



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
(UMIEZ)

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Oncología Celular

**Determinación de la expresión de GLUT4 en membrana
de células tumorales inducido por liposomas catiónicos que
contienen PI (4,5) P2**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

CASTILLO SÁNCHEZ VICTOR GABRIEL

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. EDGAR IVAN TORRES CORIORILES



CDMX, 2021

PAPIIT-IN22272



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en el Laboratorio de Oncología Celular Lab-4 P.B., de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bajo la dirección del M. en C Edgar Ivan Torres Corioriles y la asesoría de la M en C. Rosalva Rangel Corona, M en C. Leonardo Trujillo Cirilo, Dra. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez y la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa PAPIIT-IN222721 de la DGAPA, UNAM.

“La naturaleza es siempre más sutil, más compleja y más elegante que lo que somos capaces de imaginar”

-Carl Sagan

Agradecimientos

A mi director de tesis el M. en C. Edgar Ivan Torres Corioriles por el apoyo y ayuda para la elaboración del presente trabajo.

A los miembros del comité tutor:

A la M. en C. Rosalva Rangel Corona por sus aportaciones, ideas y sugerencias para el proyecto.

Al M. en C. Leonardo Trujillo Cirilo por sus consejos para mejorar mi trabajo experimental y escrito.

A los miembros del jurado: Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez y a la M. en C. Ana Rocío Rivera Martínez por su apoyo para mejorar el trabajo.

A la Dra. Teresa Corona Ortega por su aportación al trabajo experimental.

A mis compañeros del Laboratorio de Oncología celular Adriana, Rayadan, Gloria e Ingrid por el apoyo brindado.

A mis amigos que me han soportado a lo largo de mi vida los cuales, aunque no les escriba todo lo que significan para mi saben que son una parte fundamental Jaret, Mizti, Harumy, Alonso, Carolina, Aline, Cecilia, Andrea, Lu, Kevin y Natalia con los que comparto momentos muy gratos de mi vida.

Dedicatorias

A mi madre Guillermina Sánchez Arias por todo lo que ha trabajado en su vida para poder brindarme todo lo que he necesitado incluyendo mi educación, por sus consejos y quizás por aquellos regaños que hicieron que sea lo que soy hoy, te amo.

A mis abuelos María y Came, a mis tíos Raúl, Rosalba, Ernesto, Leticia, Claudia y a mi primo Oswaldo gracias por formar parte de esta familia que me ha enriquecido como persona y me ha llenado de cariño, los amo.

Índice	
Resumen	7
Introducción	8
Marco Teórico	10
Diabetes	10
Membrana celular	11
Superfamilia de receptores SLC	13
Receptores GLUT	13
GLUT4	16
Vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)	18
Fosfatidilinositol.....	19
Fosfatidilinositol (4,5) P2.....	20
Liposomas.....	21
Transportadores GLUT y cáncer.....	22
Planteamiento del problema	24
Hipótesis.....	25
Objetivo general	26
Objetivos particulares.....	26
Método	27
Resultados	29
Evaluación de GLUT4 en células tumorales por citometría de flujo.....	29
Determinación de la expresión de GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular PC-3 con liposomas de síntesis A.	30
Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular INBL con liposomas de síntesis A.	31
Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular PC-3 con liposomas de síntesis B.	32
Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular INBL con liposomas de síntesis B.	33
Análisis de resultados.....	37
Conclusiones.....	40
Perspectivas.....	41
Bibliografía	42

Resumen

La diabetes es un trastorno heterogéneo con múltiples etiologías, en el año 2019, se estimó que 463 millones de personas padecían diabetes. Pudiendo aumentar a 578 millones para el año 2030, y a 700 millones para 2045 (FID, 2019). Se sabe que la diabetes tipo 2 es mucho más común y se caracteriza por la resistencia a la insulina y a la desregulación en la expresión de GLUT4.

El PI (4,5) P2 juega un papel muy importante en la vía de señalización de la traslocación de GLUT4 ya que participa en la vía de la PI3K que es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Reyes et al., 2008).

En el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza se ha fabricado un liposoma catiónico que contiene PI (4,5) P2 que en anteriores investigaciones se demostró que al estimular células tumorales y linfocitos con liposomas se promueve el movimiento y traslocación de diferentes receptores como CD16 y el receptor opioide δ (DOR).

Por tal motivo, en este trabajo se cultivaron células tumorales de la línea celular PC-3 e INBL estimuladas con liposomas catiónicos para evaluar la expresión del receptor GLUT4 mediante citometría de flujo.

Los resultados muestran que al estimular las células tumorales con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 promueven la traslocación del receptor GLUT4, confirmando así la importancia de PI (4,5) P2 en la vía de señalización de la traslocación de GLUT4.

Introducción

La diabetes es un serio problema de salud que ha alcanzado niveles alarmantes: hoy día, casi 500 millones de personas en distintas partes del mundo viven con diabetes (FID, 2019). Se considera una de las principales enfermedades que causa muerte prematura en la mayoría de los países e impone una sustancial carga para la sociedad. El aumento previsto en la prevalencia entre la población es por tanto una verdadera preocupación sanitaria y económica (Smyth et al., 2006). Por lo que se busca la manera de generar alternativas terapéuticas para los pacientes en los que se desarrolla la enfermedad.

La diabetes mellitus 2 se caracteriza por un mal funcionamiento de la insulina lo que trae consigo una deficiencia en la concentración del transportador de glucosa 4 (GLUT4) un receptor importante en la captación de la glucosa, esto provoca que se aumenten los niveles de glucosa en sangre (Björnholm et al., 2005).

En la vía de señalización para la traslocación de GLUT4 a la membrana celular participan varias moléculas con gran importancia, algunas de ellas son lípidos presentes en la membrana celular que confieren diversas propiedades, tal es el caso del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI (4,5) P2) el cual participa en múltiples actividades de la célula, de estas destaca el movimiento de vesículas del medio intracelular a la membrana celular y forma parte de la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) que es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos ya que recluta a GLUT4 (Reyes et al., 2008).

En el laboratorio de oncología celular de la FES Zaragoza se ha construido un liposoma catiónico que por su carga tiene la capacidad de unirse selectivamente a líneas celulares epiteliales. Los liposomas son nanotransportadores constituidos por bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos separadas por un compartimiento acuoso.

En investigaciones anteriores realizados en dicho laboratorio con liposomas que contienen PI (4,5) P2, se evaluó su capacidad para inducir la proliferación celular en

la línea celular de cáncer de cuello uterino INBL y la expresión de CD16 en las membranas de estas células y en los leucocitos sanguíneos. Los resultados mostraron un aumento significativo de la proliferación de células INBL y también indujo la expresión de membrana de CD16 en estas células, así como en leucocitos sanguíneos (Corona-Ortega et al., 2019).

Por tal motivo, se decidió determinar la capacidad de los liposomas catiónicos y liposomas con PI (4,5) P2 para promover la expresión del receptor GLUT4 en la membrana de las células tumorales PC-3 e INBL.

Marco Teórico

Diabetes

La diabetes es un trastorno heterogéneo con múltiples etiologías, en el año 2019, se estimó que 463 millones de personas padecían diabetes. Esta cifra puede que aumente a 578 millones para el año 2030, y a 700 millones para 2045 tal y como se muestra en la figura 1 (FID, 2019). La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas ya no es capaz de generar insulina, o cuando el cuerpo no puede utilizar adecuadamente esta hormona.

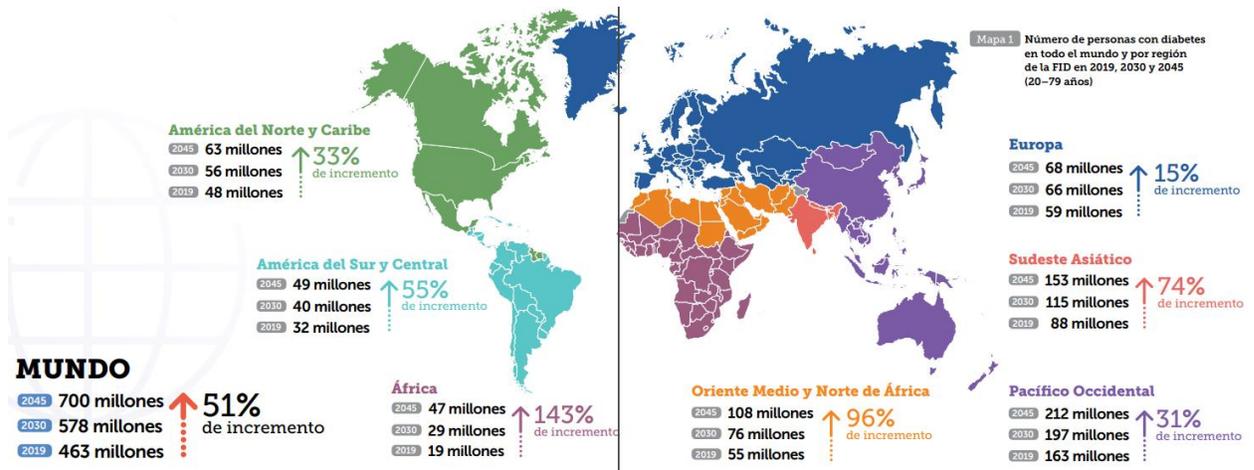


Figura 1. Mapa del número de personas con diabetes en el mundo (FID, 2019).

La insulina es la clave para que la glucosa de la comida pase a la sangre a través de las células del cuerpo y producir así energía. Todas las comidas ricas en carbohidratos se transforman en glucosa en sangre. La insulina es la proteína que ayuda a la glucosa acceder a las células. Si no somos capaces de producir insulina o utilizarla correctamente, nuestros niveles de glucosa en sangre se elevarán (conocido como hiperglicemia). Si se alarga en el tiempo, estos niveles altos de glucosa provocarán daños en el cuerpo y varios órganos y tejidos comenzarán a fallar, esta condición hiperglucémica favorece al desarrollo de la diabetes (FID, 2019).

Existen dos tipos de diabetes, la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 que comparten como característica común la hiperglucemia. La diabetes tipo 1 se caracteriza por la disminución y el deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos, debido a una respuesta autoinmune o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización (Olvera-Granados et al., 2008).

La diabetes tipo 2 es mucho más común y representa del 90 al 95% de todos los pacientes diabéticos, es el resultado de una combinación de defectos en la secreción de insulina y la acción de la insulina, cualquiera de los cuales puede predominar. Este tipo de diabetes se caracteriza por la resistencia a la insulina en los tejidos hepáticos y periféricos. Los pacientes que desarrollan diabetes mellitus tipo 2 no dependen de insulina exógena, pero puede requerirlo para el control de los niveles de glucosa en sangre si no se logran controlar con dieta o con agentes orales hipoglucemiantes. La diabetes es una de las principales causas de ceguera, enfermedad renal crónica y una variedad de neuropatías debilitantes (DeFronzo, 1997).

