

BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE FISOLOGÍA



LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA

**“BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR
RBP-4 EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

PRESENTA

M.C. RAFAEL TORRES MONTIEL

DIRECTOR DE TESIS

D.C. EDUARDO MONJARAZ GUZMAN.

JULIO 2016

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BCA Método de cuantificación de proteínas basado en el uso de “Ácido Bicinconinico”

Ci “Curies”, unidades de magnitud de radioactividad

DAG Diacilglicerol

DM2 Diabetes mellitus tipo 2

FITC Isotiocianato de Fluoresceína, por sus siglas en inglés

IL-6 Interleucina 6

IRS-1 Proteína sustrato del receptor a insulina, por sus siglas en inglés

IR Receptor a Insulina, por sus siglas en inglés.

JAK/STAT “Cinasa Janus/Proteína traductora y activadora de la transcripción”, por sus siglas en inglés

NF-κB Factor nuclear κ B, por sus siglas en inglés

OMS Organización Mundial de la Salud

PIP2 Fosfoinositos difosfato, por sus siglas en inglés

PIP3 Fosfoinositol trifosfato, por sus siglas en inglés

RBP-4 Proteína transportadora de retinol tipo 4

RI Resistencia a Insulina

SOCS-3 Proteína supresora de la señal de citocinas 3, por sus siglas en inglés

STRA6 Receptor estimulado por ácido retinoico, por sus siglas en inglés

TLR-4 Receptor tipo *Toll* 4, por sus siglas en inglés

TNF-α Factor de Necrosis Tumoral α

INDICE	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBESIDAD.....	2
TEJIDO ADIPOSO.....	3
PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE RETINOL TIPO 4 (RBP-4).....	6
Aspectos moleculares.....	6
Receptor STRA6.....	6
Aspectos funcionales.....	7
RESISTENCIA A LA INSULINA.....	8
DIABETES.....	9
RESISTENCIA A LA INSULINA EN MÚSCULO.....	12
Cascada de señalización activada por insulina en músculo esquelético.....	12
Mecanismos implicados en la inhibición de la transducción de señal de la insulina.....	14
Resistencia a la insulina provocada por la acumulación atípica de ácidos grasos en músculo esquelético.....	16
RBP-4 Y SU RELACION CON LA RESITENCIA A LA INSULINA.....	17
TLR-4 Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A INSULINA.....	22
CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.....	23
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	23
Interleucina -6 (IL-6).....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
METODOLOGIA.....	32
CULTIVO CELULAR.....	32
ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE 2 –DEOXI(³ H) GLUCOSA.....	33
ENSAYO DE RT-PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA - REACCIÓN EN CADENA LA POLIMERASA).....	34
Extracción de RNA total.....	34
Síntesis de ADNc (RT).....	35
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35

Separación electroforética de los productos de PCR.....	36
INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	36
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	37
INMUNOFLUORESCENCIA.....	37
TINCIÓN DE ROJO OLEOSO.....	38
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67

RESUMEN

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que es un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina (RI), condición que precede a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El adipocito tiene la capacidad de secretar a la circulación general a la proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP-4), el cual está relacionado positivamente con la RI y DM2, según los resultados de diversos estudios clínicos y epidemiológicos.

Estudios *in vitro* muestran que el RBP-4 es capaz de inducir RI en miocitos esqueléticos, desconociéndose a detalle el mecanismo involucrado, por lo que el objetivo general del presente trabajo es determinar las bases moleculares de la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 en miotubos esqueléticos L6. Al igual que otros grupos de investigadores, se considerará la incorporación de 2-deoxi-(³H)-glucosa (2DG-³H) estimulada por insulina como un indicador de la RI en nuestro modelo celular. La presencia de RBP-4 reduce de manera significativa la incorporación de 2DG-³H, siendo este efecto dependiente de la concentración, así como de la duración del tratamiento. Además de este efecto, el RBP-4 disminuye el nivel de expresión del receptor a insulina e incrementa la expresión del transportador GLUT-4, la citocina IL-6, la proteína SOCS-3 y la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los miotubos esqueléticos. La IL-6, por sí misma es capaz de inducir resistencia a la insulina en las células L6.

Los miotubos L6 expresan dos tipos de receptores de membrana capaces de unir de manera específica el RBP-4, STRA6 y TLR-4, el uso de C34 y LPS (antagonista y agonista de la proteína TLR-4, respectivamente), dejan en evidencia que el efecto del RBP-4 sobre la RI en los miotubos L6 es mediada por la activación de TLR-4.

Este trabajo muestra por vez primera que la RI inducida por RBP-4 en miocitos esqueléticos requiere de la activación de TLR-4, un receptor característico de las células del sistema inmune, y la producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-6.

INTRODUCCIÓN

OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad crónica y multifactorial que presenta un componente de inflamación sistémica que va de leve hasta moderada. Su incidencia está en un constante aumento desde el siglo pasado, convirtiéndose en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, alcanzando una alta prevalencia en la población adulta, juvenil e infantil, tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Cummings et al, 2003; Flegal et al, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha llegado a definir como la epidemia del siglo XXI. México y Estados Unidos tienen el mayor índice de obesidad mundial en adultos, comparados con países como Corea y Japón. Además, nuestro país ocupa el cuarto lugar en obesidad infantil y el décimo en diabetes mellitus, de la cual se ha estimado que para el año 2030 tendrá el séptimo lugar.

El origen multifactorial de la obesidad involucra la participación de factores genéticos, sociales y ambientales, incluyendo estilos de vida, así como condiciones socio-económicas. Este padecimiento se caracteriza por una acumulación excesiva de grasa corporal en los individuos, causado por un balance positivo de energía, que ocurre cuando la ingestión de energía de los alimentos excede al gasto energético (Seedo et al, 2000; Hager et al, 2003; Esteve et al, 2009).

La obesidad se define en función del índice de masa corporal (IMC), que estima el exceso de peso para una determinada altura. Resulta del cociente entre el peso en kilogramos (Kg) y la estatura de la persona expresada en metros elevada al cuadrado (m^2) ($IMC = \text{peso (Kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$). Se considera una persona obesa cuando su IMC es superior a 30 Kg/m^2 , con sobrepeso cuando se halla entre 25 y 29.9 kg/m^2 , y con peso normal cuando va de 18 a 24.9 kg/m^2 (OMS, 2012).

La obesidad es considerada uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades crónico-degenerativas, tales como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemia, enfermedades cardiovasculares (especialmente la cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales), enfermedades osteoarticulares, ciertos tipos de cáncer como el de mama, próstata y colon, apnea del sueño y varias otras enfermedades (Astrup et al, 2008; Clark et al., 2000; Haslam et al, 2005;

Dandona et al, 2005; Pi-Sunyer et al, 1993, Felber et al, 2002; Petersen et al, 2006; Kumashiro et al, 2011). De hecho, se estima que las personas con obesidad presentan un incremento de mortalidad asociada a enfermedades no transmisibles con respecto a las personas con peso normal (OMS, 2012). Datos epidemiológicos muestran que el 44% de la mortalidad por diabetes está asociada con la obesidad, el 23% con cardiopatías isquémicas, mientras que el 41% se relaciona con diferentes tipos de cáncer (OMS, 2008). Los costos económicos directos e indirectos de la obesidad y sus enfermedades asociadas, aumentan de manera drástica la demanda de servicios de salud, lo cual impone la necesidad urgente de conocer a detalle las bases moleculares responsables de su origen y desarrollo para de esta manera diseñar estrategias de prevención y control.

En México, el costo económico total de la obesidad y sus patologías asociadas para el año 2008 fue de 67,000 millones de pesos. Se estima para 2017 este problema ocasionará un costo total de 156,000 millones de pesos, en caso que siga la misma tendencia de aumento en la prevalencia de obesidad. Estos datos económicos dejan en claro que la obesidad no sólo tiene efectos adversos en la salud, sino en el desarrollo económico y social de los mexicanos (ENSANUT, 2012).

TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo, denominado también tejido graso, se divide tradicionalmente en tejido adiposo blanco y pardo, ambos con distintas características histológicas y funcionales. El tejido adiposo blanco tiene la función de acumular energía, en forma de triglicéridos, y liberar rápidamente ácidos grasos libres cuando esta energía es necesaria, además de la liberación de hormonas y citocinas que modulan el metabolismo corporal (Wolf et al, 2007). La principal función del tejido adiposo pardo es la producción de calor, participando así en la regulación térmica del organismo. Éste tejido es rico en mitocondrias y muy vascularizado (lo que le da su coloración oscura), y a diferencia del tejido adiposo blanco, presenta la proteína desacoplante 1 (UCP1) que desacopla la respiración mitocondrial generando energía como calor. El balance entre las áreas blancas y pardas puede modificarse en respuesta a distintos factores, tales como el frío, el calor, la obesidad, la edad, entre otros (Moreno & Martínez, 2002). El 80 % del

tejido adiposo corporal se distribuye a nivel subcutáneo, el 10 % a nivel visceral y el 10% restante a nivel perigonadal, perirrenal y retroperitoneal (Bays et al, 2004).

El adipocito representa la unidad básica del tejido adiposo, constituyendo entre uno y dos tercios del mismo (Moreno & Martínez, 2002; Valenzuela A, 2004). El resto del tejido está formado por células sanguíneas, endoteliales y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos, aunque también aparecen pre-adipocitos, células mesenquimales probablemente diferenciadas y células grasas muy pequeñas (Moreno & Martínez, 2002). El adipocito tiene su origen a partir de células precursoras o pre-adipocitos, las cuales, bajo el estímulo de numerosas hormonas, citocinas, factores de crecimiento y nutrientes, inician un proceso de diferenciación morfológica y funcional, hasta convertirse en un adipocito maduro, lo que se conoce como adipogénesis, proceso que está presente durante toda la vida (Valenzuela, 2004; Godínez et al, 2002).

Durante muchas décadas se consideró al tejido adiposo como un depósito inerte de triglicéridos, reconociendo como única función del adipocito, la de participar en la regulación de la utilización de estas reservas energéticas por el organismo, vía lipogénesis y lipólisis (formación y rompimiento de moléculas de triglicéridos, respectivamente). La identificación, en tejido adiposo, de la lipoproteína lipasa (enzima que hidroliza los triglicéridos) y posteriormente de la adiposina (proteína del complemento), fueron los primeros hallazgos que confirmaban que el tejido adiposo no cumple un mero papel de depósito energético. Posteriormente, la descripción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y fundamentalmente de la leptina (Friedman JM, 1994; Halass et al, 1995), han modificado definitivamente la concepción actual del tejido adiposo, considerándolo un tejido endocrino activo que juega un papel importante en la homeostasis energética y en otros procesos fisiológicos (Trayhurn, 2005; Lago et al, 2007).

En años recientes, se ha reconocido que el adipocito secreta varias moléculas bioactivas llamadas adipocinas o adipocitocinas, que tienen un papel regulatorio en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen: la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, la remodelación de la vascularización, la regulación

de la presión arterial y la coagulación (Bays et al., 2004). Su diversidad hasta la fecha es amplia, diferenciándose enzimas, hormonas, proteínas transportadoras, factores de crecimiento y proteínas estructurales (Kershaw & Flier, 2004; Oushi et al, 2011; Rosouli & Kern, 2008).

Se ha aceptado que los individuos con obesidad, presentan un proceso inflamatorio crónico que va de leve a moderado, inducido por la secreción de adipocinas pro-inflamatorias (Wellen & Hotamisligil, 2003), entre las que podemos mencionar están la proteína C-reactiva, Interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), leptina, resistina, RBP-4 y lipocalina 2 (Coppack, 2005). El proceso inflamatorio que desencadenan estas moléculas, y la acción de éstas en otros tejidos periféricos (músculo esquelético, hígado y páncreas) están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina (RI), la cual es una condición que precede a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Corpelejin et al, 2008, Oushi et al, 2011; Zierath et al, 2000). La acumulación de tejido adiposo, especialmente en la región visceral, representa un alto riesgo para el desarrollo de RI en músculo esquelético e hígado, con su eventual tránsito hacia la DM2. Los pacientes obesos se caracterizan por presentar una disfunción endocrina de su tejido adiposo, además de dislipidemia (Bray & Bellanger, 2006). El tejido adiposo y el músculo esquelético proveniente de pacientes obesos presentan RI, (Brozinick et al., 2003), disfunción que es adquirida en la condición de obesidad, ya que los miocitos esqueléticos provenientes de pacientes obesos con RI, al ser mantenidos aislados y en cultivo, recuperan su capacidad de responder a la presencia de insulina (Pender et al., 2005), sugiriendo que es necesario la presencia de por lo menos un factor inductor de dicha condición. La proteína transportadora de retinol tipo 4 (RBP-4) se ha asociado muy recientemente en estudios clínicos con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Graham et al, 2006; Farjo et al, 2012).

PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE RETINOL TIPO 4 (RBP-4)

Aspectos moleculares

RBP-4 es un polipéptido de 21,000 Da, codificado en el cromosoma humano 10q 23-24, sus niveles plasmáticos oscilan entre 40 - 60 µg/ml, siendo posiblemente más elevados en los hombres. Su estructura genética fue descrita por primera vez en el hepatocito, e incluye 6 exones relativamente cortos y 5 intrones. Los mismos autores identificaron al menos 3 regiones reguladoras de la expresión. Estas regiones incluían 2 promotores de la expresión no específicos (ya que regulaban la expresión de otras proteínas) y un represor de la expresión. Su estructura primaria madura se compone de 182 aminoácidos formando 8 cadenas β dispuestas de un modo antiparalelo unidas entre sí por puentes de hidrógeno y 2 cadenas α. En su estructura secundaria, el extremo amino terminal de la proteína le hace adoptar una forma de cúpula y la presencia de una serie de aminoácidos bastante constante le confiere un dominio hidrofóbico al interior de la estructura, lo que permite alojar en su interior al trans-retinol. La conformación terciaria se estabiliza mediante puentes disulfuro, adoptando una morfología de cilindro octogonal con forma de cáliz que da nombre a una superfamilia de lipoproteínas, las lipocalinas (Sundelin et al, 1985; Kawagushi et al, 2008).

Las lipocalinas son unas proteínas ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como vegetal, cuya característica fundamental es la de transportar y distribuir pequeñas moléculas hidrofóbicas. Juegan un importante papel en diferentes procesos inmunológicos y del desarrollo, estando también implicadas en las reacciones del organismo a situaciones de estrés y en la transducción de señales (Kawagushi et al, 2015).

Receptor STRA6

A mediados de la década de los 70's, se propuso por vez primera la existencia de un receptor de membrana para RBP-4 (Kawaguchi et al., 2015). Empleando espectrometría de masas, este receptor fue

identificado como STRA6, una proteína multitransmembranal (Kawaguchi et al., 2007; Wolf G, 2007), que posee 668 aminoácidos, distribuidos en 9 segmentos transmembranales, 5 dominios extracelulares y 4 dominios intracelulares, con un extremo carboxilo terminal intracelular de gran longitud, aproximadamente 176 aminoácidos, que muy probablemente sea sitio de regulación por otras proteínas. Se ha propuesto que el sitio de unión del RBP-4 con STRA6 ocurre en el segmento extracelular que conecta el dominio VI con el dominio 7 (Kawaguchi et al., 2008).

Aspectos funcionales

Los esterios de retinol una vez que son absorbidos a nivel intestinal, son transportados en quilomicrones hacia el hígado, principal tejido productor de RBP-4, aunque también puede ser producido por otros tejidos y órganos, tales como el tejido adiposo, los riñones, los pulmones, el corazón, el músculo esquelético, el bazo, las células de Sertoli del testículo, los plexos coroideos del cerebro y la retina. La secreción de RBP-4 está relacionada positivamente con la disponibilidad de retinol. En ausencia de éste, se inhibe la secreción de RBP4, acumulándose la proteína en el retículo endoplasmático. En presencia de retinol, el RBP-4 se une a él en el aparato de Golgi, y es segregado como holo-RBP-4 (RBP4 con retinol), encontrándose generalmente de esta manera en plasma, aunque también puede encontrarse RBP-4 libre (apo-RBP-4). En ambas situaciones, el RBP-4 circula unido a dos moléculas de transtirretina (TTR), resultando una molécula final de 80,000 Da. El mayor tamaño protege al RBP-4 de su filtración renal y su extravasación al espacio intercelular (Blomhof, 2006; Kotnik et al, 2011; Berry et al, 2011).

La liberación del retinol al citosol celular, dado su carácter lipídico, podría realizarse por difusión pasiva a través de la membrana celular. De hecho en la mayoría de las células, la concentración de retinol plasmático y citosólico son muy parecidos. Recientemente se ha sido descrito que el RBP-4 puede unirse a un receptor de membrana, el cual fue identificado como el primer receptor específico de RBP-4 en humanos y se denominó STRA6 (Blomhoff et al, 2006).

La función transportadora de retinol ha sido clásicamente la única reconocida para el RBP-4. No obstante, estudios recientes han mostrado la importancia clínica se ha sugerido un papel metabólico del RBP-4 más allá de la distribución de retinol, relacionándolo con la resistencia a la insulina y la obesidad (Janke et al, 2006; Graham et al, 2006)

RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se define como el fallo del organismo a responder normalmente a la insulina. En situaciones normales, tras una ingesta de alimentos los niveles de glucosa en plasma se incrementan. Este aumento en los niveles de glucosa es detectado por las células β del páncreas que proceden a la secreción de insulina con el fin de mantener los niveles de glucosa constantes. La insulina secretada por el páncreas ejerce las siguientes funciones en los tejidos periféricos: 1) estimula la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, 2) inhibe la producción hepática de glucosa, e 3) inhibe la hidrólisis de las grasas del tejido adiposo y estimula la captación de glucosa en el mismo tejido. Todas estas acciones concertadas por la insulina tienen como resultado una reducción en los niveles plasmáticos de glucosa. La célula- β del páncreas tiene la capacidad de adaptarse a cambios en la sensibilidad a la insulina en el resto del organismo. Es decir, tras una pequeña pérdida de sensibilidad a la insulina, la célula- β secretará más insulina y viceversa (Ginsberg et al, 2000; Copperlejin et al, 2009).

La resistencia a la insulina es un estado comúnmente asociado a la obesidad. Estudios realizados tanto en animales como humanos demuestran que la ganancia o pérdida de peso se correlaciona respectivamente con una peor o mejor sensibilidad a la insulina (Freidenberg et al., 1988). Se han propuesto varios factores que podrían relacionar la obesidad con la resistencia a la insulina. Entre los candidatos están los ácidos grasos libres, el TNF- α , la leptina, la angiotensina y el RBP-4, todos ellos secretados por el tejido adiposo (Coppack et al, 2005).

La resistencia a la insulina está también ligada a la edad, a un estilo sedentario de vida o incluso a una predisposición genética, y es la responsable en gran medida de la aparición de la DM2. Esta conclusión se basa en: 1) estudios que demuestran la presencia de resistencia a la insulina en pacientes

con DM2 (Lillioja et al., 1993); 2) la presencia de resistencia a la insulina en la descendencia no diabética de pacientes con DM2 (Warram et al, 1990); 3) estudios que demuestran la utilidad de la resistencia a la insulina como un marcador para predecir una futura DM2 (Lillioja et al., 1993); y 4) el uso de agentes sensibilizadores a la insulina para la prevención de la DM2 (Buchanan et al, 2002).

La definición inicial de resistencia a la insulina se refería siempre en términos del metabolismo de la glucosa, sin embargo, en la última década se ha observado la participación del metabolismo de lípidos, cambiando el enfoque “glucocéntrico” tradicional a un enfoque “lipocéntrico”. Esta hipótesis sostiene que anomalías en el metabolismo de ácidos grasos pueden resultar en una acumulación atípica de lípidos en músculo, hígado y célula β pancreáticas (McGarry et al., 2002), conduciendo a una condición de resistencia a la insulina, debido a la producción de especies lipotóxicas, tales como diacilglicerol (DAG) y ceramidas, que desacoplan la vía de señalización activada por insulina (Unger & Orci, 2000). La acumulación de lípidos en miocitos y hepatocitos está fuertemente correlacionada con el grado de resistencia a la insulina que presentan los sujetos diabéticos (Boden & Shulman 2002), sujetos con antecedentes familiares con DM2, individuos con intolerancia a la glucosa e individuos obesos (Jacob et al, 1999). La desregulación del metabolismo de los lípidos juega un papel fundamental en la aparición de la resistencia a la insulina.

DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es un proceso crónico y progresivo constituido por un grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar un incremento de la concentración de glucemia plasmática como resultado de alteraciones en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambas. El resultado es la aparición de hiperglucemia, alteración de los lípidos y glicación de las proteínas. Existen varias modalidades diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y alternativas respecto al modo de vida (Diamond et al, 1992; Saltiel et al, 2001). El desorden de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos. La morbilidad de la DM tipo 2 (DM2) viene dada en primer

lugar, por las lesiones microvasculares como la retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, relacionadas íntimamente con los años de evolución de la enfermedad y control de glucemia. En segundo lugar, por las lesiones macrovasculares, por lo que los pacientes diabéticos tienen un riesgo más elevado de cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular (ACV) y enfermedad vascular periférica. Todas están relacionadas con una mayor mortalidad de los pacientes (Donnelly et al, 2000).

La obesidad y la diabetes tienen carácter de epidemia mundial y constituyen un problema de salud pública de primera magnitud. La estrecha relación entre la obesidad y la diabetes, así como sus complicaciones están ampliamente documentadas, teniendo claras implicaciones en el tratamiento de estos pacientes.

La prevalencia de obesidad y sobrepeso está en constante crecimiento. Se ha estimado un aumento medio del índice de masa corporal (IMC) de 0.4 kg/m² por década en los últimos 30 años (Finucane et al., 2011). En el mundo, de acuerdo al Global Burden of Disease Study, la proporción de adultos con un IMC de 25 kg/m² o más ha aumentado entre 1980 y 2013 pasando del 29 al 37% en varones, y del 30 al 38% en mujeres (Ng et al., 2014). Además de contribuir de forma importante a la carga de enfermedad coronaria y de algunos tumores, la obesidad y el sobrepeso son responsables del 44% de la carga de diabetes (OMS, 2014), constituyendo, por tanto, el principal factor de riesgo modificable de esta enfermedad. Los programas destinados a la reducción del sobrepeso o la obesidad, como el Diabetes Prevention Program Study o el Diabetes in Europe -Prevention Using Lifestyle, Physical Activity and Nutritional Intervention, han demostrado que la reducción del peso con modificaciones del estilo de vida se asocia a una reducción marcada del desarrollo de diabetes (Knowler et al, 2002; Costa et al, 2012), incluso superior a la obtenida con medidas farmacológicas (Knowler et al, 2002).

La diabetes mellitus tipo 2 o diabetes no dependiente de insulina es la forma más común, y afecta al 75-90% de los pacientes diabéticos. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una combinación de factores genéticos y ambientales que afectan la capacidad del organismo para responder a las acciones de la insulina. Los estadios iniciales de la enfermedad se caracterizan por una conjunción de anormalidades metabólicas y hormonales como resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperlipidemia,

hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa e hipertensión. Estos síntomas se denominan en su conjunto a menudo como síndrome X (Reaven GM, 1992).

La enfermedad es causada por dos factores: 1) la resistencia a la insulina, y 2) una función disminuida de la célula β del páncreas. La enfermedad se caracteriza por una disminución progresiva de la acción de la insulina, seguida de una incapacidad por parte de la célula β de compensar esta resistencia a las acciones de la hormona. Cronológica y metabólicamente la enfermedad podría seguir el siguiente curso (Saltiel AR, 2001): la resistencia a la insulina parece ser el efecto primario, debido a factores genéticos, a la edad, estilo sedentario de vida o a cambios metabólicos producidos por la obesidad. Esta resistencia a la insulina causa un fallo en la captación de glucosa estimulada por insulina en músculo esquelético, y en el tejido adiposo, aumenta la liberación de ácidos grasos. A su vez, estos ácidos grasos atenúan la capacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa en los hepatocitos, llegándose a una situación plasmática de hiperglucemia. Esta desregulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos acelera la progresión de la resistencia a la insulina. Normalmente la célula β del páncreas compensa el estado de resistencia a la insulina incrementando la secreción de insulina, llegando a un punto, donde la célula β pierde esta capacidad y deja de responder apropiadamente a las concentraciones de glucosa. Esto conduce a un deterioro de la homeostasis de la glucosa y a la aparición de la intolerancia a la glucosa. Por año, aproximadamente un 5-10% de los pacientes intolerantes a la glucosa progresan hacia diabetes, que continúan empeorando mientras la resistencia a la insulina incrementa, llegando a situaciones en las que requieren inyecciones de insulina para poder sobrevivir.

La DM2, a diferencia de la DM1, está fuertemente asociada a la obesidad (Nadler et al., 2000). Alrededor del 80% de los individuos con diabetes de tipo 2 son obesos, más concretamente con obesidad visceral central. Sin embargo, sólo el 10% de los individuos obesos son diabéticos. La DM2 está relacionada además con la disminución de los depósitos de grasa, reflejada en los niveles elevados de ácidos grasos y triglicéridos circulantes, junto con una acumulación atípica de grasa en tejidos periférico, principalmente en el músculo esquelético (Reaven GM, 1995).

RESISTENCIA A LA INSULINA EN MÚSCULO

El músculo esquelético en reposo es el responsable del 20% del metabolismo de glucosa, pero bajo condiciones de estimulación por insulina es el responsable del 80% de la captación de glucosa y más de un 80% de esta glucosa se acumula en forma de glucógeno. Por lo tanto, el músculo es el que más contribuye a la resistencia a la insulina en la DM2 (Ahmad et al, 19979. En pacientes diabéticos, la glucosa captada en respuesta a insulina es un 30-40% menor que en individuos no diabéticos, y un 90% de esta disminución es debida a la menor captación por tejidos periféricos, y entre ellos principalmente el músculo esquelético. Todo esto confiere al músculo esquelético una vital importancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina así como una posible blanco farmacológico para el tratamiento de la DM2 (Argilés et al, 2005).

