo que resulta así en la resistencia a la insulina²⁶.

Por otra parte, al silenciar parcialmente a *GFAT1* se presentó un incremento en la secreción de insulina de 5.1 veces mayor que en el siC en el tratamiento con 15 mM de glucosa. (Figura 17-B). Entonces, al silenciar a *GFAT1*, el paso de entrada hacia HBP no se permitiría, lo que obliga a F6P a continuar en la vía de la glucólisis, dando como resultado una mayor formación de ATP y por consecuencia, la apertura de los canales de calcio, para desencadenar una mayor secreción de insulina⁵⁹.

Se sabe que la inhibición farmacológica de *GFAT1*, mediante el uso de inhibidores O-diazoacetil-L-serina (azaserina) en islotes pancreático aislados de ratas, ocasionó un aumento en la secreción de insulina²⁷. Por lo que se puede concluir que la inhibición de *GFAT1* con fármacos como genéticamente (siRNA), conducen

a una mayor secreción de insulina. Por lo tanto, GFAT1 está involucrado en la secreción de insulina.

Los resultados mostrados en este proyecto dan un panorama sobre la importancia de GNPDA2 y GFAT1 en la secreción de insulina. Sin embargo, aún queda mucho por explorar sobre su participación y su efecto en muchos otros mecanismos, incluyendo su implicación en el desarrollo de la RI.

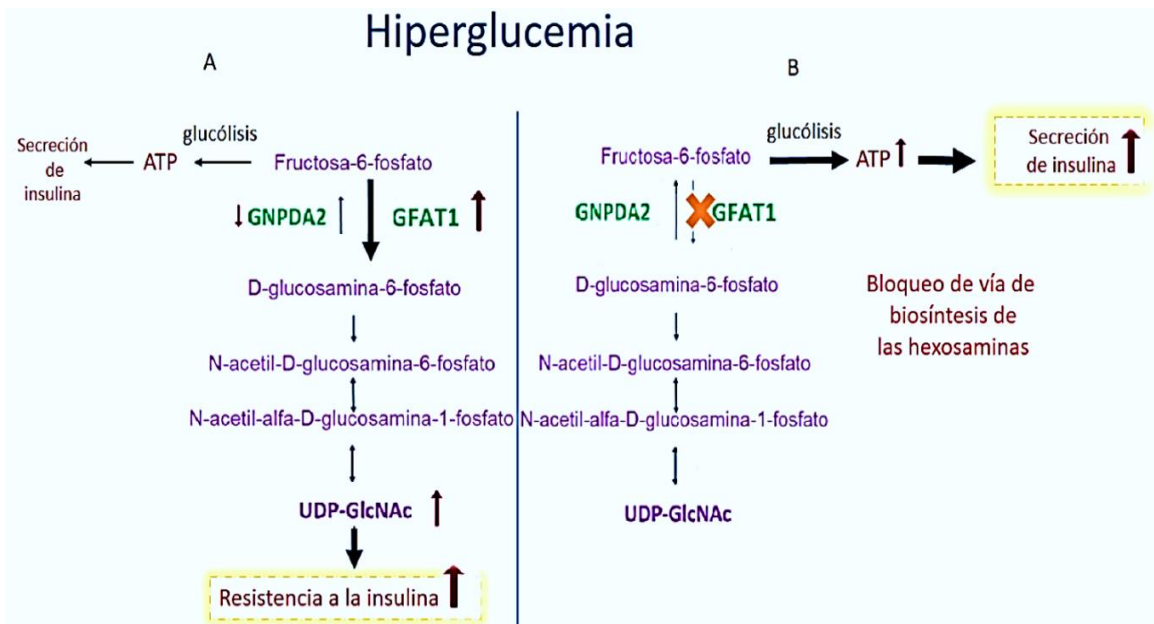


Figura 18. Posible mecanismo de la implicación de *GNPDA2* y *GFAT1* en la secreción de insulina en condiciones de hiperglucemia. (A) En condiciones de hiperglucemia, se muestra un incremento en la expresión de *GFAT1*, lo que provoca un aumento en la glucosilación de proteínas y desencadenando la resistencia a la insulina. (B) Al silenciar parcialmente a *GFAT1*, la vía de biosíntesis de las hexosaminas quedó bloqueada, entonces se presenta un aumento en el flujo de F6P hacia la glucólisis e incrementa así la secreción de insulina. Por lo tanto, *GFAT1* influye en la secreción de insulina; sin embargo *GNPDA2* no está implicado en este proceso.