El transportador de glucosa GLUT4 juega un papel importante en la fisiopatología de la diabetes mellitus 2, debido a que a nivel molecular, se asocia con un insuficiente reclutamiento de GLUT4 a la membrana celular (Björnholm et al., 2005).

Membrana celular

La membrana celular es la estructura que delimita a la célula. Inicialmente conceptualizada como una barrera inerte, divisoria del interior y exterior celular, en la actualidad se le reconoce como un elemento dinámico y fundamental en el mantenimiento de la integridad de la célula. Como se muestra en la figura 2 su plétora de componentes lipídicos y proteicos propicia su participación en muy diversos e importantes procesos, por ejemplo: transporte y permeabilidad selectiva de sustancias y iones, excitabilidad, movilidad, diferenciación, exocitosis, reconocimiento intercelular y transducción de señales extracelulares (Meza et al., 2010).

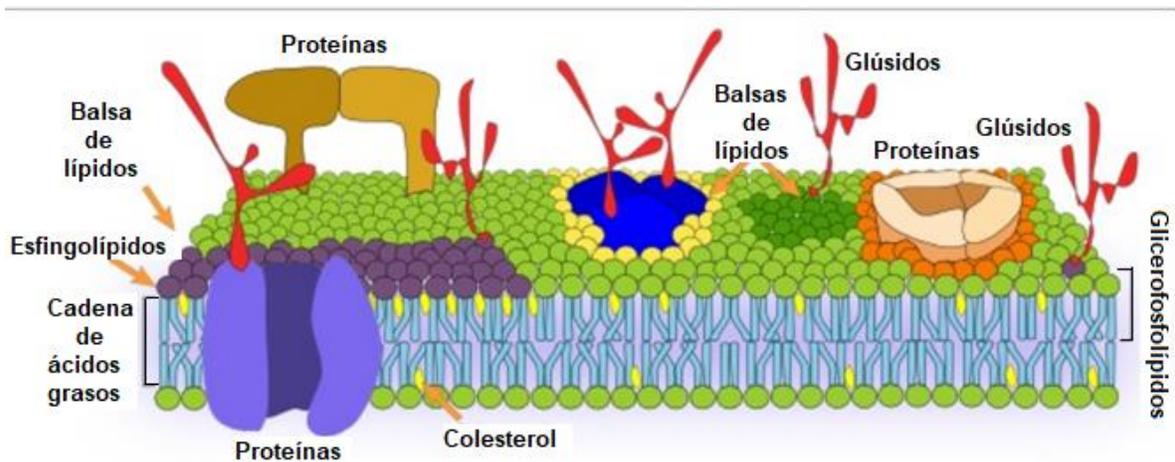


Figura 2. Esquema de la organización de una membrana plasmática (Megías et al., 2017)

La membrana celular contiene moléculas proteicas a través de ella que le hacen permeable, estas proteínas actúan en forma de canales que permiten a la célula el transporte selectivo de iones, solutos y otras moléculas a través de la membrana, el cual se puede llevar a cabo de forma pasiva o activa (Despopoulos, 2003; Deo et al., 2004; Neverisky et al., 2016).

Parte de las funciones de las membranas se deben a sus propiedades fisicoquímicas ya que es una estructura fluida que hace que sus moléculas tengan movilidad lateral, es semipermeable, por lo que puede actuar como una barrera selectiva frente a determinadas moléculas; posee la capacidad de romperse y repararse de nuevo sin perder su organización, es una estructura flexible y maleable que se adapta a las necesidades de la célula; está en permanente renovación, es decir, eliminación y adición de moléculas que permiten su adaptación a las necesidades fisiológicas de la célula (Megías et al., 2017).

El transporte de monosacáridos, polioles y otros pequeños compuestos de carbono a través de las membranas de las células eucariotas está mediado por miembros de la familia GLUT de proteínas integrales de membrana que están codificadas por los genes de los transportadores de soluto 2 (SLC2 por sus siglas en inglés) y son miembros de la superfamilia de facilitadores principales (Augustin, 2010; Joost et al., 2002; Thorens et al., 2010; Uldry et al., 2004).

Superfamilia de receptores SLC

Los transportadores son proteínas especializadas que trasladan sustratos a través de las membranas celulares. Por lo general, se clasifican como transportadores de entrada y salida y facilitan la entrada de sustratos al citoplasma (Lin et al., 2015). Generalmente, la captación de sustratos se lleva a cabo principalmente por transportadores de la familia de transportadores de solutos (SLC), que no dependen directamente de la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) (DeGorter et al., 2012; Riedmaier et al., 2012; Liang et al., 2015).

Los transportadores de SLC están ampliamente presentes y son abundantes en el cuerpo. Actúan como barrera en órganos protectores como el intestino y la placenta, y también son ubicuos en los principales órganos metabólicos, como el hígado (Chen et al., 2014), los riñones (Chen et al., 2009), o incluso están presentes en órganos endocrinos como el tejido adiposo (Song et al., 2019). Dentro de esta superfamilia están incluidos la familia de los transportadores de solutos 2 o GLUTs los cuales se encargan de transportar carbohidratos dentro de la células y hasta el momento se han descrito 14 GLUT (Fredriksson et al., 2008).

Receptores GLUT

Estos receptores actúan por difusión facilitada y están distribuidos diferencialmente en los tejidos corporales (Bell, 1990). Como se muestra en la figura 3 presentan características estructurales comunes: 12 dominios alfa hélice transmembranales, cuyos grupos amino y carboxilo terminal están localizados intracitoplasmáticamente, un dominio extracelular altamente glucosilado en el tercer o quinto bucle o asa dependiendo del GLUT (Thorens et al., 2010).

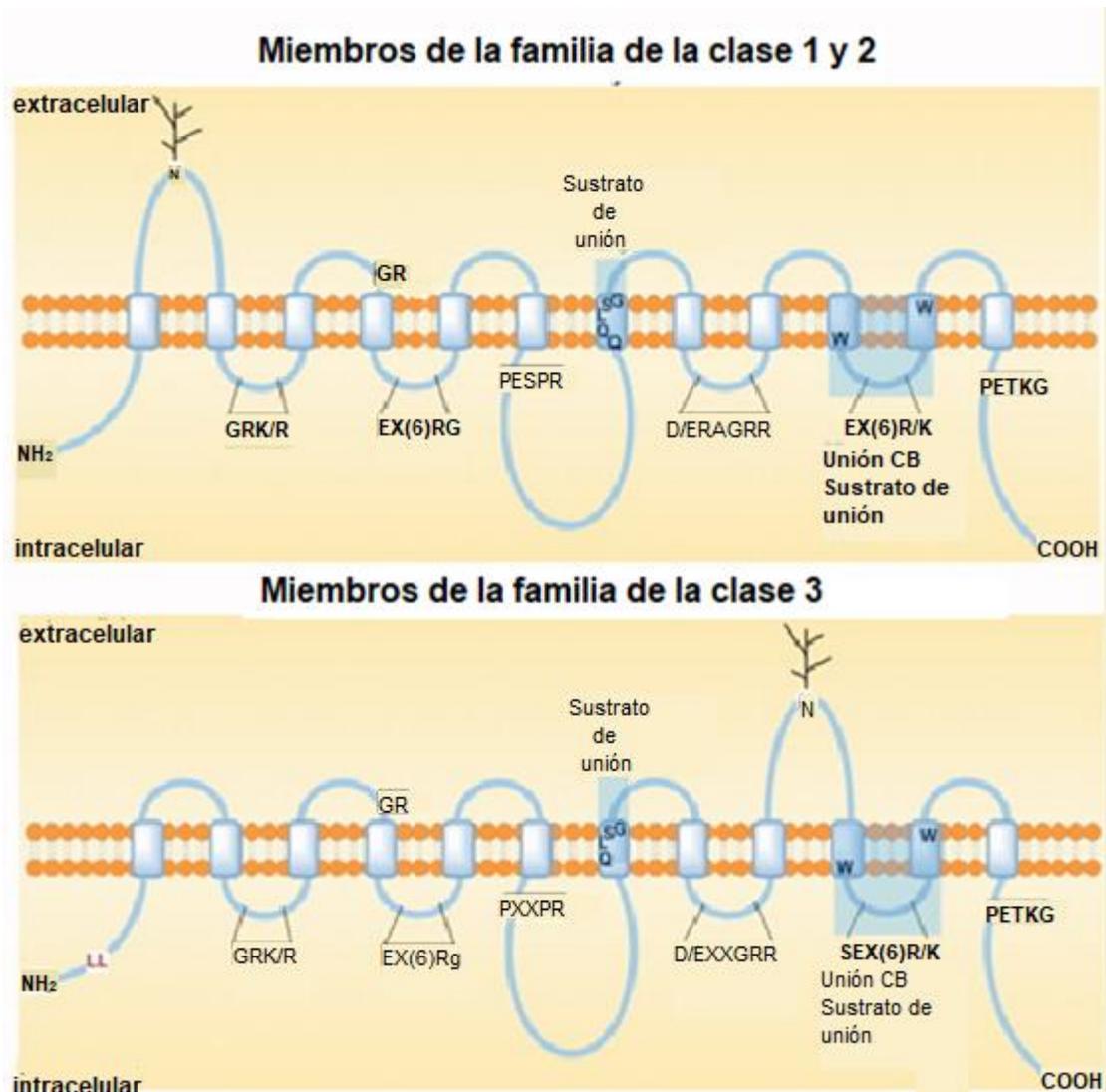


Figura 3. Diferencias específicas descritas en las clases de GLUT, como el sitio de unión al sustrato, los sitios de glicosilación enlazados a N (Augustin et al., 2010).

Los GLUT se pueden agrupar en tres clases principales de acuerdo con sus secuencias homólogas y a la posición del asa de glucosilación (Augustin et al., 2010). La clase I comprende del GLUT1 al 4 y GLUT14. La clase II (transportadores impares) incluye a los GLUT5, 7, 9 y 11. La clase III (transportadores pares) está conformada por GLUT6, 8, 10 y 12 y el transportador de mioinositol impulsado por protones (HMIT) o GLUT13 (Augustin et al., 2010).

En la figura 4 se observa un filograma radial sin raíces que se extrajo de una alineación de secuencia múltiple de los miembros de la familia GLUT en humanos (Wood et al., 2003).