Cascada de señalización activada por insulina en músculo esquelético

Los efectos de la insulina en el transporte de glucosa y otros eventos metabólicos en músculo esquelético están mediados por una cascada de señales intracelulares. La insulina inicia su acción uniéndose a su receptor. El receptor de la insulina pertenece a la familia de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa. El receptor de la insulina sin actividad funcional es una glucoproteína heterodimérica, que se compone de una subunidad α extracelular y una subunidad β transmembranal, unidas por puentes de disulfuro. La insulina se une a la subunidad α e induce un cambio conformacional que facilita la interacción con otro receptor heterodimérico de insulina, formándose un complejo heterotrimérico funcional. Esto conduce a una rápida autofosforilación de diferentes residuos de tirosina localizados en el dominio intracelular de la subunidad β . La fosforilación de la tirosina 960 (Tyr960) crea un sitio de reconocimiento para el dominio de unión a fosfotirosinas de los sustratos del receptor de la insulina o IRSs (White et al., 1988). Hasta el momento se han identificado 12 diferentes IRSs: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5, IRS-6, Gab-1, tres isoformas de Shc, p62dok y APS (proteína adaptadora que contiene un dominio PH y SH2) (White MF, 1988). IRS-1 fue la primera proteína de señalización descrita en la cascada de señalización activada por insulina, y se encarga de estimular el transporte de glucosa, la síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos, mitogénesis y expresión de genes. Además, IRS-1 contiene

entre 20-22 sitios de fosforilación en tirosinas y más de 30 lugares de fosforilación en serina o treonina (Sun et al, 1993). Los IRSs unidos al receptor de la insulina pueden ser fosforilados por éste en diversas tirosinas, generando sitios consenso para la interacción con otras proteínas, como es el caso de la PI3K. Esta es una proteína cinasa heterodimérica con una gran variedad de funciones celulares. La PI3K está compuesta por una subunidad reguladora (p85) que contiene dos dominios SH2 responsables de la unión al IRS y una subunidad catalítica (p110). Se han descrito hasta el momento ocho isoformas de la p85 codificadas por tres diferentes genes. La PI3K activa cataliza la fosforilación de los fosfoinositoles de la membrana plasmática para formar fosfoinositol-3-fosfato, especialmente fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (IP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) (Van der Kaay et al., 1997). Esta molécula es un segundo mensajero que activa a diversas proteínas, como la PDK o algunas isoformas de la PKC. La PDK es responsable de la activación de la Akt/PKB por fosforilación en las Ser473 y la Thr308 (Alessi et al., 1996). Existen tres isoformas de Akt/PKB: Akt1, Akt2 y Akt3, de expresión y distribución ubicua. Las isoformas Akt1 y Akt2 están involucradas en la transducción de la señal de la insulina en el tejido adiposo y muscular. La Akt activada dirige la señal de la insulina hacia el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno. El transporte basal de glucosa en la célula muscular depende del transportador GLUT-1, y en respuesta a insulina, el transporte de glucosa aumenta al facilitar la incorporación a la membrana plasmática del transportador de glucosa de alta afinidad GLUT-4 (Tordjman et al., 1989). La estimulación de la síntesis de glucógeno es llevada a cabo por la fosforilación e inactivación de la GSK-3 por parte de la Akt/PKB (Cross et al., 1995). Esta inhibición disminuye el nivel de fosforilación de la glucógeno sintasa (GS), aumentando su actividad. Por otro lado, la insulina es capaz también de activar la proteína fosfatasa 1 o PP1, que eliminará un grupo fosfato de la glucógeno sintasa aumentando su actividad (Brady et al., 1997).

Mecanismos implicados en la inhibición de la transducción de señal de la insulina

El control de la señalización inducida por insulina se autorregula por proteínas que inhiben los elementos de la cascada (desensibilización homóloga). Alternativamente, también pueden inhibir la señalización de la insulina mensajeros químicos provenientes de otras vías intracelulares que

aparentemente no están relacionadas (desensibilización heteróloga). El receptor de la insulina y los IRSs están sujetos a este complejo control. Un posible mecanismo de desensibilización es la fosforilación en los residuos de Ser/Thr de los IRSs, desacoplando estas moléculas de sus efectores. Esta fosforilación puede inducir la disociación de los IRSs del receptor de la insulina (Liu et al., 2001), dificultando la fosforilación en sus residuos de tirosina (Mothe & Van Obberghen, 1996), separar los de los complejos intracelulares que los mantienen en la proximidad del receptor de la insulina (Tirosh et al., 1999) o inducir su degradación (Pederson et al., 2001). Todas estas funciones son llevadas a cabo por proteínas cinasas de Ser/Thr. Un candidato potencial es la proteína mTOR, que induce la fosforilación de los residuos de serina en el extremo carboxilo terminal del IRS-1. Esta fosforilación inhibe la fosforilación en tirosina estimulada por insulina y la capacidad de IRS-1 de unir la PI3K (Li et al., 1999). Otro candidato es la PKC ζ , que fosforila a IRS-1 en la Ser318, inhibiendo su fosforilación en tirosinas (Moeschel et al., 2004). Otra cinasa involucrada en este proceso es la IKK β . Esta cinasa es parte del complejo IKK que fosforila al inhibidor del NF- κ B, el I κ B. Esta fosforilación provoca la degradación del I κ B, permitiendo la translocación del NF- κ B al núcleo. IKK β es un efector de la PKC ζ y además puede fosforilar directamente a IRS-1 en la Ser312 (Gao et al., 2002). Por último, otra cinasa que participa en la desensibilización de la señal de la insulina es la JNK (c-Jun-N-terminal kinase), que se activa por insulina y fosforila a IRS-1 en la Ser307 (Lee et al., 2003).

Bajo ciertas condiciones patológicas puede presentarse una desregulación en cualquiera de los diferentes elementos moleculares de la cascada de señalización de insulina, resultando en la aparición de la resistencia a la insulina. Los diferentes mecanismos que pueden explicar esta desregulación incluyen una condición inflamatoria crónica de leve a moderada, un aumento en los niveles plasmáticos de los ácidos grasos y el estrés celular. Estos tres mecanismos convergen en la activación de cinasas de Ser/Thr, posiblemente las mismas que están involucradas en el control fisiológico de la señalización de la insulina. Así por ejemplo, las citocinas pro-inflamatorias como el TNF α y la IL-6 son capaces de inducir la expresión de la proteína SOCS-3, la cual impide la unión del IRS-1 al receptor a insulina, el TNF α puede además, activar la proteína JNK, que fosforila IRS-1 en la Ser307, desacoplándolo del receptor de la insulina. La mayoría de los modelos animales de obesidad y los humanos obesos presentan altos niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias, considerándose incluso a la obesidad como una condición

inflamatoria crónica leve (Hotamisligil & Spiegelman, 1994). El segundo probable mecanismo, es que los ácidos grasos pueden activar a la PKC θ en músculo esquelético, un proceso que induce la fosforilación de la Ser307 del IRS-1, y la PKC α , que utiliza miembros de la familia de la MAPK para fosforilar a IRS-1 en la Ser612. Se ha propuesto que la fosforilación de esta serina en el IRS-1 inhibe la señalización de la insulina, sugiriendo un posible mecanismo de resistencia a la insulina (DeFea & Roth, 1997). Las proteínas fosfatasa de tirosina fosfatasa (PTPs) han sido también implicadas en la regulación de la cascada de señalización de la insulina. Los ratones knock-out para PTP-1B presentan un mayor nivel de fosforilación en las tirosinas de IRS-1 de músculo esquelético, así como una mayor sensibilidad a la insulina (Elchebly et al., 1999). En base a estos resultados, la inhibición de PTP-1B sería un buen tratamiento para la resistencia a la insulina. Sin embargo, se observó que el músculo esquelético proveniente de personas con DM2 expresaba bajos niveles de PTP-1B (Worm et al., 1996), mientras que en sujetos obesos no diabéticos, la expresión y la actividad de PTP-1B estaba aumentada (Ahmad et al., 1997), implicando probablemente una regulación diferente de la vía de señalización a la insulina en DM2 y obesidad. En resumen, bajo ciertas circunstancias, ya sea fisiológicas o patológicas, el balance fosforilación/desfosforilación de los diferentes elementos moleculares de la vía intracelular activada por insulina afecta la transducción de la señal, conduciendo a un estado de resistencia a la insulina.

Resistencia a la insulina provocada por la acumulación atípica de ácidos grasos en músculo esquelético

Desde hace más de tres décadas se postuló que la acumulación atípica de ácidos grasos en células musculares restringe tanto la captación como la utilización de la glucosa, debido a la inhibición de enzimas claves involucradas en la cascada de la vía oxidativa y no oxidativa de la glucosa. Diversas evidencias apoyan la propuesta de que la acumulación de ácidos grasos constituye un vínculo importante entre la obesidad, la resistencia a la insulina y la DM2.

Las moléculas participantes en el mecanismo de señalización de lípidos se derivan de los triglicéridos, como es el diacilglicerol y la ceramida, las cuales activan isoenzimas de la familia de la proteína cinasa C (PKC), las cuales fosforilan diferentes moléculas participantes en la vía de señalización de la insulina, por

ejemplo el IRS-1 y la proteína Akt/PKB. La fosforilación de estas proteínas influyen negativamente en la vía de señalización de insulina que estimula la incorporación de glucosa (Ginsberg, H.N. 2000, Schmitz-Peiffer C. 2000; Simons and Ehalt, 2002; Jornayvaz et al, 2010).

La relación directa funcional entre los adipocitos y los miocitos esqueléticos provenientes de humano, fue mostrada inicialmente por Dietze y colaboradores en el año 2002, dicho grupo realizó cultivos con ambos tipos celulares. La presencia de adipocitos en la misma placa de cultivo que los miocitos provocó en éstos últimos resistencia a la insulina, la cual fue determinada en función de una disminución en los niveles de fosforilación del sustrato del receptor a insulina (IRS) y de la proteína Akt, así como un decremento en la translocación del transportador de glucosa, GLUT-4, y en la recaptura de glucosa (Dietze et al., 2002; Dietze-Schroeder et al., 2005).

De las diversas proteínas secretadas por el adipocito, la RBP-4 es una de las más importantes, ya que participa en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos.

RBP-4 Y SU RELACION CON LA RESITENCIA A LA INSULINA

Desde hace más 30 años se ha reportado que personas diabéticas presentan elevados niveles plasmáticos y urinarios de RBP-4, sugiriendo la existencia una probable relación del RBP-4 con el desarrollo de esta enfermedad (Basualdo et al., 1997; Abahusain et al., 1999).

Una vez probada la expresión de RBP-4 en modelos animales y considerando las evidencias mencionadas, en las cuales se propone en los humanos la existencia de un correlato positivo entre el RBP-4 circulante con la DM2. Se publicaron dos trabajos que apoyan de manera significativa dicha correlación. En el primer trabajo, Abel y colaboradores plantearon la posibilidad de que en los roedores la expresión y secreción de adipocinas indujeran resistencia a la insulina sistémica (Abel et al., 2001).

Ellos desarrollaron un modelo experimental de ratón en el cual inhibieron de manera selectiva la expresión del transportador GLUT-4 en los adipocitos. Estos animales desarrollaron resistencia a la insulina tanto en músculo esquelético como en hígado. El mecanismo molecular involucrado era una disminución en los niveles de IP3 inducidos por la presencia de insulina. De hecho, la capacidad de respuesta de los miocitos y hepatocitos a la insulina se encontraba reducida. En resumen, la falta de expresión del transportador GLUT-4 y consecuentemente del transporte de glucosa en el adipocito podía causar resistencia a la insulina sistémica e incrementar el riesgo de padecer DM2. Se puede inferir que el adipocito actúa como un sensor de glucosa y modula su metabolismo mediante la liberación de adipocinas. En el segundo trabajo, Yang y colaboradores, identificaron al RBP-4 como un mensajero químico capaz de inducir resistencia a la insulina, por lo menos en los roedores (Yang et al., 2005). Ellos emplearon el mismo modelo de ratón experimental que el grupo de Kahn (2001), encontrando además de resistencia a la insulina en hígado y músculo, un incremento significativo en la expresión del ARNm que codifica para el RBP-4 en los adipocitos y en los niveles de proteína a nivel plasmático. Posteriormente, al tratar los animales con rosiglitazona, disminuían la expresión y los niveles plasmáticos de RBP-4, mejorando su sensibilidad a la insulina. Ante el escaso papel del adipocito en la regulación de los niveles de glucosa y la estrecha relación entre obesidad y resistencia a la insulina, plantearon la hipótesis de que el RBP-4 podía ser la molécula que, segregada por el adipocito, confiere resistencia a la insulina a nivel de músculo e hígado. Con esta hipótesis de trabajo, implementaron tres estrategias de trabajo con el fin de corroborarla: 1) desarrollaron un modelo de ratón que sobre-expresaba RBP-4, observando que generaban animales insulinoresistentes; 2) a ratones normales les administraban RBP-4 recombinante, generando igual que en el caso anterior, animales insulinoresistentes; y 3) a ratones con obesidad inducida que presentaban resistencia a la insulina, les administraron, de manera sistémica, fenretinide (análogo retinoide que aumenta la eliminación renal de RBP4), observando que se recuperaba de manera significativa la sensibilidad a la insulina.