10. Conclusiones

GNPDA2 y *GFAT1* se expresan en las células INS-1(832/13). Además, se observó que *GNPDA2* incrementa su expresión al ser expuestas las células a una concentración de glucosa alta. Sin embargo, *GFAT1* es más sensible a concentraciones más bajas de glucosa, aumentando su expresión proporcionalmente al aumento la concentración de glucosa.

El silenciamiento de *GNPDA2* demostró que no influye en la secreción de insulina. Por el contrario, *GFAT1*, enzima limitante de la vía de las hexosaminas, demostró que, al ser silenciada, aumenta la secreción insulina, lo que sugiere que esta enzima sirve como sensor de glucosa.

11. Perspectivas

- En este proyecto se comprobó que *GNPDA2* no está implicado en la secreción de insulina, pero el silenciamiento de *GFAT1* provoca un aumento de la secreción a 15 Mm de glucosa. Sin embargo, quedaría por investigar si *GNPDA2* juega entonces un rol en el desarrollo de la resistencia a la insulina, al igual que *GFAT1*.
- Realizar ensayos de glucosilación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina en presencia y ausencia de *GNPDA2* y *GFAT1*.
- Con el fin de conocer mejor la función de *GNPDA2* y *GFAT1* y su implicación en el metabolismo, se buscará estudiar a estos genes en otros modelos celulares como: hígado, hipotálamo y células adiposas.

12. Referencias

1. García Milian AJ, Creus García ED. La obesidad como factor de riesgo, sus determinantes y tratamiento. *Rev Cuba Med Gen Integr.* 2017;32(3):1–13.
2. OMS 2017. OMS [Internet]. 2017. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A896?lang=en>
3. ENSANUT 2016. Secretaria de Salud. Instituto Nacional de Salud Pública. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino ENSANUT. Informe de Resultados. [En línea] (Actualizado al 31 de octubre de 2016). 2016;2016.
4. Brown WV, Fujioka K, Wilson PWF, Woodworth KA. Obesity: Why be concerned? Vol. 122, *American Journal of Medicine.* 2009.
5. Speakman JR, Loos RJF, O’Rahilly S, Hirschhorn JN, Allison DB. GWAS for BMI: a treasure trove of fundamental insights into the genetic basis of obesity. *Int J Obes [Internet].* 2018;42(8):1524–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-018-0147-5>
6. Riancho JA. Enfermedades complejas y análisis genéticos por el método GWAS. Ventajas y limitaciones. *Reumatol Clin [Internet].* 2012;8(2):56–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2011.07.005>
7. Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet [Internet].* 2018 Oct 15;27(20):3641–9. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/27/20/3641/5067845>
8. Kong X, Zhang X, Zhao Q, He J, Chen L, Zhao Z, et al. Obesity-Related Genomic Loci Are Associated with Type 2 Diabetes in a Han Chinese Population. Palmer ND, editor. *PLoS One [Internet].* 2014 Aug 5;9(8):e104486. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104486>