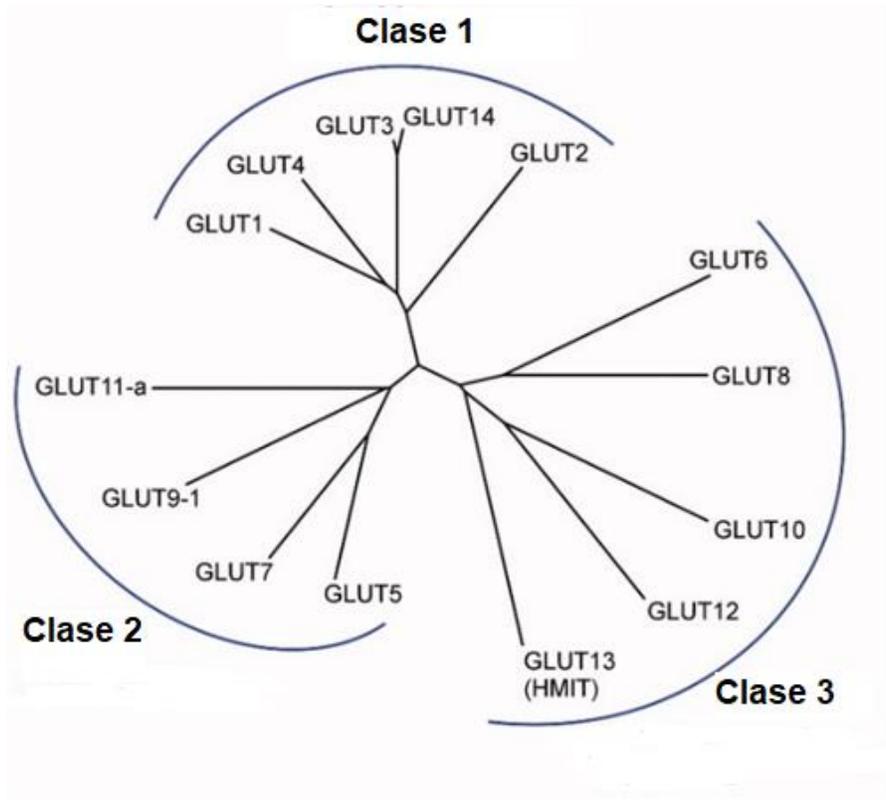


Figura 4. Árbol filogenético que muestra la relación entre los miembros de la familia de proteínas GLUT (Augustin et al., 2010).

En la tabla 1 se muestra una lista de los 14 GLUT descritos hasta la fecha con su diferente ubicación y patologías relacionados con su mal funcionamiento.

Tabla 1. Lista de receptores GLUT, su localización y enfermedades relacionadas a su mal funcionamiento.

Transportador	Localización	Enfermedades relacionadas
GLUT-1 (Glucosa y galactosa)	Eritrocitos, células endoteliales del cerebro, riñón, linfocitos.	Síndrome de deficiencia de GLUT-1
GLUT-2 (Glucosa)	Células pancreáticas, hígado, riñón, intestino delgado.	Síndrome de Fanconi-Bickel
GLUT-3 (Glucosa y galactosa)	Placenta, sistema nervioso central, hígado, riñón.	Restricción del crecimiento intrauterino fetal, enfermedad de Huntington, dislexia en niños.
GLUT-4 (Glucosa)	Tejido muscular estriado, tejido muscular cardíaco, adipocitos.	Diabetes mellitus II
GLUT-5 (Fructosa)	Intestino delgado, riñón, cerebro, musculo esquelético y tejido adiposo.	Trastornos en metabolismo de la urea, hiperinsulinemia.
GLUT-6 (Glucosa)	Cerebro, bazo, leucocitos periféricos.	Células tumorales de cáncer de mama.
GLUT-7 (Glucosa y fructosa)	Intestino delgado, colon.	Asociado a melanomas malignos.
GLUT-8 (Glucosa)	Testículos, cerebelo, glándula suprarrenal, hígado, bazo, pulmón.	Asociados a esteatosis y adenocarcinoma testicular.
GLUT-9 (Fructosa)	Riñón, intestino delgado, placenta, pulmón, leucocitos.	Hiperuricemia, nefropatía, abortos espontáneos.
GLUT-10 (Glucosa)	Corazón, pulmón, cerebro, hígado, placenta, riñón, adipocitos, musculo esquelético.	Síndrome de tortuosidad arterial.
GLUT-11 (Fructosa y glucosa)	Corazón, músculo esquelético, riñón, placenta, adipocitos.	No descritas.
GLUT-12 (Glucosa)	Musculo esquelético, corazón, intestino delgado, próstata.	Nefropatía diabética, hiperglucemia e hipertensión.
GLUT-13 (Mio-inositol)	Cerebro, hipocampo, hipotálamo, cerebelo.	Asociado a trastorno bipolar.
GLUT-14 (Glucosa)	Testículos.	Se ha asociado el polimorfismo de uno de sus genes con la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, el efecto de este polimorfismo en esta patología no se ha dilucidado.

GLUT4

De toda la lista GLUT4 representa uno de los transportadores de glucosa más estudiados, lo que se atribuye a su importante papel fisiológico que es el paso limitante de la velocidad en captación de glucosa estimulada por insulina del

músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo marrón y blanco (De Vos et al., 1995). Por lo tanto, el deterioro de la translocación de GLUT4 está relacionada causalmente con la resistencia a la insulina y en consecuencia a la condición de enfermedad no dependiente de insulina diabetes mellitus (Alam et al., 2016).

GLUT4 presenta alta afinidad por la glucosa y se expresa en aquellos tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, el tejido adiposo o el corazón. Actualmente se sabe que la insulina estimula la incorporación del GLUT4 a la membrana plasmática a partir de vesículas intracelulares, incrementando de 10 a 20 veces el transporte de la glucosa (Castrejón et al., 2007).

El GLUT4 se localiza en el citoplasma almacenado en forma de vesículas. La traslocación de las vesículas de almacenamiento de GLUT4, o vesículas de respuesta a insulina, del citoplasma a la membrana plasmática es regulada por la acción de insulina. En condiciones fisiológicas, al translocarse la vesícula de GLUT4 del citoplasma a la membrana celular mediante exocitosis, se integra a la membrana, con la subsecuente captación de glucosa (Bryant et al., 2002; Chavez et al., 2012; Foley et al., 2014).

Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Avruchm, 1998; Gruberger et al., 2002).

En la figura 5, se muestra el mecanismo por el cual la insulina induce la incorporación de GLUT4 a la membrana, se produce una vez que la insulina se une a su receptor membranal en el que se genera un cambio conformacional que estimula la actividad de tirosinacinas. Al unirse la insulina con su receptor, se fosforila la subunidad beta (β) del receptor de insulina (IR, del inglés insulin receptor), lo que ocasiona a su vez la fosforilación del sustrato del receptor a insulina tipo 1 (IRS-1). Posteriormente se sintetiza fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₂) a partir de fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP₂) mediante la unión de IRS-1 a la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Con lo anterior, se activa la proteína dependiente

de cinasa 1 (PDK1), activando a su vez a la proteína cinasa tipo B (PKB/AKT) mediante su fosforilación. Consecuentemente, se activan AS160 y RaB para posteriormente favorecer el mecanismo de translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática (De Jesús Sandoval-Muñiz et al., 2016).

Además, la translocación de GLUT4 también puede desencadenarse por el ejercicio, probablemente a través de la activación de la vía de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) independiente de la insulina (Uldry et al., 2004).

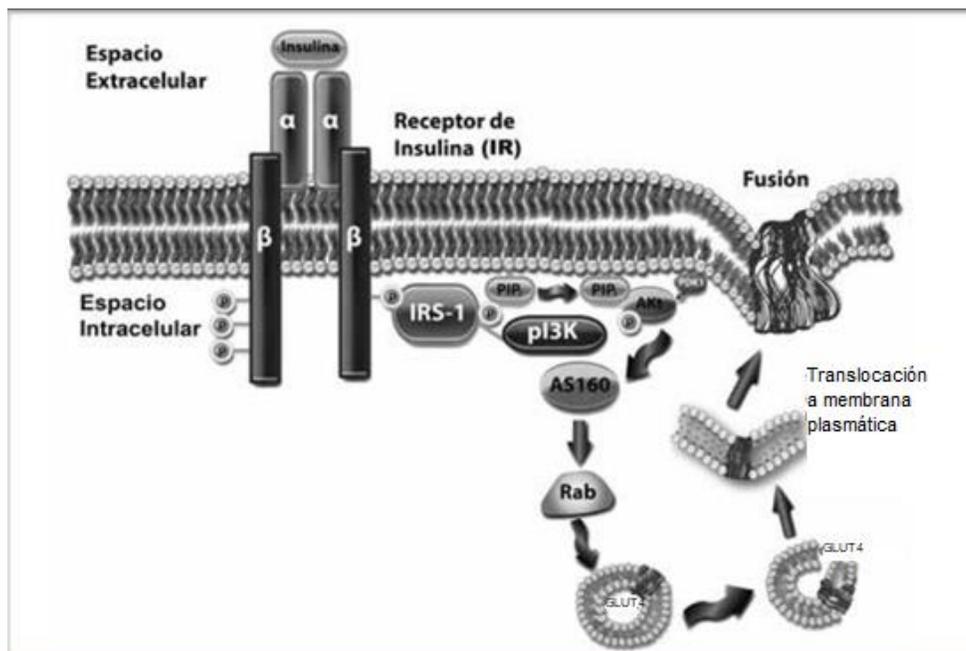


Figura 5. Vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa(PI3K) para la incorporación de GLUT4 a la membrana celular (De Jesús Sandoval-Muñiz et al., 2016)

Vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Reyes et al., 2008).

En la figura 6 se muestra como el IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de Tyr (Y) que, al ser fosforilados por el IR, 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 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI (4,5) P2, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI (3,4,5) P3, que sirve como sitio de unión para cinasas de serina (Ser) como PDK1 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser⁴⁷³ que es seguida por una fosforilación en la Thr³⁰⁸, esta última inducida por PDK1. Akt induce varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9 (Reyes et al., 2008). Uno de los principales reguladores de la vía PI3K es el PI (4,5) P2.