Por último, Yang y colaboradores investigaron el mecanismo por el cual el RBP-4 provocaba resistencia a la insulina en hígado y músculo, encontrando que la sobreexpresión de RBP-4 en músculo reducía la fosforilación del receptor de la insulina, dificultando la activación de la cascada de señalización

y por ende la captación de glucosa estimulada por insulina. Por su parte, en el hígado promovía la expresión de la enzima fosfoenol piruvato carboxi cinasa, con la consecuente hiperglucemia.

De este modo en particular, y con las evidencias mostradas, Yang y colaboradores demostraban que el RBP-4 está implicado en el mecanismo por el cual se desarrolla resistencia a la insulina en roedores. Además, este fue el primer estudio en este campo que incluyó un pequeño grupo de humanos, en el que se hallaron niveles plasmáticos de RBP-4 mayores en obesos diabéticos que en obesos no diabéticos. La siguiente figura (Fig.1) ilustra el mecanismo de acción del RBP4 como adipocina propuesto por estos autores.

Posteriormente, el grupo de Graham publicó en el New England Journal of Medicine el primer estudio dirigido específicamente a analizar en humanos la relación del RBP-4 con la resistencia a la insulina y la obesidad (Graham et al., 2006). En este estudio, Graham y colaboradores determinaron los niveles circulantes de RBP-4 en 3 grupos poblacionales: sujetos delgados, sujetos obesos no diabéticos y sujetos obesos diabéticos, encontrando que los niveles plasmáticos de RBP-4 se correlacionaban positivamente con la magnitud de la resistencia a la insulina en los sujetos obesos no diabéticos, obesos diabéticos, intolerantes a la glucosa e incluso en sanos delgados pero con antecedentes familiares de DM2. También se correlacionaba con el IMC, el índice cintura cadera (ICC) y diferentes factores de riesgo cardiovascular como triglicéridos, y colesterol de lipoproteínas de alta densidad. En un segundo estudio, promovieron activamente el ejercicio físico en un subgrupo de pacientes, observando una disminución en los niveles circulantes de RBP-4 tan sólo en aquellos en los que existió un incremento en la sensibilidad a la insulina. La expresión de GLUT-4 en los adipocitos de estos pacientes se correlacionó negativamente con los niveles plasmáticos de RBP-4. En conclusión, este trabajo vincula estrechamente al RBP-4 con la resistencia a la insulina en humanos. En cambio, la coexistencia de una asociación positiva con la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo parece ser menos consistente dado que, a pesar de hallar relación entre IMC y el RBP-4, el RBP-4 era capaz de inducir resistencia a la insulina aún en sujetos delgados sanos.

Esta última observación es apoyada por otros trabajos ya publicados. Por ejemplo, Cho y colaboradores no pudieron establecer un correlato funcional entre el RBP-4 y la obesidad. El RBP-4 se correlacionó con los niveles de glucosa, insulina y el perímetro de cintura, pero no con el IMC o peso corporal, pero sí corroboraron la existencia de niveles plasmáticos elevados de RBP-4 en los diabéticos y los intolerantes a la glucosa con respecto a sujetos normotolerantes a la glucosa (Cho et al., 2006). Por su parte, Janke y colaboradores tampoco encontraron que el RBP-4 tuviera un papel importante en la condición de obesidad, pero sí demostraron que los adipocitos humanos tienen la capacidad de producir RBP-4 (Janke et al., 2006).

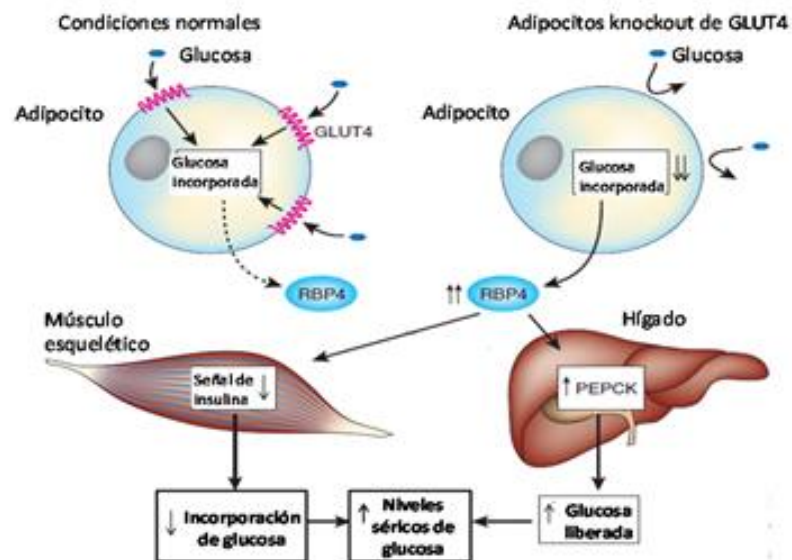


Figura 1. Papel del adipocito en la regulación del metabolismo de glucosa, a través de la producción de RBP-4. Modelo propuesto por Yang y cols, en donde demuestran que, en condiciones normales, el adipocito es capaz de expresar el transportador GLUT-4, y por lo tanto, responder al efecto de insulina, translocando a dicho transportador a la membrana plasmática, lo que incrementa su capacidad de incorporar glucosa para monitorear los niveles extracelulares de este carbohidrato. Un adipocito resistente a insulina muestra disminución en los niveles de expresión de Glut-4, lo que le impide responder al efecto de la insulina, ya que contiene pocos transportadores Glut-4, lo que disminuye su capacidad de incorporar glucosa, lo que es interpretado como una “falsa señal” de niveles bajos de glucosa extracelular, por lo que se incrementan los niveles de expresión y secreción de RBP-4, con la finalidad de desacoplar la señal de insulina en músculo esquelético, disminuyendo su capacidad de incorporación de glucosa, y en hígado aumentando la actividad metabólica que conlleva a la producción de glucosa, en consecuencia, se incrementan los niveles séricos de glucosa. *Modificado de Tamori Y et al, 2006.*

A pesar de las discrepancias encontradas acerca de la relación entre la obesidad, la sobreproducción de RBP-4 y el desarrollo de la resistencia a la insulina, se puede concluir que el RBP-4 es una nueva adipocina humana y que podría estar relacionada con la resistencia a la insulina en la DM2. De cualquier modo, estas nuevas perspectivas funcionales del RBP-4 han generado un intenso trabajo de investigación, ya que queda claro que el RBP-4 reduce la incorporación de glucosa estimulada por insulina en los miocitos esqueléticos, pero se desconoce el mecanismo molecular involucrado, cuyo conocimiento pudiera establecer blancos farmacológicos con el fin de retrasar o inhibir el desarrollo de resistencia a la insulina en personas con sobrepeso u obesas, y de esta manera reducir de manera significativa la incidencia de DM2 con todas sus implicaciones que la acompañan, desde el ámbito de la salud, social y económico.

Aún se desconoce el mecanismo molecular a través del cual el RBP-4 induce resistencia a la insulina, tanto en miocitos esqueléticos como hepatocitos. Se ha sugerido que la RI tiene un curso temporal diferente en cada uno de los tejidos periféricos, siendo en los adipocitos, el primer lugar en donde se presenta, en éstas células hay una disminución en la expresión y translocación del transportador GLUT-4, esto ocasiona una disminución en la capacidad de captación de glucosa, lo cual es percibido por los adipocitos como una “señal falsa” de que hay bajos niveles de glucosa en circulación, como respuesta a ésta “señal”, los adipocitos envían una señal a los tejidos blanco de la insulina (hígado y músculo esquelético), con la finalidad de reducir la incorporación de glucosa en los miocitos esqueléticos e incrementar la liberación de glucosa de los hepatocitos (glucogénesis), y de esta manera “mantener” en el rango fisiológico los niveles de glucosa en sangre. De esta propuesta, se sugiere al RBP-4 como el mensajero adipocitario responsable de la resistencia a la insulina que presentan los miocitos esqueléticos y hepatocitos (Wolf, 2007; Yoshilazu et al, 2006).

Experimentos *in vitro* realizados con adipocitos, muestran que la presencia de RBP-4 reduce la incorporación de glucosa estimulada por insulina. El receptor a insulina tiene acoplado en su región citoplasmática la proteína IRS-1, la cual en condiciones fisiológicas es fosforilada en sus residuos de treonina y serina, observándose que en presencia de RBP-4, el nivel de fosforilación a serina esta

disminuido, repercutiendo negativamente en la capacidad del adipocito para translocar el transportador GLUT-4 (Öst A et al, 2007).

El RBP-4 induce resistencia a la insulina en hepatocitos al unirse a su receptor específico, STRA6, activando una cascada de señalización JAK-STAT (Berry et al., 2011). Por su parte, Norseen y colaboradores, mostraron que el RBPA-4 es capaz de unirse al receptor TLR-4 de macrófagos induciendo un aumento en los niveles de expresión y secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF α y MCP-1), las cuales a su vez inducen resistencia a la insulina en adipocitos (Norseen et al, 2012).

TLR-4 Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A INSULINA

El TLR-4 es un receptor ubicado en la membrana plasmática de células inmunes, células del hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La activación de dicho receptor genera la respuesta inmune innata, mediante la inducción de cascadas de señalización que involucran la activación de proteínas cinasas y factores de transcripción, los cuales en su conjunto regulan positivamente la expresión de citocinas pro-inflamatorias, eicosanoides y especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales, las cuales pueden interrumpir la vía de señalización activada por insulina para la incorporación de glucosa a nivel del músculo esquelético (Kim J et al., 2010).

Trabajos previos reportan que la activación de TLR-4 es capaz de inhibir la acción estimulante de la insulina sobre la incorporación de glucosa, activando directamente la vía JNK (c-Jun N-terminal cinasa), p38 o por la formación de ROS que impiden la fosforilación de AKT, o indirectamente por causar la producción de citocinas pro-inflamatorias, que provocan la sobreproducción de SOCS-3, la cual interfiere con la actividad tirosina- cinasa del receptor a insulina (Kim J et al., 2010).

En biopsias obtenidas de músculo esquelético provenientes de sujetos obesos que presentan diabetes tipo II, se detectaron niveles elevados tanto del ARNm como de la proteína TLR-4, con respecto a sujetos no obesos (Reyna S et al., 2008). El TLR-4 puede ser activado por moléculas asociadas a

patógenos, entre la que se incluye el lipopolisacárido (LPS), componente estructural de la membrana externa de bacterias *gram-negativas*, que consta de tres partes: el lípido A, una cadena de oligosacáridos central, y un lado O (Raetz C et al., 2002).

Además, el receptor TLR-4 puede ser activado también por moléculas endógenas, tal es el caso de ácidos grasos saturados de cadena larga (FFA) (Fitzgerald K et al., 2004). Los adipocitos de la línea celular 3T3-L1 al ser incubados crónicamente en presencia de palmitato, presentan resistencia a la insulina, debido probablemente al incremento en los niveles de expresión de IL-6, efecto mediado por la activación del NF- κ B (Davis J et al., 2009). Esta evidencia, apoya la propuesta de que los FFA pueden inducir la resistencia a la insulina mediante la activación del receptor TLR-4 (Kopp A et al., 2010).

Los ratones *knock-out* para TLR-4 son incapaces de expresar citocinas pro-inflamatorias y no presentan resistencia a la insulina en tejidos como músculo esquelético y adiposo, cuando se les ha administrado sistémicamente LPS o FFA. Además, estudios *in vitro* muestran que el empleo de ARN de silenciamiento para TLR-4 reduce la producción de IL-6 y TNF- α en adipocitos expuestos a FFA (Raetzsch C et al., 2009).

CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina pro-inflamatoria implicada en la inflamación sistémica, participando en la reacción de fase aguda. El TNF- α es producido principalmente por la activación de los macrófagos, aunque puede ser sintetizado por otros tipos celulares, tales como linfocitos, adipocitos, miocitos e incluso neuronas (Abbas A et al., 2003). El LPS es uno de los principales inductores de la producción de TNF- α en los macrófagos, sintetizándose en forma de una proteína de membrana tipo II no glucosilada con un extremo amino intracelular y un extremo carboxilo extracelular largo. La forma activa de TNF- α se logra al ser escindido por una metaloproteinasa, liberando un péptido

de 17 kD, tres de estas cadenas polipeptídicas se polimerizan para formar la proteína TNF- α circulante de 51 kD en su forma activa (Bharat B et al., 2012).

Se han descrito dos receptores para TNF- α , el tipo I con una masa molecular de 55 kD (TNF-IR), y el tipo II con un peso de 75 kDa (TNF-IIR). El TNF- α induce al menos 5 tipos diferentes de señales intracelulares, que incluyen la activación del NF- κ B, vía de la apoptosis, activación de *ERK* (*extracellular-signal-regulated kinase*), p38 MAPK y de JNK (Aggarwal B et al., 2003).

La unión del TNF- α al receptor TNF-RII provoca la atracción de unas de las proteínas denominadas factores asociados al receptor TNF (TRAF 2) hacia el dominio citoplasmático del receptor, permitiendo el reclutamiento secuencial de otras moléculas como TRADD y la proteína RIP, las cuales promueven la activación de la cinasa TAK1, que a su vez activa el complejo IKK que fosforila la I κ B, provocando la liberación de la subunidad catalítica del NF- κ B, por su parte, el I κ B es ubiquitinizado y degradado por los proteosomas. Una vez activado el NF- κ B es translocado al núcleo y promueve la transcripción de genes que codifican para citocinas, quimiocinas, sintasa de óxido nítrico, principales moléculas mediadoras de la inflamación (Devin A et al., 2000).