9. Willer CJ, Willer CJ, Speliotes EK, Speliotes EK, Loos RJF, Loos RJF, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* [Internet]. 2009;41(1):25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695662>
10. Casanello P, Krause BJ, Castro-Rodríguez JA, Uauy R. Epigenética y obesidad. *Rev Chil Pediatr* [Internet]. 2016;87(5):335–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rchipe.2016.08.009>
11. Myers MG, Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature* [Internet]. 2012 Nov 14;491(7424):357–63. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11705>
12. Gutierrez Aguilar R, Kim DH, Woods SC, Seeley RJ. Expression of new loci associated with obesity in diet-induced obese rats: From genetics to physiology. *Obesity* [Internet]. 2012;20(2):306–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.236/nature06264>
13. Ruth Gutierrez-Aguilar, Bernadette E. Grayson, Dong-Hoon Kim SY, Mario L. Calcagno, Stephen C. Woods RJS. Weight, A role for CNS GNPDA2 regulation on glucose homeostasis and body. Por ser sometido a Diabetes, Metab Syndr Obes.
14. McClain DA. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications*. 2002;16(1):72–80.
15. Cox M. M. y Nelson D. L. Lehninger. Principios de Bioquímica [Internet]. Omega, editor. 2006. Omega. España. España; 2006. 1264 p. Available from: https://books.google.com.mx/books?id=7chAN0UY0LYC&dq=lehninger&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjg6Yx_fIAhUSQK0KHcNFBXwQ6AEINTAB
16. Bouché C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2004;25(5):807–30.
17. Arreola R, Valderrama B, Morante ML, Horjales E. Two mammalian

glucosamine-6-phosphate deaminases: A structural and genetic study. *FEBS Lett.* 2003;551(1–3):63–70.

18. Penque BA, Hoggatt AM, Paul Herring B, Elmendorf JS. Hexosamine biosynthesis impairs insulin action via a cholesterolgenic response. *Mol Endocrinol.* 2013;27(3):536–47.
19. Oikari S, Makkonen K, Deen AJ, Tyni I, Kärnä R, Tammi RH, et al. Hexosamine biosynthesis in keratinocytes: Roles of GFAT and GNPDA enzymes in the maintenance of UDP-GlcNAc content and hyaluronan synthesis. *Glycobiology.* 2016;26(7):710–22.
20. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813–20.
21. Breyer BN, Sarma A V. Hyperglycemia and Insulin Resistance and the Risk of BPH/LUTS: an Update of Recent Literature. *Curr Urol Rep.* 2014;15(12):1–6.
22. Hazel M, Cooksey RC, Jones D, Parker G, Neidigh JL, Witherbee B, et al. Activation of the Hexosamine Signaling Pathway in Adipose Tissue Results in Decreased Serum Adiponectin and Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Endocrinology [Internet].* 2004 May;145(5):2118–28. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2003-0812>
23. Cooksey RC, Hebert LF, Zhu J-H, Wofford P, Garvey WT, McClain DA. Mechanism of Hexosamine-Induced Insulin Resistance in Transgenic Mice Overexpressing Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase: Decreased Glucose Transporter GLUT4 Translocation and Reversal by Treatment with Thiazolidinedione*. *Endocrinology [Internet].* 1999 Mar 1;140(3):1151–7. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/140/3/1151/2990354>
24. Cooksey RC, McClain DA. Transgenic Mice Overexpressing the Rate-Limiting Enzyme for Hexosamine Synthesis in Skeletal Muscle or Adipose Tissue Exhibit Total Body Insulin Resistance. *Ann N Y Acad Sci [Internet].*

2006 Jan 24;967(1):102–11. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04268.x>

25. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system: role of hexosamine in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*. 1991;266(8):4706–12.
26. Park SY, Ryu J, Lee W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med*. 2005;37(3):220–9.
27. Yanagida K, Maejima Y, Santoso P, Otgon-Uul Z, Yang Y, Sakuma K, et al. Hexosamine pathway but not interstitial changes mediates glucotoxicity in pancreatic β -cells as assessed by cytosolic Ca^{2+} response to glucose. *Aging (Albany NY)*. 2014;6(3):207–14.
28. Álvarez-Añorve LI, Alonzo DA, Mora-Lugo R, Lara-González S, Bustos-Jaimes I, Plumbridge J, et al. Allosteric kinetics of the isoform 1 of human glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* [Internet]. 2011;1814(12):1846–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.010>
29. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* [Internet]. 2010 Nov 10;42(11):937–48. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.686>
30. Wu L, Ma F, Zhao X, Zhang M-X, Wu J, Mi J. GNPDA2 Gene Affects Adipogenesis and Alters the Transcriptome Profile of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells . *Int J Endocrinol*. 2019;2019:1–10.
31. Schröder D, Zühlke H. Gene technology, characterization of insulin gene and the relationship to diabetes research. *Endokrinologie* [Internet]. 1982 Jun;79(2):197–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6751806>