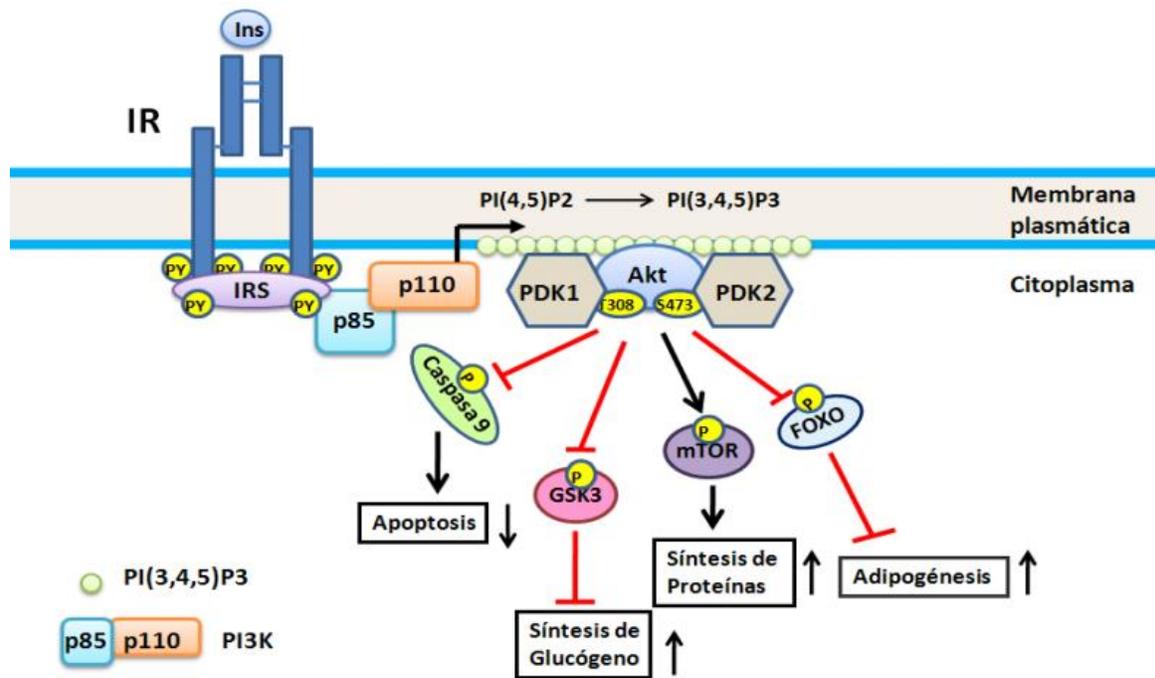


Figura 6. Funciones de la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Reyes et al., 2008).

Fosfatidilinositol

Los fosfoinosítidos son lípidos de membrana que están constituidos por glicerol, dos cadenas de ácidos grasos y una molécula de inositol fosforilada en una o varias posiciones. Se denominan también fosfatidilinosoles (Diccionario Médico, 2020).

Aunque los fosfoinosítidos sólo comprenden el 4-5% del total de los fosfolípidos membranales, ellos regulan una gran variedad de funciones en la transducción de señales; entre éstas, se encuentra la regulación de canales iónicos (Eyster, 2007) por ejemplo, PI (4,5) P2 es el fosfoinosítido con más capacidad de modulación en los canales iónicos (Burgos et al., 2010).

Hay siete diferentes especies de fosfoinosítidos los cuales se encuentran entre las moléculas más versátiles conocidas, todas son moléculas activas que llevan a cabo una amplia variedad de funciones de regulación celular como es el caso de la vía de señalización de GLUT4, además de servir como intermediarios para la síntesis de otras especies fosforiladas (Downes et al., 2005; Vicinanza et al., 2008; Mayinger 2012; Schink et al., 2016).

Se ha demostrado que la actividad del fosfatidilinositol no solo es importante en la regulación del tráfico vesicular, sino que también es un importante mediador de segundos mensajeros y mecanismos celulares (Schink et al., 2016; Osborne et al., 1988; Martin, 2012). El fosfatidilinositol (4,5) P2 es el más abundante de los lípidos del inositol presente en las membranas de las células eucarióticas (Michell, 1979).

Fosfatidilinositol (4,5) P2.

El tráfico de membranas es el proceso que utiliza vesículas unidas a la membrana como intermediarios de transporte, controla el flujo de proteínas y otros materiales macromoleculares entre diferentes compartimentos subcelulares (Cheung et al., 2008; González et al., 1999). Los fosfoinosítidos son fosfolípidos que desempeñan un papel central en la modulación del tráfico de membranas, controlando la dinámica y el transporte vesicular (Balla, 2013).

La estructura central de PI (4,5) P2 se origina del fosfatidilinositol. En esencia, consta de un grupo principal de mioinositol.

PI (4,5) P2 es producida por fosfatidilinositol-fosfocinasas tipo I y tipo II (PIPK) (Doughman et al., 2003). PI (4,5) P2 puede actuar directamente como mensajero o

puede utilizarse como precursor para generar otros mensajeros: trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG) o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3,4,5P3). PI (4,5) P2 interactúa con cientos de proteínas efectoras diferentes. La enorme diversidad de proteínas efectoras PI (4,5) P2 y el control espacio-temporal de la generación de PI (4,5) P2 permite que este fosfoinosítido regule un amplio espectro de funciones celulares (Sun et al., 2013). Los liposomas catiónicos pueden transportar PI (4,5) P2 ya que puede unirse electrostáticamente por su carga negativa al lípido catiónico sintético espermidil-colesterol con el que se encuentran formulados dichos liposomas (Corona-Ortega et al., 2009)

Liposomas

Desde su descubrimiento, los liposomas han sido ampliamente utilizados como modelos de membrana (Holzner, 1994). Con posterioridad, ha aumentado el interés en su utilización como sistemas de transporte, tanto en industria farmacéutica como cosmética (Torello et al., 2002).

Los liposomas son nanotransportadores constituidos por bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos separadas por un compartimiento acuoso. Los liposomas se forman cuando los lípidos anfipáticos se dispersan en agua y las partes hidrofóbicas de estas moléculas se acomodan en bicapas para liberarse del agua, dejando compartimientos acuosos en el interior y exterior. En la parte acuosa se pueden transportar diversas moléculas hidrofílicas de diferente naturaleza como ácidos nucleicos, fármacos inorgánicos, citocinas, antígenos o anticuerpos (Rangel-Corona et al., 2014).

Su tamaño suele oscilar entre 20 nm y varias decenas de μm^2 (Lasic, 1993). Los fosfolípidos son los lípidos más comúnmente utilizados en la elaboración de liposomas. La variabilidad de éstos estriba en el grupo que se une al fosfato. Así, se pueden unir aminoalcoholes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcoholes (fosfatidilglicerol) y azúcares (fosfatidilinositol) (Torello et al., 2002).

Los liposomas catiónicos son un tipo de liposomas que se fabrican con lípidos sintéticos pues no existen de forma natural, al estar cargados positivamente, interaccionan espontáneamente con las membranas celulares (Weissig, 2010).

Los liposomas catiónicos son análogos a los utilizados para la transfección de ADN, porque contienen una molécula de espermidina cargada positivamente cuya función es unir los segmentos de ADN cargados negativamente. Se ha encontrado que estos liposomas catiónicos no tienen un efecto tóxico en células de carcinoma de cérvix INBL, esto podría deberse al hecho de que la espermidina y el colesterol utilizados son componentes celulares naturales no tóxicos (Corona-Ortega et al., 2009).

Estos transportadores se han empleado para combinar agentes terapéuticos de diferentes categorías en la lucha contra el cáncer como la quimioterapia, inmunoterapia, etc (Slingerland et al., 2012).

Transportadores GLUT y cáncer.

La glucólisis es la vía catabólica por la cual la glucosa sufre la primera transformación para obtener energía. En células normales, después de la glucólisis, la glucosa se metaboliza aún más a través del ciclo del ácido tricarbóxico y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Calvo et al., 2010).

Sin embargo, las células tumorales muestran un aumento del consumo de glucosa que se metaboliza principalmente mediante la vía fermentativa con la consecuente producción de ácido láctico. Probablemente, el uso del catabolismo fermentativo por las células tumorales se debe a un mal funcionamiento mitocondrial (Warburg, 1956; Kim et al., 2006). Como resultado, el catabolismo oxidativo, que es más eficiente en la producción de energía, es alterado en las células tumorales. La vía de fermentación llevada por las células cancerosas implica el consumo de más azúcar para cumplir con sus requerimientos energéticos (Calvo et al., 2010).

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar este consumo de glucosa exacerbado, incluido el aumento de la expresión de hexoquinasa (Paul et al., 1985), la disminución de la desfosforilación de glucosa mediada por glucosa-6-fosfatasa (Graham et al., 1989) y / o la sobreexpresión de transportadores de azúcar (Isselbacher, 1972). De acuerdo con esta última explicación, se ha observado sobreexpresión de GLUTs en muchos cánceres humanos (Calvo et al., 2010).

Planteamiento del problema

La vía de señalización de la insulina para la incorporación de GLUT4 en la membrana es muy importante por su alta afinidad a la glucosa, sin embargo, en algunas ocasiones la vía falla, tal es el caso de la Diabetes Mellitus 2 donde se ha descrito que en tejidos blanco de la insulina se encuentra disminuida la expresión y los niveles de fosforilación del IRS-1, de la PI3K cinasa y de la proteína cinasa B, los cuales constituyen elementos de señalización temprana de la insulina, donde el fosfatidilinositol encontrado en la membrana plasmática de las células eucariotas desempeña diversas funciones reguladoras por medio de la activación de diferentes mecanismos y vías de señalización, como la vía de señalización de la insulina.

En el presente trabajo se busca determinar la expresión del receptor GLUT4 y evaluar si la línea celular de cáncer de próstata PC-3 puede ser utilizada como control positivo para evaluar la expresión de GLUT4 ya que se sabe que esta línea celular tiene una elevada expresión de ARNm de GLUT4. Una vez establecido el control positivo se pretende determinar la capacidad que tienen los liposomas catiónicos y los liposomas catiónicos que contienen PI (4,5) P2 para regular la expresión del transportador de glucosa en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 y la línea celular del carcinoma de cérvix INBL. Esta propuesta se basa en resultados previos obtenidos por el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), donde se trabajaron con líneas celulares tumorales y se aumentó la expresión de receptores activados por la vía de señalización de PI3K, como el receptor CD16 y el receptor opioide δ (DOR).

Hipótesis

El fosfatidilinositol es un lípido presente en la membrana plasmática que tiene importante actividad reguladora en el tráfico vesicular, GLUT4 se encuentra principalmente en el interior de la célula en vesículas que son integradas a la membrana cuando se activa la vía de señalización de la insulina.

En resultados obtenidos de experimentos previos realizados en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza se reportó la capacidad de los liposomas catiónicos para inducir la proliferación celular y la inducción de la expresión del receptor CD16 en la línea celular de cáncer de cuello uterino INBL y en leucocitos, por lo que se espera que al estimular las células PC-3 e INBL con liposomas catiónicos que contienen PI (4,5) P2 se favorecerá el movimiento de vesículas que contienen GLUT4 al exterior de la membrana celular, por lo que la expresión de estos receptores será mayor comparada con la expresión basal que presentan estas células.

Objetivo general

-Determinar la expresión de GLUT4 en la membrana de células tumorales inducido por liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2, con dos diferentes síntesis de espermidil-colesterol descritos como, lípido A y lípido B.

Objetivos particulares

-Cultivar células de las líneas celulares PC-3 e INBL en presencia de liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2, con dos diferentes síntesis de espermidil-colesterol descritos como, lípido A y lípido B.