El TNF- α es secretado por adipocitos maduros y producido también en gran parte por células del sistema inmune, principalmente en personas obesas. Por lo tanto, la síntesis de esta citocina es directamente proporcional al grado de adiposidad en las personas, asociándolo como factor inductor de resistencia a la insulina (Hotamisligil G et al., 1993).

En células de tejido adiposo, el TNF- α reduce la expresión y la actividad de PPAR- γ , así como de GLUT-4, resultando en una disminución en la capacidad para incorporar glucosa y también afectando el metabolismo de producción de ácidos grasos (Guilherme A et al., 2008). En el hígado, TNF- α incrementa la expresión de genes involucrados en la síntesis de *novo* de colesterol y ácidos grasos, al mismo tiempo reduce la expresión de genes involucrados en la captación de glucosa y el metabolismo de oxidación de lípidos. El efecto provocado por esta citocina en el metabolismo de lipídico resulta en un aumento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos que pudieran contribuir al desarrollo de resistencia a insulina en

diversos tejidos del organismo (Guilherme A et al., 2008). La desfosforilación de IRS-1, a través de la activación de fosfatasa y la participación de la JNK, son elementos claves en la resistencia a insulina inducida por el TNF- α en adipocitos (Tzanavari T et al., 2010).

Interleucina -6 (IL-6)

La interleucina-6 (IL-6), es otra citocina ampliamente relacionada con el desarrollo de la resistencia a insulina en adipocitos. IL-6 es un polipéptido de 185 aminoácidos (Somers W et al., 1997), con un peso molecular que oscila entre 21 y 28 kDa, dependiendo de su estado de fosforilación y/o glicosilación (May L et al., 1998). IL-6 actúa tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, es secretada por una amplia variedad de células: endoteliales, queratinocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos, macrófagos, entre otros tipos celulares (Carey A et al., 2004).

El receptor a IL-6, consiste de un heterodímero glicoproteico, el primer elemento es una subunidad receptora específica designada IL-6R y el segundo elemento es una subunidad transductora de señales, llamada gp130, perteneciendo ambas subunidades a la familia de receptores de citocinas tipo I. La subunidad gp130 es una glicoproteína de 130 kD que activa la vía de señalización JAK/STAT (Kamimura D et al., 2003). Una vez que se activa el complejo IL-6/IL-6R/gp130, se fosforila la proteína JAK, separándose del dominio intracelular del receptor para actuar sobre la proteína STAT (proteína de señalización activadora de la transcripción). Una vez activa, la proteína se dimeriza para formar heterodímeros u homodímeros, los cuales son translocados al núcleo para unirse a ciertas regiones específicas del ADN, con el fin de regular la expresión de algunos genes en particular, principalmente los asociados a la respuesta inflamatoria (Lodish H et al., 2002).

En personas sanas, los niveles plasmáticos de IL-6 son bajos, alrededor de 10 pg/ml, pero en algunas condiciones patológicas como la septicemia, los niveles séricos de IL-6 rebasan los 1000 pg/ml. El tejido adiposo blanco puede contribuir hasta con el 25% de la circulación basal de IL-6 en individuos sanos. Se ha reportado la presencia de altos niveles plasmáticos de IL-6 en pacientes obesos, donde hay una gran acumulación de tejido adiposo blanco; además algunos estudios revelan una correlato

funcional entre altos niveles de IL-6 y la presencia de resistencia a la insulina y DM2, de ahí que este siendo actualmente utilizado como un biomarcador (Pedersen B et al., 2007).

Diversos estudios han descrito efectos adversos de la IL-6 sobre el mecanismo de acción activado por insulina en adipocitos y hepatocitos, por ejemplo, reduce la síntesis de glucógeno en hepatocitos y provoca una disminución de la captación de glucosa en adipocitos (Sabio G et al., 2008). Estos efectos son mediados por un aumento en la expresión de la proteína SOCS-3, la cual se une al dominio intracelular del receptor a insulina, impidiendo la actividad tirosina-cinasa del receptor para la fosforilación de IRS-1 (Lyngso D et al., 2002; Van Hall G et al., 2003).

Las proteínas SOCS fueron originalmente descritas como moléculas inducibles por citocinas involucradas en la inactivación de la cascada de señalización activada por las propias citocinas (Starr R., et al 1997), así como por la insulina (Emanuelli B., et al 2000). La proteína SOCS-3 inhibe la señal de los receptores a citocinas de dos maneras: una, previene la unión de la proteína STAT al receptor; y la segunda, presentando un dominio llamado SOCS-box que recluta componentes de ligasas de ubiquitina, por lo que la unión de SOCS-3 poliubiquitina a JAK para ser degradado por el proteosoma (Eulenfeld R et al., 2011).

Se ha descrito que IL-6 induce resistencia a insulina en el hígado a través de la activación de STAT3 y la consiguiente inducción de la proteína supresora de la señalización de citocinas, SOCS-3, (*suppressor of cytokine signaling 3*) (Klover P., et al 2003; Senn J., et al 2003). Diferentes estudios han descrito que SOCS-3 puede inhibir la señalización de la insulina (Emanuelli B., et al 2001; Rui L., et al 2002) mediante la interacción directa con el receptor de la insulina, evitando la unión del sustrato del receptor de la insulina (IRS-1) con el receptor de la insulina, por lo tanto, inhibiendo la fosforilación de residuos de tirosina en el IRS-1 y por consiguiente la cascada de fosforilaciones río abajo que permiten la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 a la membrana plasmática (Emanuelli B., et al 2001). Además, SOCS-3 inhibe la señalización de la insulina a través de la degradación proteasomal de IRS-1 (Howard J., et al 2006; Kim J., et al 2009). En el hígado, la sobreexpresión de SOCS-3 provoca resistencia

a insulina, mientras que la supresión de esta molécula en ratones obesos y diabéticos (*db/db*) atenúa la presencia de esta patología (Ueki K., et al 2004).

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un importante factor de riesgo para el desarrollo de múltiples patologías. Las comorbilidades más estudiadas de la obesidad son las metabólicas (resistencia a insulina, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2) y cardiovasculares (hipertensión, ateromatosis, hipertrofia ventricular izquierda). Sin embargo, muchas otras patologías se ven aumentadas en sujetos con sobrepeso y obesidad, como son diversos tipos de neoplasias (colon, mama, endometrio, próstata, vesícula), enfermedades del aparato digestivo (reflujo gastroesofágico, esteatosis hepática no alcohólica), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), alteraciones del aparato locomotor (artrosis de rodilla y cadera), entre otras. A pesar que la asociación entre obesidad y otras patologías ha sido descrita ampliamente, el mecanismo fisiopatológico que asocia exceso nutricional con las enfermedades mencionadas no es bien conocido. El avance del conocimiento de los últimos años permite plantear que como consecuencia de la hiperplasia e hipertrofia que presenta el tejido adiposo en las personas obesas, induce un cambio significativo en la capacidad endocrina de los adipocitos, estimulando la expresión y secreción de múltiples adipocinas: leptina, IL-6, TNF- α , resistina, RBP-4, entre otras. Las cuales de manera individual o colectiva inciden sobre el metabolismo de los carbohidratos y lípidos.

Datos epidemiológicos y clínicos muestran claramente que hay una correlación positiva entre los niveles de adipocinas y el desarrollo de resistencia a la insulina, condición que precede a la DM2. De manera particular se ha observado que el RBP-4 es capaz de inducir resistencia a la insulina en adipocitos, miocitos esqueléticos y hepatocitos de roedores. El músculo esquelético en reposo es el responsable del 20% del metabolismo de glucosa, pero bajo condiciones de estimulación por insulina es el responsable del 80% de la captación de glucosa y más de un 80% de esta glucosa se acumula en forma de glucógeno. Por lo tanto, el músculo es el mayor contribuidor a la resistencia a la insulina en la DM2. Todo esto confiere al músculo esquelético una vital importancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina así como una posible blanco farmacológico para el tratamiento de la DM2.

Se ha propuesto al RBP-4 como una nueva adipocina humana y que podría estar relacionada con la resistencia a la insulina, por lo que estas nuevas perspectivas funcionales del RBP-4 han generado un intenso trabajo de investigación, ya que queda claro que el RBP-4 reduce la incorporación de glucosa

estimulada por insulina en los miocitos esqueléticos, pero se desconoce el mecanismo molecular involucrado, cuyo conocimiento pudiera establecer blancos farmacológicos con el fin de retrasar o inhibir el desarrollo de resistencia a la insulina en personas con sobrepeso u obesas, y de esta manera reducir de manera significativa la incidencia de DM2 con todos sus implicaciones que la acompañan, desde el ámbito de la salud, social y económico.

HIPÓTESIS

La activación del receptor tipo toll-4 (TLR-4) por RBP-4 induce resistencia a la insulina en miocitos esqueléticos de rata, efecto asociado a la producción de citocinas pro-inflamatorias y la acumulación atípica de triglicéridos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las bases moleculares de la resistencia a insulina inducida por RBP4 en miocitos esqueléticos de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar si la presencia de RBP-4 afecta la capacidad de incorporación de glucosa estimulada por insulina en la línea celular L6, la cual deriva de músculo esquelético de rata.
2. Evaluar si el efecto de RBP-4 sobre la incorporación de glucosa en las células L6 depende de la concentración del péptido, así como la duración del tratamiento.
3. Determinar si las células L6 expresan el receptor STRA6, que reconoce de manera específica a RBP-4.
4. Analizar si el estímulo con RPB-4 induce cambios en los niveles de expresión del receptor a insulina y del transportador Glut-4, elementos moleculares de la vía de señalización estimulada por insulina en las células L6.
5. Examinar si el RBP-4 induce un incremento en la expresión y secreción de IL-6 en las células L6, tal y como ocurre en los adipocitos.
6. Determinar si la presencia de RPB-4 e IL-6 modifican los niveles de expresión de la proteína SOCS-3, que inhibe la vía de señalización activada por insulina.
7. Investigar si la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 en las células L6 se relaciona con un incremento en la acumulación atípica de triglicéridos.
8. Evaluar si el efecto inducido por RBP-4 sobre la incorporación de glucosa estimulada por insulina en las células L6 y la producción de IL-6 es mediado por la activación del receptor TLR-4.
9. Investigar si la resistencia a la insulina inducida por el RBP-4 en las células L6, es mimetizado por el LPS, ligando exógeno de la proteína TLR-4.

METODOLOGIA

CULTIVO CELULAR

Las células L6 fueron adquiridas a la American Type Culture Collection (ATCC), el cultivo madre fue mantenido como mioblastos en medio Advanced-DMEM suplementado con 3% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina, 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico a 37 °C, 5% de CO₂ y se mantuvo por abajo del 70% de confluencia. Para la diferenciación a miotubos, los mioblastos una vez que alcanzan el 95% de confluencia, el medio de cultivo que contiene 3% de suero fetal bovino, es sustituido por medio DMEM que contiene 2% de suero fetal bovino por 6-7 días, recambiando el medio cada 48 horas. Después del día 7 de diferenciación, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de RBP-4. Los experimentos fueron realizados con células L6 que van del pasaje 5 al pasaje 40. Antes de realizar los experimentos, se verificó la integridad y morfología de las células en un microscopio de contraste de fases, de esa manera aseguramos parcialmente la viabilidad celular.

ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE 2 –DEOXI-(³H) GLUCOSA

El procedimiento se basa en el hecho de que tanto la glucosa como la 2-Deoxiglucosa (2DG) son transportadas de la misma manera al interior de las células por GLUT-1 y GLUT-4, transportadores presentes en las células L6, y fosforiladas por una hexocinasa, generando glucosa-6-fosfato (G6P) y 2-deoxi-glucosa-6-fosfato (DG6P), siendo esta última no metabolizable, por lo que se acumula en el compartimiento intracelular (Nedachi and Kanzaki, 2006). Este ensayo permite medir la incorporación total de glucosa, es decir el transporte de 2DG que ocurre a través de GLUT-1 y GLUT-4. Algunos ensayos experimentales consideran opcional el uso de citocalacina B para evaluar la incorporación de 2DG inespecífica, es decir, la que no es mediada por transportadores específicos de glucosa, para nuestros fines experimentales se omitió este paso ya que solamente evaluamos la incorporación total de 2DG-³H en miotubos.