32. Olivares Jesús PA. Bases moleculares de la acción de la insulina. *Rev Educ Bioquim.* 2008;27(1):9–18.
33. Dennis L. Kasper, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson JL. *Harrison Principios Medicina Interna.* 19 ed. Hill MG, editor. México; 2015. 2399 p.
34. Rorsman P, Renstrom E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* [Internet]. 2003 Aug 1;46(8):1029–45. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-003-1153-1>
35. Marek Gembal, Patrick Gilon and J-CH. Evidence That Glucose Can Control. *J Clin Invest.* 1992;89(April):1288–95.
36. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000;404(6778):661–71.
37. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2000;49(3):424–30.
38. Fargion S, Dongiovanni P, Guzzo A, Colombo S, Valenti L, Fracanzani AL. Iron and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther Suppl.* 2005;22(2):61–3.
39. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* [Internet]. 2012 Mar;148(5):852–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412002176>
40. Draznin B. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 : The Two Sides of a Coin. *Diabetes* [Internet]. 2006 Aug 1;55(8):2392–7. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db06-0391>
41. M G Myers Jr 1, J M Backer, X J Sun, S Shoelson, P Hu, J Schlessinger, M

- Yoakim, B Schaffhausen MFW. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology domains of p85. PNAS. 1992;21:10350–10354.
42. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . Curr Biol [Internet]. 1997 Apr;7(4):261–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206001229>
 43. Cozzone D, Fröjdö S, Disse E, Debard C, Laville M, Pirola L, et al. Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. Diabetologia [Internet]. 2008 Mar 18;51(3):512–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-007-0913-8>
 44. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. Sci STKE. 2005;2005(268).
 45. Andreozzi F, Procopio C, Greco A, Mannino GC, Miele C, Raciti GA, et al. Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. Diabetologia. 2011;54(7):1879–87.
 46. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. Endocrinology [Internet]. 1992 Jan 1;130(1):167–78. Available from: <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1370150>
 47. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. Int J Biomed Sci. 2017;13(2):48–57.
 48. Özbalci C, Storck EM, Eggert US. RNAi Transfection Results in Lipidome Changes. Proteomics. 2019 Jun;1800298.

49. Correa de Adjounian, Maria Fernanda, Adjounian, Haroution, & Adjounian SH. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Arch Venez Farmacol y Ter.* 2008;27(1):22–5.
50. Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem.* 2004;50(3):509–15.
51. Garibyan L, Avashia N. Research techniques: Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):e6-4.
52. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res.* 2014;3(1):85.
53. Marshall S. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE.* 2006;2006(346).
54. Cooksey RC, McClain DA. Increased hexosamine pathway flux and high fat feeding are not additive in inducing insulin resistance : evidence for a shared pathway. *Amino Acids.* 2010;40:841–6.
55. Gutierrez-Aguilar R, Kim DH, Casimir M, Dai XQ, Pfluger PT, Park J, et al. The role of the transcription factor ETV5 in insulin exocytosis. *Diabetologia.* 2014;57(2):383–91.
56. Hebert LF, Daniels MC, Zhou J, Crook ED, Turner RL, Simmons ST, et al. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest [Internet].* 1996 Aug 15;98(4):930–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770864>
57. Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, et al.

Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav* [Internet]. 2011 Apr;103(1):10–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938411000254>

58. Teo CF, Wollaston-Hayden EE, Wells L. Hexosamine flux, the O-GlcNAc modification, and the development of insulin resistance in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2010;318(1–2):44–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.022>
59. Rorsman P, Braun M. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2013 Feb 10;75(1):155–79. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>