-Determinar la expresión de GLUT4 en membrana de células mediante citometría de flujo.

Método

-Material biológico

Se utilizó la línea celular PC-3 proveniente de *Homo sapiens*, son células derivadas de un adenocarcinoma de próstata, en la cual se ha confirmado la presencia de receptores GLUT1 y GLUT4 y la línea celular INBL que son células derivadas de carcinoma de cérvix en la cual no se ha reportado la presencia del receptor GLUT4.

-Cultivo celular

Las líneas celulares PC-3 e INBL se cultivaron en cajas de cultivo de 75 cm³, en el caso de PC-3 con medio de cultivo DMEM-F12 (ATCC) y para INBL RPMI (MICROLAB), ambos medios adicionados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), mantenidos en incubadora a 36.5 °C de temperatura y una inyección de 5% de CO₂. Se mantuvieron durante 3-4 días para su proliferación y posterior estimulación con liposomas.

-Fabricación de liposomas

-Se fabricaron dos lotes de liposomas con métodos diferentes para la síntesis del lípido que confiere la carga catiónica a estos, obteniendo así liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 con síntesis de espermidilcolesterol A (lípido A) y liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 con síntesis de espermidilcolesterol B (lípido B).

-Cultivo en presencia de liposomas.

Las células se trasladaron a cajas petri con medio de cultivo, se añadieron 333 µL/mL de liposomas catiónicos o liposomas con PI (4,5) P2 por media hora, al finalizar el tiempo se retiró el medio y se dio un lavado con PBS, posteriormente se despegaron las células con verseno y se trasladaron a tubos eppendorf de 2 mL.

-Evaluación del receptor GLUT4 por citometría de flujo

Una vez concluido el tiempo de cultivo en presencia de los liposomas las líneas celulares se incubaron con el anticuerpo primario Glut4 (IF8) (1:200 µL) (SANTA

CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 2 horas en hielo y agitación, después se lavaron con PBS, se agregó el anticuerpo secundario FIT-C (1:500 μ L) (SIGMA) y se incubó por 45 minutos a 36.5 °C de temperatura, después se dio otro lavado con PBS y se colocaron las células en 500 μ L de PBS en una celda para citometría donde se adquirieron 10,000 eventos en un citómetro de flujo (BDFACSAria II) analizados con el software Flowing Software 2.5.1.

Resultados

Evaluación de GLUT4 en células tumorales por citometría de flujo.

Para observar el efecto que tienen los liposomas que contienen PI (4,5) P2 sobre la traslocación del receptor GLUT4 en las líneas celulares de carcinoma de próstata PC-3 y carcinoma de cérvix INBL se hicieron cultivos en presencia de liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 con lípidos de diferentes síntesis por media hora, ya que se sabe el fosfatidilinositol juega un gran papel en la vía de señalización de GLUT4.

La determinación de GLUT4 se realizó mediante citometría de flujo adquiriendo 10,000 eventos en cada experimento y cada uno se repitió tres veces.

Determinación de la expresión de GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular PC-3 con liposomas de síntesis A.

En la figura 7 se observa la expresión de GLUT4 en las células de la línea celular PC-3 cultivadas en presencia de liposomas con lípido de síntesis A mostrando un desplazamiento del 7.86% con liposomas catiónicos y 10.96% con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 con respecto del basal.

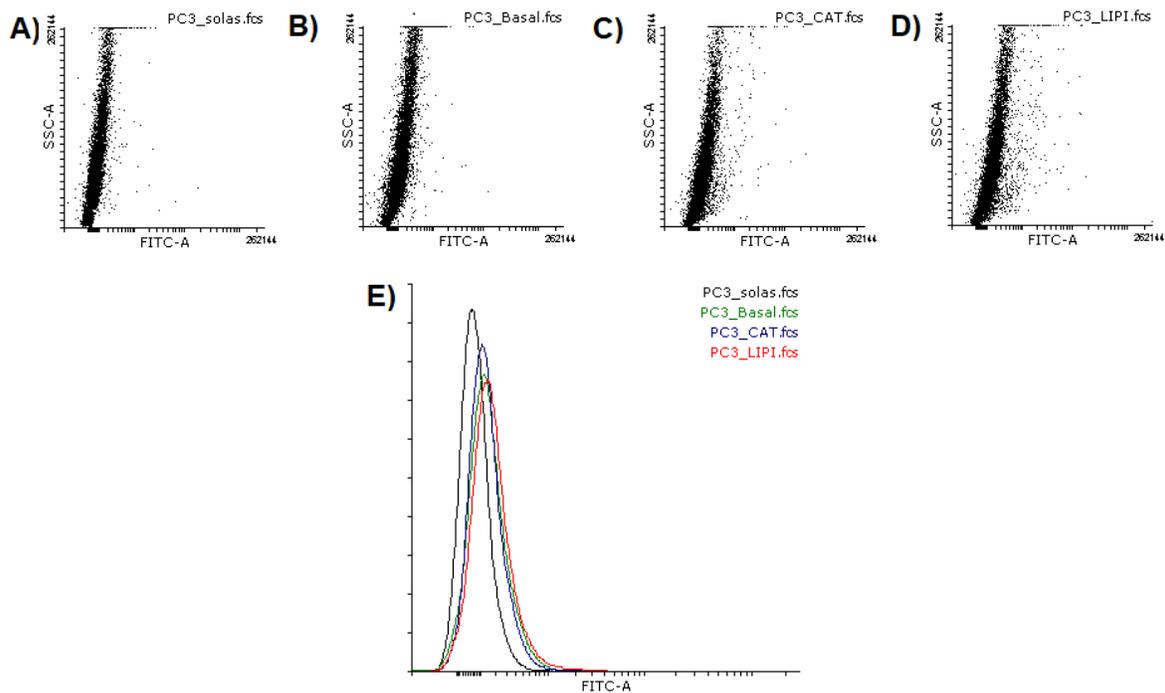


Figura 7. Expresión de GLUT4 en células de la línea PC-3 cultivadas en presencia de liposomas de lípido síntesis A; A) Células solas; B) Células basales; C) Células con liposomas catiónicos (CATA); D) Células con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 (LIPIA) E) Histograma comparativo de células solas, basales y estimuladas con CATA y LIPIA.

Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular INBL con liposomas de síntesis A.

En la figura 8 a diferencia de las células PC-3, las células de la línea celular INBL cultivadas en presencia de liposomas con lípido síntesis A muestra un desplazamiento del 4.51% con liposomas catiónicos y 5.11% con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 mostrando una tendencia menor a la expresión del receptor comparado con la línea celular PC-3.

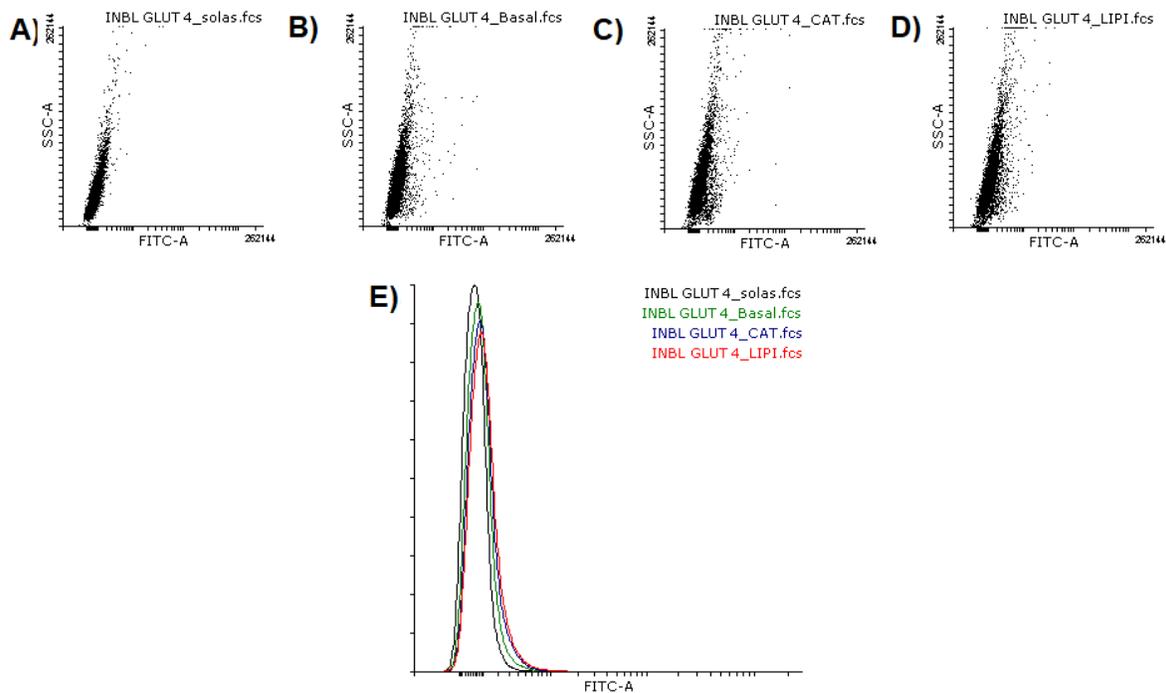


Figura 8. Expresión de GLUT4 en células de la línea INBL cultivadas en presencia de liposomas de lípido síntesis A; A) Células solas; B) Células basales; C) Células con liposomas catiónicos (CATA); D) Células con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 (LIPIA) E) Histograma comparativo de células solas, basales y estimuladas con CATA y LIPIA.

Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular PC-3 con liposomas de síntesis B.

En la figura 9 se observa una tendencia a una mayor expresión del receptor GLUT4 en comparación a los liposomas de lípido síntesis A, en las células de la línea celular PC-3 cultivadas en presencia de liposomas con lípido síntesis B mostrando un desplazamiento del 12.77% con liposomas catiónicos y 18.29% con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2.