Se utilizó la metodología descrita por DeFronzo et al, 1979 para inducir la incorporación de 2DG utilizando el siguiente protocolo:

- 1) Una vez finalizado el tratamiento de los miotubos con RBP-4, IL-6, C34 y LPS, se retiró el medio de cultivo DMEM-FBS 2%, y se sustituyó con medio de cultivo DMEM libre de suero fetal bovino y suplementado con 0.1% de albúmina bovina sérica (BSA). Bajo estas condiciones, incubamos las células durante 2 horas en un ambiente húmedo, a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire.
- 2) Las células se lavaron 3 veces con PBS.
- 3) Se adicionó una solución de insulina 1 μM y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, con el fin de estimular la incorporación de GLUT-4 a la membrana plasmática de las células L6.
- 4) Se agregaron 6 μl de una solución stock de 2DG-³H en cada pozo, hasta alcanzar una concentración final de 6.5 mM (0.5 μCi/pozo). Se incubó por 20 min a 37 °C.
- 5) Transcurrido el tiempo de exposición, se eliminó la 2DG-³H que no fue incorporada mediante dos lavados con PBS frío.
- 6) Se retiró el PBS frío y se adicionó una solución de NaOH 0.1 M para lisar las células.
- 7) A partir del lisado celular obtenido, se tomaron 4 alícuotas y se colocaron en tubos tipo eppendorf; a tres tubos se les agregó líquido de centelleo para evaluar la radioactividad en un contador de centelleo líquido (LS-5000, Beckmanm Coulter), y el cuarto tubo eppendorf se utilizó para determinar la concentración de proteínas, con el método BCA (ácido bicinonínico) con un kit comercial (BCA-kit, Pierce, USA). Esto último se realizó para eliminar como variable la cantidad de células y expresar los valores de radioactividad normalizados en función de cpm por cada 100 μg de proteínas.

ENSAYO DE RT-PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA - REACCIÓN EN CADENA LA POLIMERASA)

Extracción de RNA total

La extracción de ARN total se realizó a través del kit comercial ZR RNA MicroPrep™ (Zymo Research), seguimos las indicaciones del fabricante:

- 1) Se retiró el medio de cultivo DMEM-FBS 2% y se realizaron dos lavados con PBS 1X.
- 2) Se adicionó 600 µl de buffer de lisis del kit, y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 5 min.
- 3) Se transfirió el homogenado celular a una columna del kit de extracción, las cuales, se deben adaptar a tubos colectores.
- 4) Se centrifugó el homogenado a 10,000 rpm durante 3 min, a temperatura ambiente. Se desechó el contenido en el tubo colector.
- 5) Se adicionaron 600 µl de buffer de prelavado del kit, a la columna, se llevó a centrifugación a 10,000 rpm por 3 min.
- 6) Se desechó el contenido del tubo colector, y se realizaron dos lavados con 400 µl de buffer de lavado del kit, centrifugando a 10,000 rpm por 3 min.
- 7) Al terminar los lavados de la columna, se cambió el tubo colector que se utilizó para contener y almacenar el ARN total de la muestra, eluido de la columna utilizando 50 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, e incubado por 2 min, a temperatura ambiente, previa centrifugación.
- 8) Se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min, para obtener el ARN total en el nuevo tubo colector, se incubó la muestra colectada de ARN a 60 °C, por 5 min.
- 9) Se determinó la concentración (absorbancia a 260 nm de longitud de onda) y calidad (cociente entre la absorbancia a 260nm y 280nm). Para considerar una muestra de ARN total de calidad, el valor del cociente deberá estar entre 1.5 y 2.0.

Síntesis del ADNc (RT)

A partir del ARN total extraído y purificado, se realizó la síntesis del ADNc (Transcripción reversa), para la cual se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante. Posteriormente, los tubos de reacción se colocaron en un termociclador de gradientes, para someter las muestras al siguiente protocolo de trabajo: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 min a 85° y finalmente a 4°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos, empleando el software en línea de la empresa DNA Technology, en la siguiente tabla se enlistan los oligonucleótidos que fueron utilizados en este estudio:

Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño esperado
STRA6 5'-----3'	ATGAGAACCCACTGCCTTTCCTGA	60.3	739 pb
3'-----5'	AGCTCATCCAGCAGACTATGGCTT		
TLR4 5'-----3'	AGTGTATCGGTGGTCAGTGTGCTT	60.2	414 pb
3'-----5'	ATGAAGATGATGCCAGAGCGGCTA		
IL-6 5'-----3'	CCGTTTCTACCTGGAGTTTGT	61.0	600 pb
3'-----5'	GTTTGCCGAGTAGACCTCATAG		
TNF- α 5'-----3'	CAGCCGATTTGCCATTTTCATAC	60.3	516 pb
3'-----5'	GGCTCTGAGGAGTAGACGATAA		
Rec Ins 5'-----3'	AATGTGGCAAGAGCCAAAGGAACC	60.2	586 pb
3'-----5'	ACTGGCTGACTCATTGACCGTCTT		
GLUT-4 5'-----3'	TCGTGGCCATATTTGGCTTTGTGG	60.3	479 pb
3'-----5'	TGCTGTTTCCTTCATCCTGGAGGT		

SOCS-3	5'-----3'	ACCTTCCTTTGAGGTTTCAGGAGCA	60.1	208 pb
	3'-----5'	AGGCAGCTGGGTCACTTTTCATA		
PGC1- α	5'-----3'	CTAGCCATGGATGGCCTATTT	61.1	465 pb
	3'-----5'	AGACTCCCGCTTCTCATACT		

A partir del ADN complementario obtenido en la transcripción reversa, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Separación electroforética de los productos de PCR

Los productos de PCR amplificados fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2%. La electroforesis se realizó en una cámara electroforética, aplicando 65 V por 80 minutos. La imagen del gel obtenida se digitalizó en el software que controla el transiluminador, Quantity one (Chemidoc, Biorad). A partir de la imagen obtenida, se realizaron el análisis densitométrico correspondiente, empleando el software *Image J* que es proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América.

INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)

Los cultivos con células L6 fueron tratados con RBP4 10 y 20 nM, durante 72 horas. Al finalizar el tratamiento, las células fueron lisadas, el homogenado celular resultante fue centrifugado a 13,000 rpm por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se realizó cuantificación de proteínas por el método BCA. Para la separación electroforética de las proteínas, se utilizó PAGE-SDS al 8% y se aplicaron 80 mV, durante 1 hora, y por 2 h a 120 mV; posteriormente, se transfirió a una membrana de PVDF, bajo las siguientes condiciones: 80mA, a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, la membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% con TBST, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se expuso con anticuerpo primario: Rabbit IgG anti Insulin Receptor Santacruz Biotechnology (SC-711), Rabbit IgG anti Glut4 Santacruz Biotechnology (SC-7938) y Rabbit Anti SOCS3 Santacruz Biotechnology (SC-9023). La incubación con el anticuerpo primario se realizó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiraron los correspondientes anticuerpos primarios, se

realizaron lavados con TBST, y la membrana se expusó con anticuerpo secundario Goat anti Rabbit acoplado a HRP de Santacruz Biotechnology (SC-2030), durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron lavados a la membrana con TBST y se reveló con luminol y placa radiográfica.

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A partir de medio de cultivo condicionado, de cultivos de células L6, expuestos a RBP4 10 nM y LPS 5 µg/m⁰, durante 24horas, 48 horas y 72 horas, se realizaron Inmunoensayos enzimáticos (ELISA, por sus siglas en inglés), con el kit comercial Rat IL-6 ABTS development kit (Peprotech, USA).

Se prepararon diluciones del estándar de 0 –2ng/ml. Adicionamos 100 µl por pozo de las soluciones estándar y de las muestras problemas por triplicado. Luego se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Se aspiró y lavo cuatro veces; se preparó una dilución a una concentración de 0.5 µg/ml del anticuerpo de detección, agregamos 100 µl por pozo e incubamos por 2 horas a temperatura ambiente. Se aspiró y lavo 4 veces nuevamente y se adicionaron 100 µl de conjugado Avidina-HRP (dilución 1:2000) a cada pozo, posteriormente se incubo por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último se aspiró y se dieron 4 lavados, luego adicionamos 100 µl de substrato (ABTS) e incubamos a temperatura ambiente hasta desarrollar color. Se determinó la densidad óptica por medio de un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se sembraron células L6 en placas de cultivo celular Fluorodish TM (Worl Precision Instrument), que tienen una superficie de 35 mm, se trabajó con una confluencia del 60% aproximadamente, se realizaron lavados con PBS, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehido (Sigma-Aldrich, EUA) al 3.7% en solución amortiguadora PHEM (PIPES, HEPES, EGTA, Sulfato de magnesio, pH 7.4) por 10 minutos, se lavaron con PBS y permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0.1% por 15 minutos.

Después se incubó con solución bloqueadora (gelatina 0.5% y FBS 1.5% en PBS) durante 2 horas en agitación constante. Se incubó con anticuerpo primario Rabbit Anti SOCS3 Santa Cruz Biotechnology (SC-9023) a una dilución 1:200 durante toda la noche a 4°C. Se incubó por 2 horas con anticuerpo secundario acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Finalmente para teñir el núcleo se incubó durante 20 minutos en solución Hoechst a una concentración de 0.5 µg/ml por 20 minutos. Se montaron las placas Fluorodish en medio VectaShield H-100 (Vector Laboratories, EUA) y se examinaron las muestras con un microscopio confocal (Nikon, Japón) para tomar micrografías con un aumento de 40x.

TINCIÓN DE ROJO OLEOSO

La acumulación de lípidos en miotubos expuestos con RBP4 10 nM, LPS 5µg/ml e IL-6 5 nM, se detectó por citoquímica, empleando la técnica de Rojo Oleoso 0 específica para lípidos neutros. El procedimiento que realizamos fue el siguiente: a) Lavamos las células dos veces con PBS 1X; b) Fijamos las células con una solución de paraformaldehído al 4% por 1 h a temperatura ambiente; c) Lavamos los miotubos dos veces con PBS 1X; d) Adicionamos a cada pozo 2 ml de la solución de Rojo Oleoso 0 y dejamos incubando toda la noche a temperatura ambiente; e) Recuperamos la solución de Rojo Oleoso 0 y lavamos las células dos veces con PBS 1X; f) Adicionamos 1 ml de la solución de violeta de cresilo, para la contratinción y dejamos incubando 3 min; g) Recuperamos la solución de violeta de cresilo y lavamos las células tres veces con agua; h) Dejamos suficiente agua en cada uno de los pozos para usar objetivos de inmersión en agua de un microscopio Leica DM100 que tiene acoplada una cámara CCD (*Jenoptik ProgRes C10 Plus*).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y gráficos se realizaron con el programa SigmaPlot 11.0 (Jandel Corporation, EUA). Se utilizó la prueba *t de Student* para evaluar la diferencia entre grupos, para considerar la diferencia estadísticamente significativa p debe ser menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Los adipocitos al ser expuestos crónicamente a la presencia de RBP-4, reducen de manera significativa su capacidad de incorporar glucosa bajo el estímulo de insulina, lo cual sugiere de manera inicial que el RBP-4 es capaz de inducir resistencia a la insulina en este tipo celular. Se decidió investigar de manera preliminar, si el RBP-4 es capaz de modificar la capacidad de las células de músculo esquelético para incorporar glucosa bajo el estímulo de insulina. Las células L6 se mantuvieron en presencia de RBP-4 por 72 horas a una concentración final de 10 nM. Al finalizar el tiempo de tratamiento, las células control y tratadas fueron expuestas a la presencia de 2-deoxi-(³H)-glucosa y 1 μM de insulina, esto con el fin de estimular la incorporación del transportador Glut-4 a la membrana plasmática y así facilitar la incorporación de la glucosa marcada. Al determinar las cuentas por minuto de cada condición experimental y normalizarla con respecto al contenido de proteínas, para eliminar el número de células como variable, se observó que efectivamente, el RBP-4 reduce de manera significativa, aproximadamente un 25%, la capacidad de las células L6 para incorporar glucosa estimulada por insulina (Figura 2).

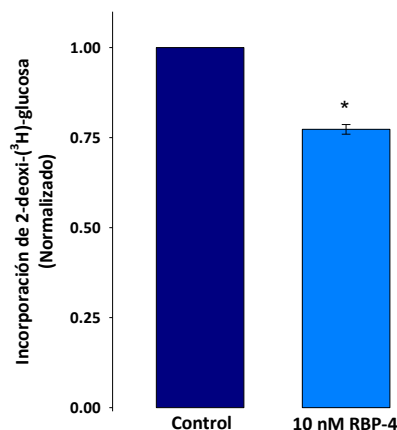


Figura 2. RBP-4 reduce la incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa. Los miotubos L6 fueron mantenidos por 72 horas en presencia de 10 nM de RBP4, recambiándose el medio de cultivo cada 24 horas, se cuantificó la incorporación total de glucosa en presencia de insulina, tanto en la condición control como en la tratada con RBP-4. Las cpm obtenidas se ajustaron a la concentración de 100 mg de proteínas, y se normalizaron con respecto a los valores ajustados de la condición control (n= 4) **p*< 0.05.

En esta primera serie experimental, solamente se evaluó el efecto del RBP-4 sobre la incorporación de glucosa en las células L6 a una sola concentración (10 nM) y un solo tiempo de tratamiento (72 h). Por lo que se procedió a averiguar si el efecto del RBP-4 sobre la incorporación de glucosa depende de la concentración del péptido empleado, así como de la duración del tratamiento. Con el fin de investigar el primer punto, se mantuvieron las células L6 por 72 horas bajo la influencia de diferentes concentraciones de RBP-4 (0, 5, 1, 2, 5 y 10 nM). La Figura 3A muestra que se requiere una concentración mayor de 2 nM de RBP-4 para comenzar a observarse una reducción significativa en la incorporación de glucosa, alcanzándose con 5 y 10 nM de RBP-4, el máximo efecto inhibitorio (26 y 22% respectivamente). Para el segundo punto a investigar, las células se mantuvieron a una concentración constante de 10 nM de RBP-4 a diferentes tiempos de tratamiento: 24, 48 y 72 horas. La cuantificación de la incorporación de glucosa mostrada en la Figura 3B, pone en evidencia que es necesario que transcurran por lo menos 48 horas para que el RBP-4 pueda reducirla de manera significativa, observándose una reducción del 24% a las 72 horas. El retardo observado de 48 horas en el efecto que ejerce el RBP-4 sobre la incorporación de glucosa sugiere la participación de un mecanismo genómico. Las evidencias obtenidas hasta el momento muestran que el efecto del RBP-4 depende tanto de la concentración empleada del péptido, así como del tiempo de tratamiento, considerándose entonces una concentración óptima de 10 nM de RBP-4 y una duración de tratamiento de 72 horas para inducir resistencia a la insulina en la línea celular L6.