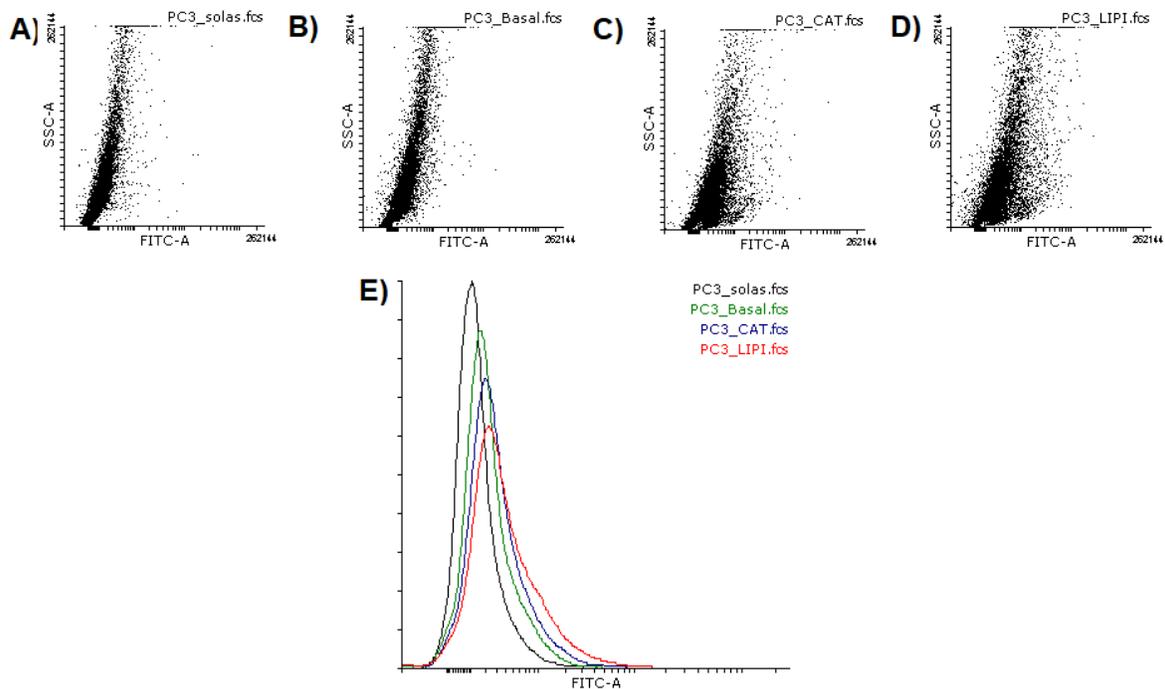


Figura 9. Expresión de GLUT4 en células de la línea PC-3 cultivadas en presencia de liposomas de lípido síntesis B; A) Células solas; B) Células basales; C) Células con liposomas catiónicos (CATB); D) Células con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 (LIPIB) E) Histograma comparativo de células solas, basales y estimuladas con CATB y LIPIB.

Determinación de la expresión GLUT4 en membrana de células tumorales de la línea celular INBL con liposomas de síntesis B.

En la figura 10 al igual que la línea celular PC-3 se muestra un aumento en la expresión del receptor GLUT 4 en las células de la línea celular INBL cultivadas en presencia de liposomas con lípido síntesis B mostrando un desplazamiento del 10.37% con liposomas catiónicos y 10.94% con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2.

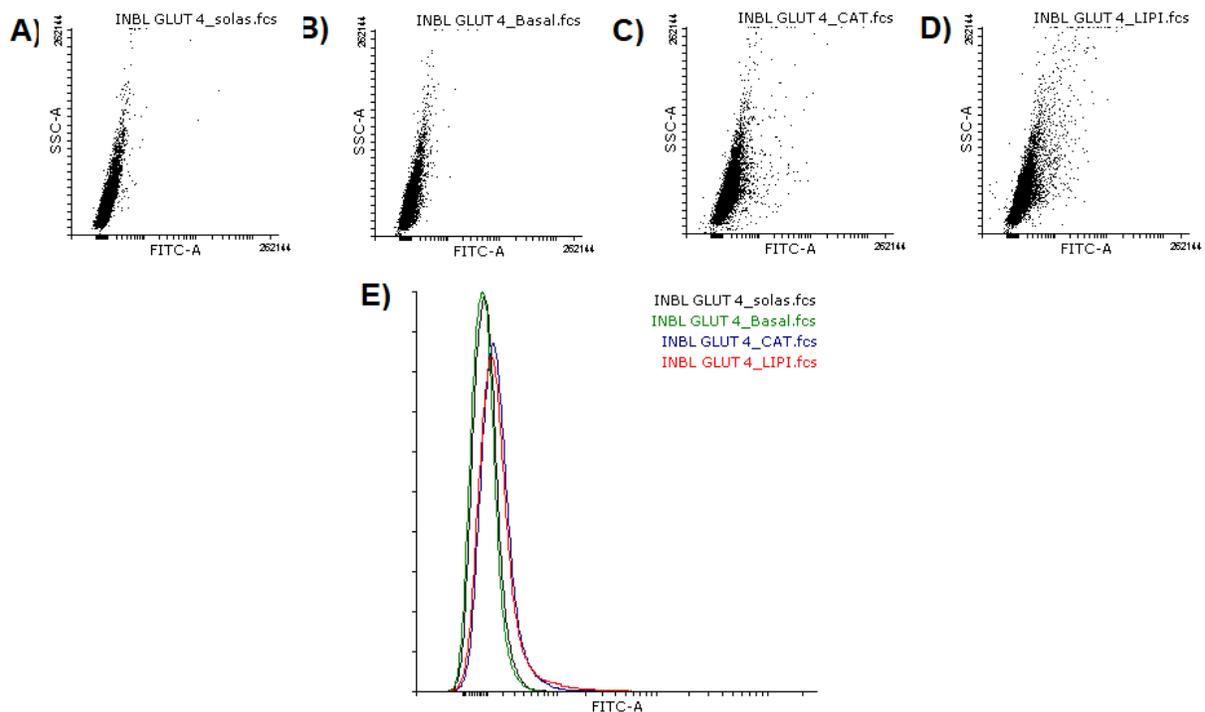
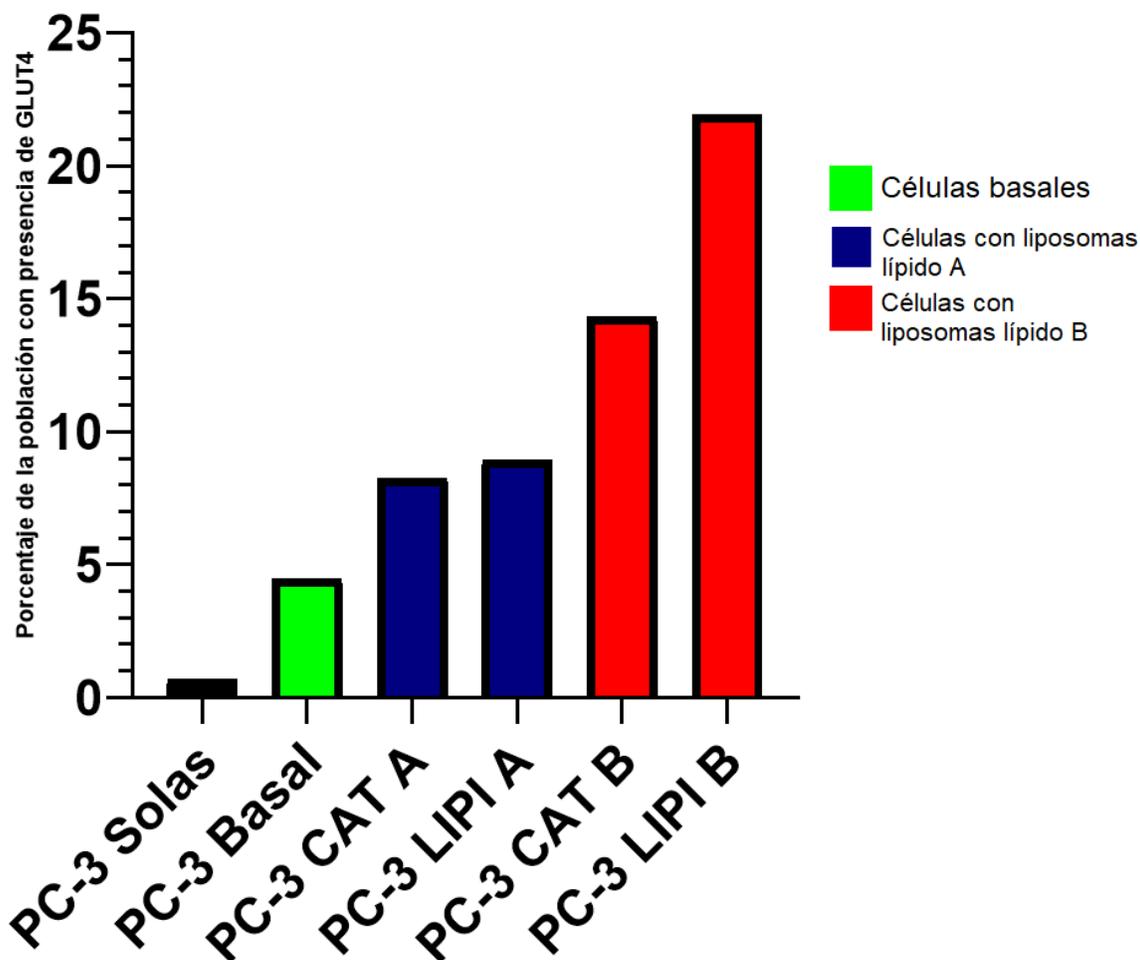


Figura 10. Expresión de GLUT4 en células de la línea INBL cultivadas en presencia de liposomas de lípido síntesis B; A) Células solas; B) Células basales; C) Células con liposomas catiónicos (CATB); D) Células con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 (LIPIB) E) Histograma comparativo de células solas, basales y estimuladas con CATB y LIPIB.