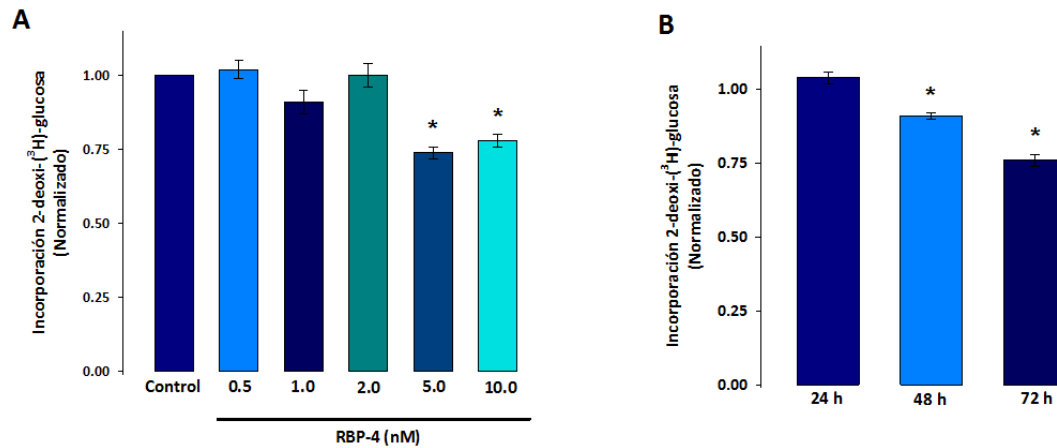


Figura 3. El efecto de RBP-4 sobre la incorporación de 2-deoxi-3H-glucosa depende de la concentración del péptido y de la duración del tratamiento. A) Los miotubos L6 se mantuvieron durante 72 horas en presencia de diferentes concentraciones de RBP-4 (0.5, 1, 2, 5 y 10 nM), estas diferentes condiciones se mantuvieron de manera simultánea en placas multipozos. **B)** Los miotubos se mantuvieron en presencia de RBP-4 10 nM a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), finalizando en todos los casos el tratamiento al día 5 de cultivo. Las cpm obtenidas se ajustaron a la concentración de 100 µg de proteínas, y se normalizaron con respecto a los valores ajustados de la condición control (n= 4) **p*< 0.05.

La función canónica del RBP-4 es transportar retinol en el sistema circulatorio del organismo y evitar que sea eliminado durante la filtración glomerular, se ha descrito que se une de manera específica a un receptor de membrana, denominado STRA6, por lo que después de haber observado el efecto inhibitorio que ejerce el RBP-4 sobre la incorporación de glucosa en las células L6, se investigó si esta línea celular expresa dicho receptor tanto a nivel de ARNm como de proteína. La Figura 3 muestra de manera evidente que las células L6 en la condición control expresan el STRA6, tanto a nivel de ARNm (Figura 4A) como de proteína (Figura 4B), inmunodetectándose una proteína de 73 kDa, tal y como ha sido reportado por el proveedor del anticuerpo primario empleado.

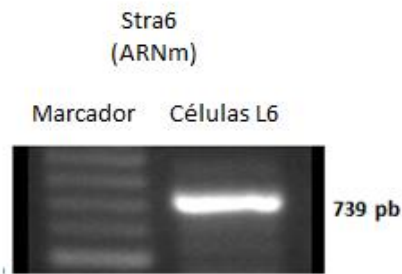
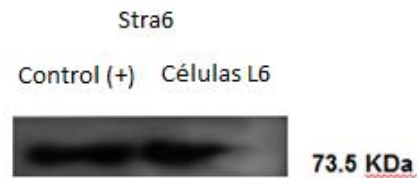
A**B**

Figura 4. La línea celular L6 expresa a STRA 6, el receptor específico para RBP-4. A) A partir de un cultivo de miotubos de L6, se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR, que sirvió para detectar la presencia del ARNm que codifica para STR 6. **B)** A partir de un cultivo de miotubos de L6 se obtuvo un lisado celular, el cual fue utilizado para hacer Western blot para detectar la presencia de la proteína STRA6, utilizando como control + un lisado de cerebro de rata.

Se han descrito por lo menos tres mecanismos mediante los cuales, un mensajero químico puede llegar a inducir la condición de resistencia a insulina: 1) disminución en la expresión génica o funcional de alguno o algunos de los elementos moleculares que participan en la vía de señalización activada por insulina; 2) expresión de citocinas pro inflamatorias, las cuales son capaces de desacoplar de manera directa o indirecta la señal de insulina; y 3) la producción de especies lipotóxicas generadas por la acumulación atípica de lípidos en el citosol.

Con el fin de evaluar cuál sería el mecanismo molecular a través del cual el RBP-4 induce resistencia a la insulina en la línea celular L6, decidimos evaluar cada una de las tres posibilidades mencionadas anteriormente. Dada la importancia de la expresión del receptor a insulina y la incorporación del transportador GLUT-4 en la membrana plasmática para la vía de señalización activada por insulina, se determinó si la presencia de RBP-4 modifica el nivel de expresión de ambas proteínas, así como la presencia de GLUT-4 en la membrana plasmática de las células L6.

Las células L6 se mantuvieron durante 72 horas en presencia de 10 y 20 nM de RBP-4, al finalizar el tratamiento, se aisló el ARN total para determinar por ensayo de RT-PCR la presencia del ARNm que codifica para el receptor a insulina, observándose en la Figura 5A, que la presencia de RBP-4 reduce un 35% el nivel de expresión del receptor a insulina independientemente de la concentración de RBP-4 empleada, 10 o 20 nM. De manera complementaria, evaluamos la expresión del receptor a insulina a nivel de proteína por western-blot. El RBP-4 reduce de manera significativa la expresión proteica del receptor a insulina, tal y como se había visto a nivel de ARNm, sin embargo, se observa un efecto diferencial en función de la concentración de RBP-4 empleada, por ejemplo, a una concentración de 10 nM de RBP-4, se presenta una reducción del 30%, mientras que al elevar al doble la concentración del péptido, 20 nM, el efecto inhibitorio es de aproximadamente 75% con respecto a la condición control (Figura 5B). Estos datos sugieren que la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 en las células L6 se debe a una reducción significativa en la expresión del receptor a insulina, de ahí que la actividad biológica de la insulina resulte afectada negativamente.

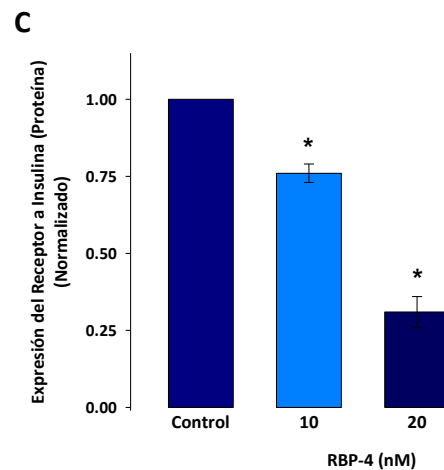
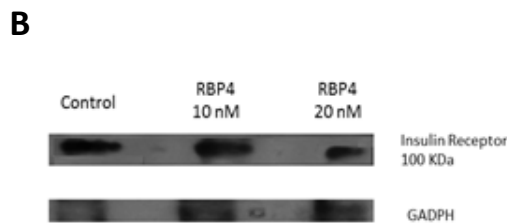
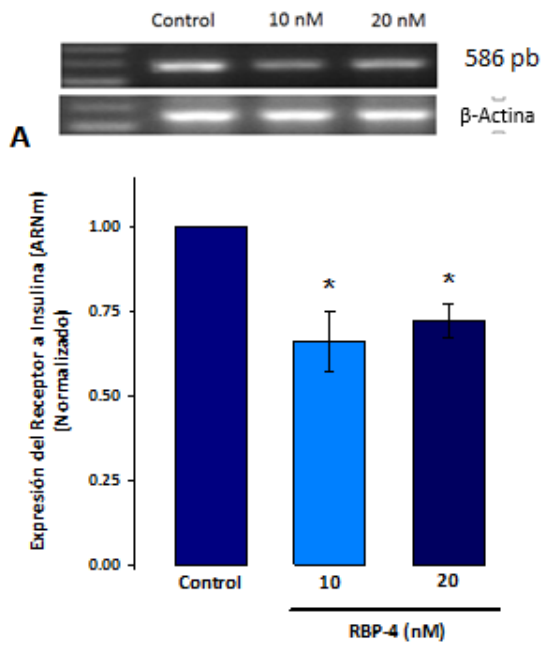


Figura 5. RBP-4 reduce los niveles de expresión del Receptor a Insulina. A) Miotubos L6 fueron tratados por 24 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para Receptor a Insulina; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. **B)** Imagen representativa del western blot correspondiente al receptor a insulina, realizado a partir de lisados celulares de Miotubos L6 tratados por 72 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas. **C)** Gráfica que resume los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del control de carga GADPH, y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. (n=3) * $p < 0.05$

El segundo elemento molecular que fue investigado de la vía de señalización activada por insulina es el transportador GLUT-4, se empleó la misma estrategia experimental que para el receptor a insulina. De manera interesante se observó, contrario a lo que se esperaba, que la presencia de RBP-4, 10 y 20 nM, induce un incremento tanto en los niveles de expresión del ARNm que codifica para el transportador GLUT-4, así como a nivel de proteína. A nivel de ARNm hay un incremento significativo del 50% a una concentración de 10 nM de RBP-4, y solamente un aumento modesto del 15% cuando las células son tratadas con 20 nM de RBP-4 (Figura 6A). Los cambios observados a nivel de ARNm para el transportador GLUT-4, se correlacionan cualitativamente con los niveles de proteínas detectados por western-blot, sin embargo, a nivel de proteína se observa un mayor efecto del RBP-4, por ejemplo, a una concentración de 10 nM, el nivel de expresión del transportador GLUT-4 es 5 veces mayor con respecto a la condición control, mientras que a una concentración de 20 nM, se alcanza aproximadamente 6 veces el valor de la condición control (Figura 6B). Probablemente el incremento observado en los niveles de expresión del transportador GLUT-4 se deba a un mecanismo de compensación de la célula L6 para hacerle frente a la resistencia a la insulina inducido por el RBP-4, faltaría por investigar la localización subcelular de dicho transportador.

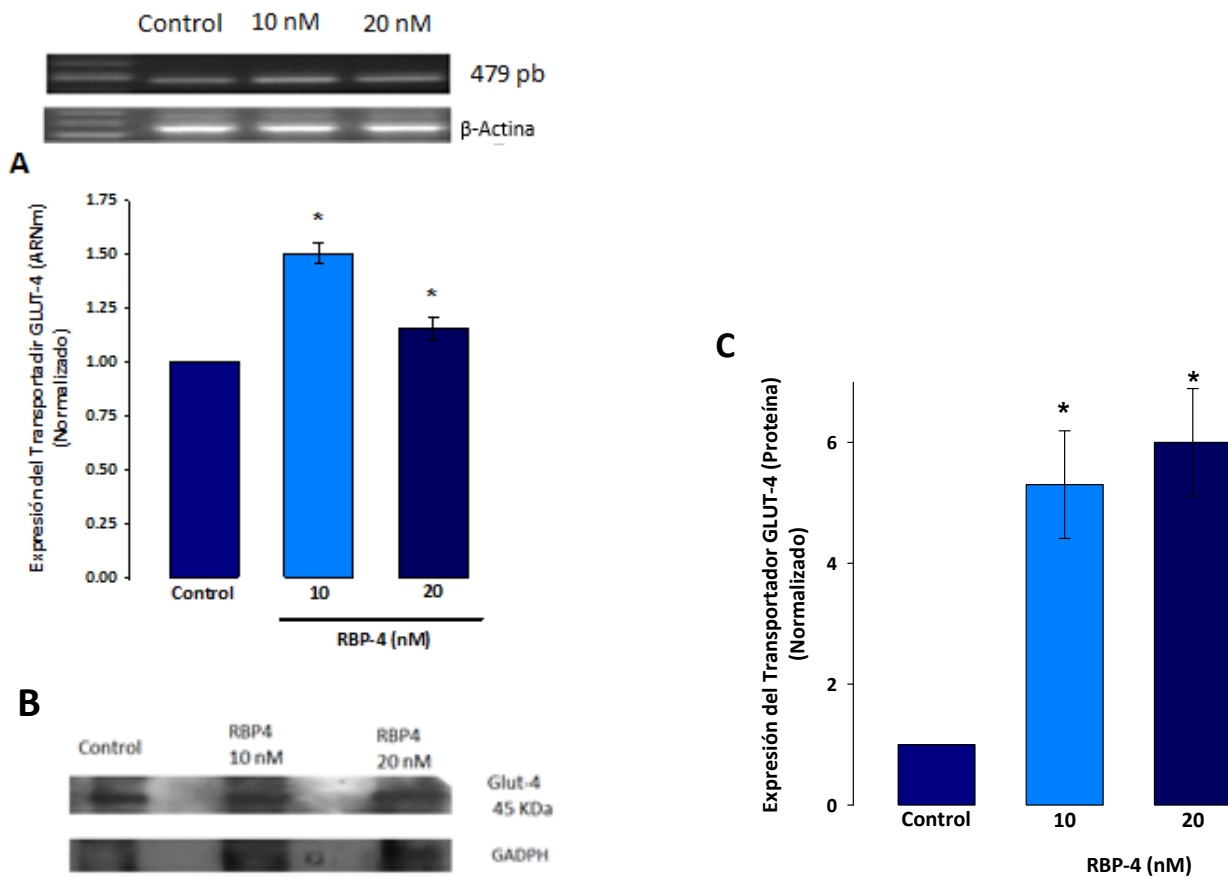


Figura 6. RBP-4 incrementa los niveles de expresión de Glut-4. **A)** Miotubos L6 fueron tratados por 24 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para el transportador Glut-4; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. **B)** Imagen representativa del western blot correspondiente a Glut-4, realizado a partir de lisados celulares de Miotubos L6 tratados por 72 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas. **C)** Gráfica que resume los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del control de carga GADPH, y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. (n=3) * p<0.05