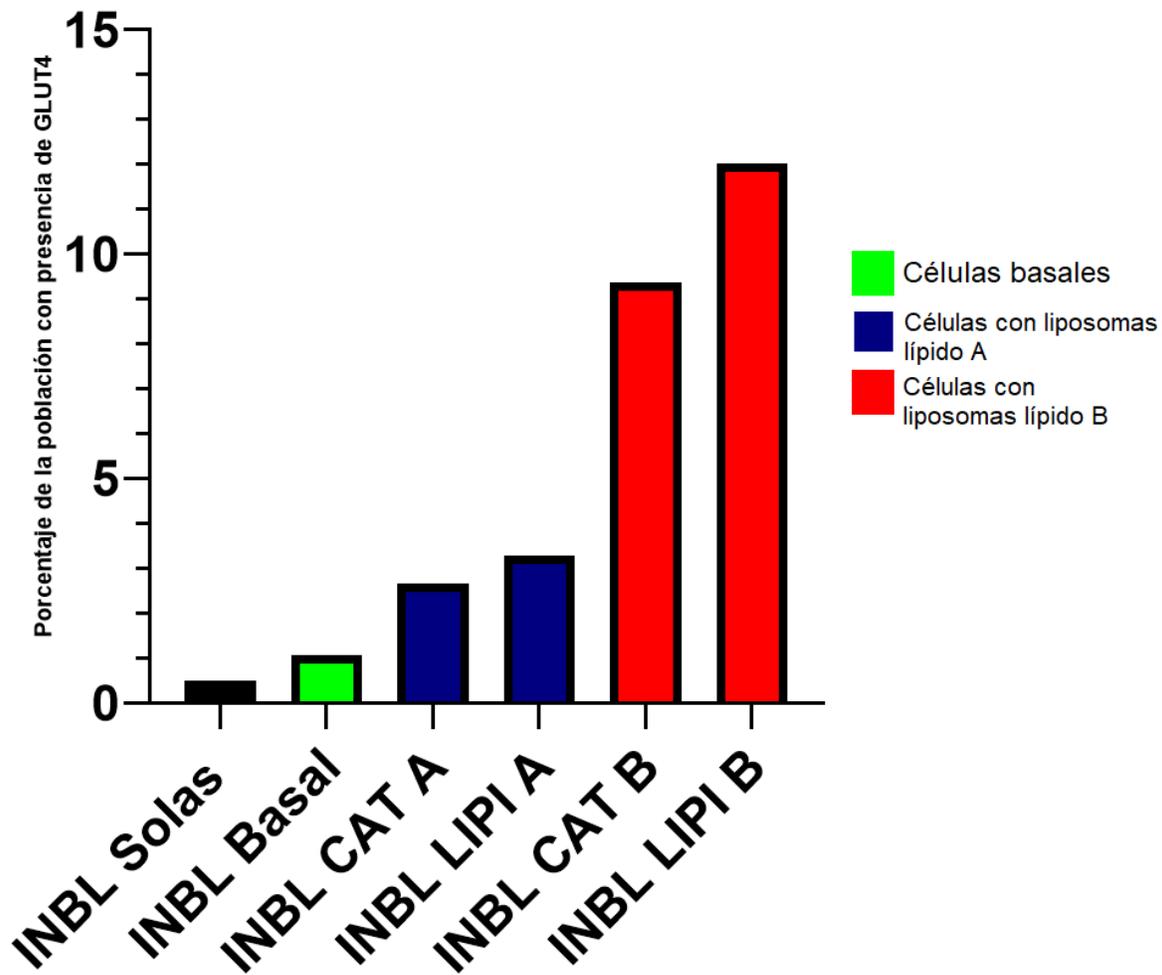
La gráfica 1 y 2 muestra el porcentaje de células en las que se regula la expresión de GLUT4 en las líneas celulares PC-3 e INBL cultivadas con los diferentes estímulos de liposomas, donde, en la línea celular PC-3 se muestra una tendencia al aumento de la expresión del receptor al ser estimuladas con el liposoma de lípido B en comparación al estímulo de liposomas de lípido A, la línea celular INBL muestra una menor expresión del receptor en comparación a PC-3, y no muestra una diferencia significativa al ser estimuladas con liposomas catiónicos lípido B y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 de lípido B.

Comparación de la expresión del receptor GLUT4 en las diferentes condiciones de cultivo



Grafica 1. Comparación de la expresión del receptor GLUT4 de acuerdo con las diferentes condiciones de cultivos, basal, liposomas catiónicos lípido A (CATA) liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 lípido A (LIPIA), liposomas catiónicos lípido B (CATB) liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 lípido B (LIPIB) en la línea celular PC-3, los experimentos se realizaron por triplicado.

Comparación de la expresión del receptor GLUT4 en las diferentes condiciones de cultivo



Grafica 2. Comparación de la expresión del receptor GLUT4 de acuerdo con las diferentes condiciones de cultivos, basal, liposomas catiónicos lípido A (CATA) liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 lípido A (LIPIA), liposomas catiónicos lípido B (CATB) liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 lípido B (LIPIB) en la línea celular PC-3, los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis de resultados

La diabetes mellitus tipo 2, es la forma más común de diabetes y se caracteriza por la resistencia a la insulina en los tejidos hepáticos y periféricos. El GLUT4 juega un papel importante en la fisiopatología de la DM2. Su expresión defectuosa o translocación a la membrana plasmática de células periféricas en pacientes con DM2 dificulta la entrada de glucosa en la célula para la producción de energía (Alam et al., 2016). Por lo que se buscan tratamientos o fármacos que ayuden a la regulación del receptor GLUT4.

También los diversos estudios han demostrado lo importante que es mantener la expresión de GLUT4 dentro de su rango fisiológico. La expresión suprafisiológica de GLUT4 provoca hipoglucemia, hipoinsulinemia y lactacidemia (Klip et al., 2019).

Uno de los marcadores del desarrollo de las células tumorales es el aumento de la dependencia de la glucosa como combustible de la glucólisis aeróbica para el aumento de la producción de metabolitos celulares necesarios para la generación de nueva biomasa y para facilitar la señalización de nutrientes por lo que se ha reportado presencia de un nivel significativamente mayor de ARNm de GLUT4 en la línea tumoral PC-3 con respecto a células epiteliales normales (Barron et al., 2012).

Con las anteriores bases, en el presente trabajo se utilizaron células tumorales de la línea celular de carcinoma de próstata PC-3 y la línea celular de carcinoma de cérvix INBL, demostrando mediante citometría de flujo que basalmente PC-3 tiene el receptor en su membrana y puede ser utilizado como un control positivo de la expresión del receptor GLUT4.

Entre los problemas relacionados con la traslocación de GLUT4 destacan los involucrados en la vía PI3K una de las alteraciones más comunes es la disminución en el número de receptores y de su actividad de cinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4 (Sesti, 2006).

Se sabe que PI (4,5) P2 desempeña muchas funciones importantes en todas las células eucariotas, estos incluyen la modulación de las propiedades físicas de las membranas, la activación o inhibición de proteínas asociadas a la membrana, el reclutamiento de proteínas de la membrana periférica que actúan como efectoras y el control del tráfico de la membrana (Wensel, 2020).

En el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza se han desarrollado liposomas catiónicos, que gracias a su carga positiva son capaces de interactuar con las membranas celulares. También se ha descrito que pueden llevar en la superficie externa moléculas como IL-2 o PI (4,5) P2 las cuales pueden unirse electrostáticamente por su carga negativa (Corona-Ortega et al., 2009).

En anteriores investigaciones usando estos liposomas se ha observado un aumento en la proliferación y en la expresión de membrana de CD16, en leucocitos de sangre periférica y en las células INBL (Corona-Ortega et al., 2019), también se ha detectado el aumento del receptor opioide δ (DOR) en membranas plasmáticas de linfocitos (García, 2017).

En la presente investigación se estimularon con liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 las células tumorales PC-3 e INBL de dos síntesis distintas de espermidil-colesterol (Lípido A y Lípido B), ambas hechas en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza.

Los resultados obtenidos para la expresión de GLUT4 inducidos por liposomas catiónicos con lípido A en ambas líneas celulares se observa una ligera tendencia al aumento de la expresión del transportador de glucosa GLUT4 con respecto a su expresión basal, sin embargo, con liposomas catiónicos de lípido B el aumento en la concentración de GLUT4 es mayor, esto podría deberse a que se modificó el proceso de síntesis del lípido B con el objetivo de obtener mayor rendimiento y un alto grado de pureza en la producción de espermidil-colesterol, que podría influir en el movimiento del receptor GLUT4. Es importante mencionar que los liposomas catiónicos en ambas formulaciones son capaces de aumentar la expresión de GLUT4, esto puede deberse a que la carga positiva del liposoma y su fusión con la

membrana celular puede propiciar la movilización de receptores incluyendo este transportador de glucosa.

En cuanto a las diferencias entre liposomas catiónicos y liposomas catiónicos con PI (4,5) P2, es evidente que los liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 muestran un aumento destacable en la expresión de GLUT4, esto puede deberse al efecto del PI (4,5) P2 sobre la vía de señalización de GLUT4.

Ahora bien, aunque ambas líneas celulares mostraron tener expresión de GLUT4 ya sea basalmente o inducido por los liposomas, PC-3 demostró tener una mayor tendencia en el aumento de la expresión de GLUT4 observándose así una fluorescencia por arriba que INBL, esto debido a que PC-3 según Barron en el 2012 demostró tener niveles de ARNm de GLUT4 mayores a células epiteliales normales, por el contrario, en células de carcinoma de cérvix se ha reportado la sobreexpresión de GLUT1 (Mendez et al., 2002).

Los resultados obtenidos al estimular con liposomas catiónicos con PI (4,5) P2 se pueden deber a PI (4,5) P2 y su importancia en la movilización y reclutamiento de receptores. Por otra parte, al analizar la expresión basal de GLUT4 en las células tumorales de la línea celular PC-3 es evidente que esta línea celular puede ser utilizada como un control positivo para futuras investigaciones y funja como un parámetro de comparación con células normales o células con una baja expresión del receptor.

Para finalizar, este trabajo puede ser usado para futuras investigaciones en las que se pretenda analizar el patrón de expresión de GLUT4 en modelos *In vitro* en células normales y en células resistentes a insulina y en modelos *In vivo*.

Conclusiones

Al evaluar la expresión de GLUT4 en la membrana de células tumorales inducida por liposomas catiónicos y liposomas catiónicos que contienen PI (4,5) P2, es evidente que se promueve la movilización de receptores a la membrana celular generada principalmente por liposomas formulados con la síntesis de espermidil-colesterol tipo B. La mayor expresión del GLUT4 en ambas líneas celulares se obtuvo cuando las células PC-3 e INBL fueron estimuladas con liposomas catiónicos que contienen PI (4,5) P2.

Perspectivas

En futuras investigaciones se pretende analizar la expresión de GLUT4 en células normales, células resistentes a la insulina y modelos in vivo y determinar si los liposomas son capaces de regular el aumento en la expresión del receptor.

Bibliografía

Alam, F., Asiful Islam, M., Ibrahim Khalil, M., & Hua Gan, S. (2016). Metabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. *Current Pharmaceutical Design*, 22(20), 3034–3049. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160307145801>

Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, NA. <https://doi.org/10.1002/iub.315>

Avruch J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Molecular and cellular biochemistry*, 182(1-2), 31–48.

Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiological Reviews*, 93(3), 1019–1137. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2012>

Barron, C., Tsiani, E., & Tsakiridis, T. (2012). Expression of the glucose transporters GLUT1, GLUT3, GLUT4 and GLUT12 in human cancer cells. *BMC Proceedings*, 6(S3). <https://doi.org/10.1186/1753-6561-6-s3-p4>

Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., & Seino, S. (1990). Molecular Biology of Mammalian Glucose Transporters. *Diabetes Care*, 13(3), 198–208. <https://doi.org/10.2337/diacare.13.3.198>

Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., ... & Carrillo, M. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2), 76-86. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642007000200002&lng=es&tlng=es.

Björnholm, M., & Zierath, J. (2005). Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochemical Society Transactions*, 33(2), 354–357. <https://doi.org/10.1042/bst0330354>

Borges-Araújo, L., & Fernandes, F. (2020). Structure and Lateral Organization of Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Molecules*, 25(17), 3885. <https://doi.org/10.3390/molecules25173885>

Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4), 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrm782>

Burgos, A. P., & Alamilla, J. (2010). El fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato y sus acciones sobre los canales iónicos. *Revista Biomédica*, 21(2), 97-107. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v21i2.123>

Calvo, M. B., Figueroa, A., Pulido, E. G., Campelo, R. G., & Aparicio, L. A. (2010). Potential Role of Sugar Transporters in Cancer and Their Relationship with Anticancer Therapy. *International Journal of Endocrinology*, 2010, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2010/205357>

Castrejón, V., Carbó, R., & Martínez, M. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(2), 49-57. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2007/reb072b.pdf>

Chavez, J., & Summers, S. (2012). A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 15(5), 585–594. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.002>

Chen, L., Shu, Y., Liang, X., Chen, E. C., Yee, S. W., Zur, A. A., Li, S., Xu, L., Keshari, K. R., Lin, M. J., Chien, H. C., Zhang, Y., Morrissey, K. M., Liu, J., Ostrem, J., Younger, N. S., Kurhanewicz, J., Shokat, K. M., Ashrafi, K., & Giacomini, K. M. (2014). OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9983–9988. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314939111>

Chen, Y., Li, S., Brown, C., Cheatham, S., Castro, R. A., Leabman, M. K., Urban, T. J., Chen, L., Yee, S. W., Choi, J. H., Huang, Y., Brett, C. M., Burchard, E. G., & Giacomini, K. M. (2009). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 2 on the renal elimination of metformin. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(7), 497–504. <https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e32832cc7e9>

Cheung, A. Y., & de Vries, S. C. (2008). Membrane Trafficking: Intracellular Highways and Country Roads. *Plant Physiology*, 147(4), 1451–1453. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900266>

Clínica Universidad de Navarra. (s. f.). Diccionario médico. Recuperado 20 de agosto de 2021, de <https://www.cun.es/diccionario-medico>

Corona-Ortega, T., Rangel-Corona, R., Hernández-Jiménez, M., Baeza, I., Ibáñez, M., & Weiss-Steider, B. (2009). Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on their external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. *Journal of Drug Targeting*, 17(7), 496–501. <https://doi.org/10.1080/10611860903012810>

Corona-Ortega, T., Valle-Mendiola, A., Rangel-Corona, R., del Valle, A. G., Aguilar-Santelises, L., & Weiss-Steider, B. (2019). Cell proliferation and CD16 expression induced by liposomes containing PI (4, 5) P². *FarmaJournal*, 4(1), 262-263. <https://www.proquest.com/openview/9dd4502323d09f9309c0cb0897fe0b64/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2044559>

DeFronzo R. A. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *The Netherlands journal of medicine*, 50(5), 191–197. [https://doi.org/10.1016/s0300-2977\(97\)00012-0](https://doi.org/10.1016/s0300-2977(97)00012-0)

de Jesús Sandoval-Muñiz, R., Vargas-Guerrero, B., Flores-Alvarado, L. J., & Gurrola-Díaz, C. M. (2016). Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gac Med Mex*, 152, 547-57. <https://biblat.unam.mx/es/revista/gaceta-medica-de-mexico/articulo/glucotransportadores-glut-aspectos-clinicos-moleculares-y-geneticos>

de Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., & Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 96(5), 2489–2495. <https://doi.org/10.1172/jci118308>

DeGorter, M., Xia, C., Yang, J., & Kim, R. (2012). Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529>

Deo DD, Bazan NG, Hunt JD. (2004) Lipid Second Messengers and Receptors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 3: 182-187. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00825-8>

Despopoulos A. (2003) *Color Atlas of Physiology*. 5th ed. Germany: Thieme.

Deykin, D., Balko, C., & Isselbacher, K. J. (1972). Sugar and Amino Acid Transport by Cells in Culture — Differences between Normal and Malignant Cells. *New England Journal of Medicine*, 286(17), 929–933. <https://doi.org/10.1056/nejm197204272861707>

Doughman, R. L., Firestone, A. J., & Anderson, R. A. (2003). Phosphatidylinositol Phosphate Kinases Put PI4,5P₂ in Its Place. *Journal of Membrane Biology*, 194(2), 77–89. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-2027-7>

Downes, C. P., Gray, A., & Lucocq, J. M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends in Cell Biology*, 15(5), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.008>

Emami Riedmaier, A., Nies, A. T., Schaeffeler, E., & Schwab, M. (2012). Organic Anion Transporters and Their Implications in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 421–449. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004614>

Eyster, K. M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Advances in Physiology Education*, 31(1), 5–16. <https://doi.org/10.1152/advan.00088.2006>

Foley, K. P., & Klip, A. (2014). Dynamic GLUT4 sorting through a syntaxin-6 compartment in muscle cells is derailed by insulin resistance-causing ceramide. *Biology Open*, 3(5), 314–325. <https://doi.org/10.1242/bio.20147898>

Fredriksson, R., Nordström, K. J., Stephansson, O., Hägglund, M. G., & Schiöth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic

classification reveals four major families. *FEBS Letters*, 582(27), 3811–3816.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.016>

Gonzalez, L., & Scheller, R. H. (1999). Regulation of Membrane Trafficking. *Cell*, 96(6), 755–758. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80585-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80585-1)

Graham, M. M., Spence, A. M., Muzi, M., & Abbott, G. L. (1989). Deoxyglucose Kinetics in a Rat Brain Tumor. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 9(3), 315–322. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1989.49>

Grunberger, G., & Zick, Y. (Eds.). (2002). *Insulin Signaling: From Cultured Cells to Animal Models*. CRC Press.

Holzner, G. (1994). RHEOLOGICAL PROPERTIES OF COSMETICS AND TOILETRIES (Cosmetic Science and Technology Series No. 13), edited by Dennis Laba, Marcel Dekker, New York, 1993. No of pages: 440, price US\$165.00. ISBN 0–8247–9090–1. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(3), 143–144. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730090311>

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H., Moley, J. F., Mueckler, M., Rogers, S., Schürmann, A., Seino, S., & Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 282(4), E974-E976. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00407.2001>

Kim, J. W., & Dang, C. V. (2006). Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect: Figure 1. *Cancer Research*, 66(18), 8927–8930. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-1501>

Klip, A., McGraw, T. E., & James, D. E. (2019). Thirty sweet years of GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 294(30), 11369–11381. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.008351>

Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier Science Limited.

Liang, Y., Li, S., & Chen, L. (2015). The physiological role of drug transporters. *Protein & Cell*, 6(5), 334–350. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0148-2>

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., & Giacomini, K. M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8), 543–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>

Martin T. F. (2012). Role of PI(4,5)P(2) in vesicle exocytosis and membrane fusion. *Sub-cellular biochemistry*, 59, 111–130. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3015-1_4

Mayinger, P. (2012). Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(8), 1104–1113. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.01.002>

Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2017). Atlas de histología animal y vegetal. Tejidos vegetales: Conducción. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. 14pp.

Mendez, L. E., Mancini, N., Cantuaria, G., Gomez-Marin, O., Penalver, M., Braunschweiger, P., & Nadji, M. (2002). Expression of Glucose Transporter-1 in Cervical Cancer and Its Precursors. *Gynecologic Oncology*, 86(2), 138–143. <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6745>

Meza, U., Romero-Méndez, A. C., Licón, Y., & Sánchez-Armáss, S. (2010). La membrana plasmática: modelos, balsas y señalización. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(4), 125-134. <https://www.redalyc.org/pdf/490/49016036004.pdf>

Michell, R. (1979). Inositol phospholipids in membrane function. *Trends in Biochemical Sciences*, 4(6), 128–131. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(79\)90443-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(79)90443-2)

Neverisky, D. L., & Abbott, G. W. (2016). Ion channel–transporter interactions. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 51(4), 257–267. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172553>

Olvera-Granados, Claudia Patricia, Leo-Amador, Guillermo Enrique, & Hernández-Montiel, Hebert Luis. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 65(4), 306-324. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462008000400009&lng=es&tlng=es.

Osborne, N. N., Tobin, A. B., & Ghazi, H. (1988). Role of inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction processes: An essay. *Neurochemical Research*, 13(3), 177–191. <https://doi.org/10.1007/bf00971531>

Paul, R., Johansson, R., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Söderström, K. O., & Kangas, L. (1985). Tumor localization with ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Comparative autoradiography, glucose 6-phosphatase histochemistry, and histology of renally implanted sarcoma of the rat. *Research In Experimental Medicine*, 185(2), 87–94. <https://doi.org/10.1007/bf01854893>

Rangel-Corona, R., Soto-Vázquez, R., Weiss-Steider, B., Alegre, M. E. G., & Corona-Ortega, M. T. (2014). Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 80 (1), 179-191. https://analesranf.com/wp-content/uploads/2014/80_01/8001_08.pdf

Raquel Parada Puig. Fosfatidilinositol: estructura, formación, funciones. Liferder. Recuperado 10 de junio de 2021, de <https://www.liferder.com/fosfatidilinositol/>.

Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1), 9-18. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49011452003>

Schink, K. O., Tan, K. W., & Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 143–171. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125349>

Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(4), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.09.007>

Slingerland M, Guchelaar H., Gelderblom H. (2012), Liposomal Drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today* 17(3-4):160-166. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.01526>.

Smyth, S., & Heron, A. (2006). Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine*, 12(1), 75–80. <https://doi.org/10.1038/nm0106-75>

Song, W., Luo, Q., Zhang, Y., Zhou, L., Liu, Y., Ma, Z., Guo, J., Huang, Y., Cheng, L., Meng, Z., Li, Z., Zhang, B., Li, S., Yee, S. W., Fan, H., Li, P., Giacomini, K. M., & Chen, L. (2019). Organic cation transporter 3 (Oct3) is a distinct catecholamines clearance route in adipocytes mediating the beiging of white adipose tissue. *PLOS Biology*, 17(1), e2006571. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006571>

Sun, Y., Thapa, N., Hedman, A. C., & Anderson, R. A. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: Targeted production and signaling. *BioEssays*, 35(6), 513–522. <https://doi.org/10.1002/bies.201200171>

Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(2), E141-E145. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>

Torelló, M., Clerch, A. V., & del Pozo, A. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm: farmacia y sociedad*, 21(9), 188-190.

Uldry, M., & Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 480–489. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1085-0>

Vicinanza, M., D'Angelo, G., di Campli, A., & de Matteis, M. A. (2008). Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *The EMBO Journal*, 27(19), 2457–2470. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.169>

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Weissig, V. (2010). *Liposomes: Methods and protocols* Ed. 6 (Vol. 606). Humana Press.

Wensel, T. G. (2020). Phosphoinositides in Retinal Function and Disease. *Cells*, 9(4), 866. <https://doi.org/10.3390/cells9040866>

Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89(1), 3–9. <https://doi.org/10.1079/bjn2002763>

.