Se ha descrito ampliamente en la literatura científica, que la presencia crónica de citocinas pro-inflamatorias, tales como la IL-6 y el TNF- α , son capaces de inducir resistencia a la insulina en tejido adiposo, tejido muscular, páncreas e hígado. Los macrófagos, principal tipo celular productor de IL-6, al ser activado por LPS, expresan en las primeras 2 horas de tratamiento un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6. Además, se sabe que el músculo esquelético bajo ciertas condiciones de estrés es capaz de producir IL-6 con el fin de regular su metabolismo. Con estos antecedentes, se procedió a investigar si la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 está asociada con la producción de la citocinas pro-inflamatoria, IL-6. Las células L6 se mantuvieron en presencia de 10 nM de RBP-4 hasta por 4 horas, al finalizar el tratamiento se evaluaron los niveles del ARNm para IL-6. La Figura 7A muestra que a partir de la segunda hora de tratamiento con RBP-4, los niveles del ARNm para IL-6 se incrementan de manera significativa un 13% con respecto a la condición control, y que al prolongar el tratamiento por 4 horas, se alcanza un aumento del 35%, fenómeno muy parecido al que presentan los macrófagos al ser activados por LPS. De manera complementaria, se evaluó por ELISA los niveles de IL-6 secretados por las células L6 después de haber sido tratadas por 24, 48 y 72 horas con 10 nM de RBP-4. En este trabajo se reporta por vez primera que las células L6 presentan una secreción basal de IL-6 (24 horas: 50.83 pg/ml; 48 horas: 98.49 pg/ml; y 72 horas: 186.31 pg/ml). Al igual como se observó en los ensayos de RT-PCR, el RBP-4 induce un incremento significativo en la producción de IL-6 en las células L6 (24 horas: 186.53 pg/ml; 48 horas: 312.53 pg/ml; y 72 horas: 541.58 pg/ml) (Figura 7B).

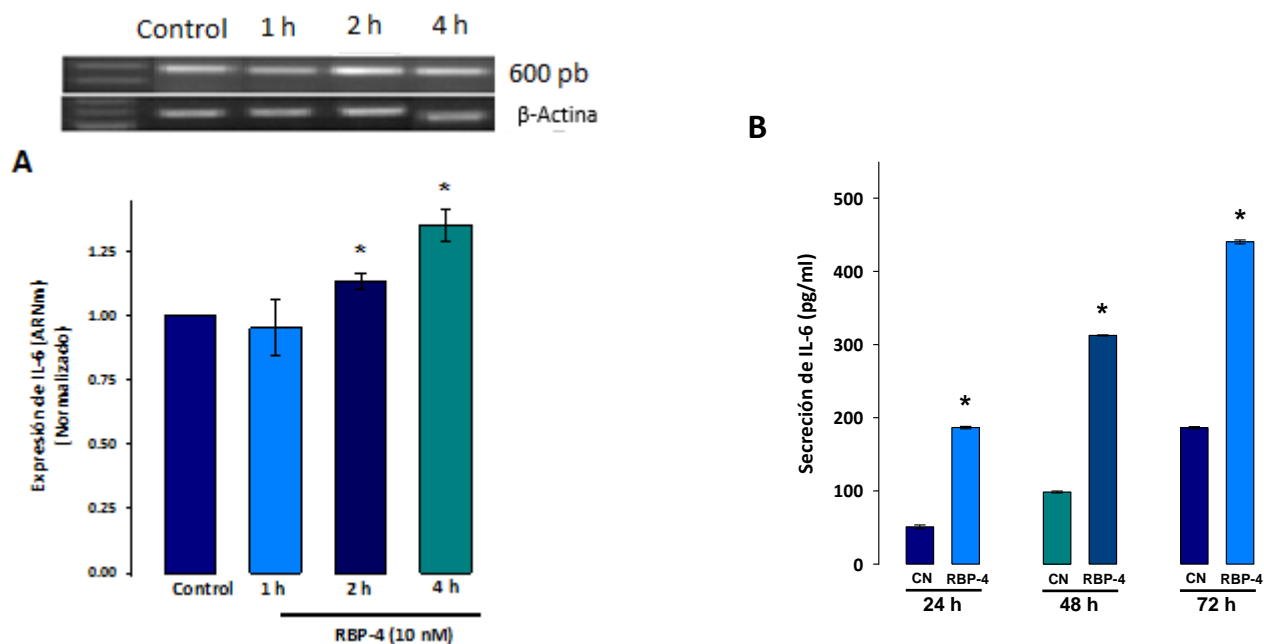


Figura 7. RBP-4 induce incremento en los niveles de expresión y secreción de la citocina pro inflamatoria IL-6. a) Miotubos L6 fueron tratados a diferentes tiempos de exposición (1, 2 y 4 horas) 10 nM de RBP-4, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. **b)** Inmunoensayo enzimático (ELISA), a partir de medio condicionado proveniente de cultivos de células L6 tratados con RBP-4 10 nM para determinar la cantidad de IL-6 producida y secretada, tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento ($n=3$) $*p<0.05$

Al igual como ocurre en los adipocitos, la presencia de IL-6 en el medio de cultivo, es suficiente para inducir resistencia a la insulina en las células L6, tal y como se muestra en la Figura 8A, donde una concentración de 5 nM de IL-6 por 48 horas de tratamiento, reduce en un 30% la capacidad de las células L6 por incorporar glucosa estimulada con insulina. El mecanismo a través del cual se ha reportado que la IL-6 induce resistencia a la insulina en otros tipos celulares, se relaciona con un incremento en los niveles de expresión de la proteína SOCS-3, la cual interacciona con el sustrato del receptor a insulina tipo 1 (IRS-1), impidiendo su fosforilación y el acople de la cascada de señalización activada por insulina. La IL-6 induce un incremento significativo del 50% en los niveles de expresión del ARNm que codifica

para SOCS-3 en las células L6 a partir de las primeras 4 horas de tratamiento (Figura 8B). Este cambio en los niveles del ARNm es acompañado en el mismo sentido, por un aumento en los niveles de expresión de la proteína SOCS-3 al finalizar el tratamiento con IL-6 por 48 horas (Figura 8C).

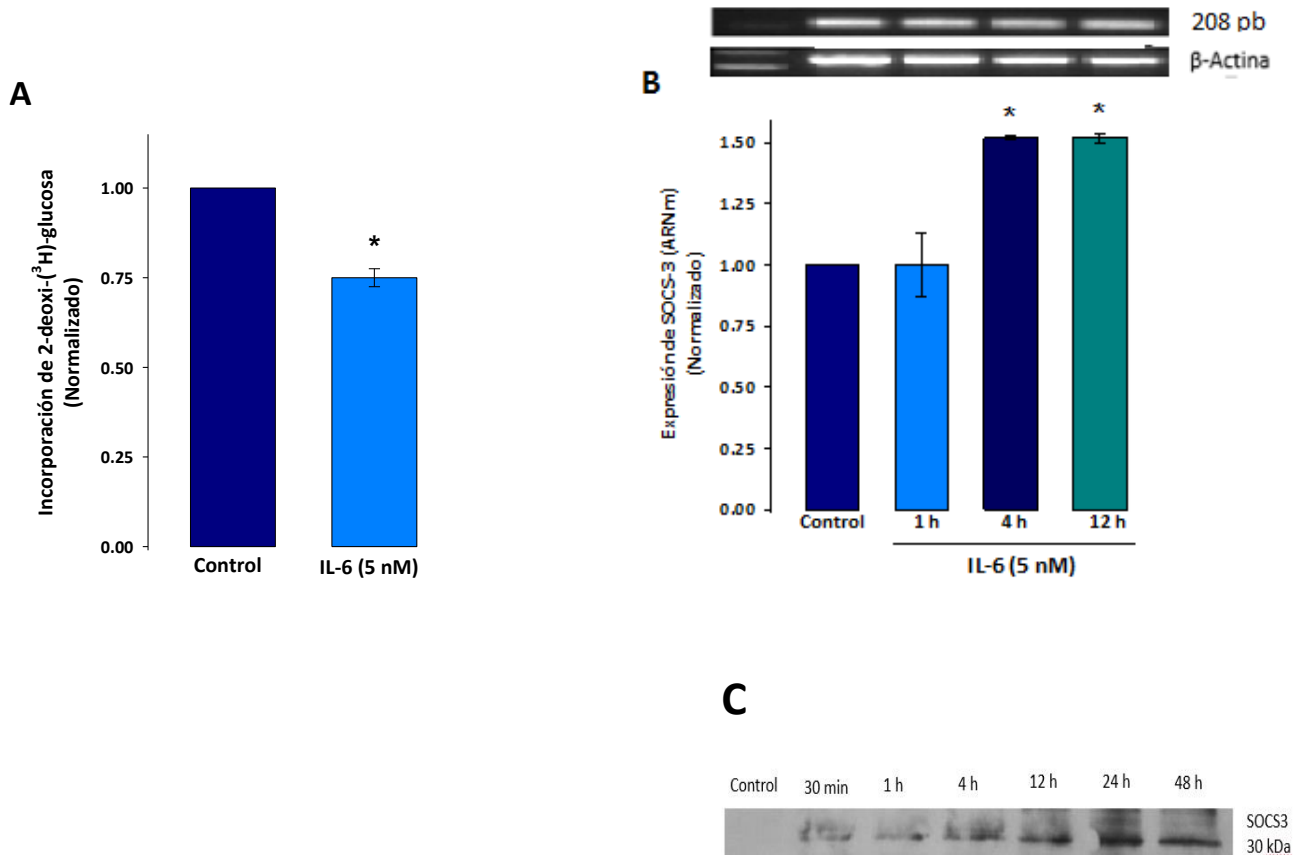


Figura 8. a) IL-6 reduce la incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa en miotubos L6, efecto asociado al incremento en los niveles de expresión de SOCS-3. A) Los miotubos L6 fueron mantenidos por 48 horas en presencia de 5 nM de IL-6, recambiándose el medio de cultivo cada 24 horas, se cuantificó la incorporación total de glucosa en presencia de insulina, tanto en la condición control como en la tratada con IL-6. Las cpm obtenidas se ajustaron a la concentración de 100 mg de proteínas, y se normalizaron con respecto a los valores ajustados de la condición control (n= 4). **B)** Miotubos L6 fueron tratados a diferentes tiempos de exposición (1, 4 y 12 horas) con 5 nM de IL-6, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para SOCS-3; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. (n=3) * $p < 0.05$ **C)** Western Blot realizado a partir de lisados de miotubos L6, tras diferentes tiempos de exposición (0.5, 1, 2, 4, 12 y 48 horas) con 5 nM de IL-6, en ensayo único.

Con estas evidencias, se decidió investigar entonces, si la presencia de RBP-4 además de estimular la producción de IL-6, modifica los niveles de expresión de la proteína SOCS-3. La presencia de 10 y 20 nM de RBP-4 por 48 horas induce un incremento significativo en los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína SOCS-3, 15% y 37% respectivamente (Figura 9A). Este cambio en los niveles del ARNm, se acompaña por un incremento de mayor magnitud a nivel de proteína, 50% a una concentración de 10 nM, y de 265% a una concentración final de 20 nM de RBP-4 por 72 horas de tratamiento (Figura 9B). La Figura 9C muestra una serie de microfotografías de inmunofluorescencia en las cuales se confirma como las células L6 tratadas con 20 nM de RBP-4 por 72 horas presentan una mayor inmunorreactividad por el anticuerpo que reconoce de manera específica la proteína SOCS-3. Estos resultados explicarían al menos parcialmente como la presencia de RBP-4 induce resistencia a la insulina en las células L6.

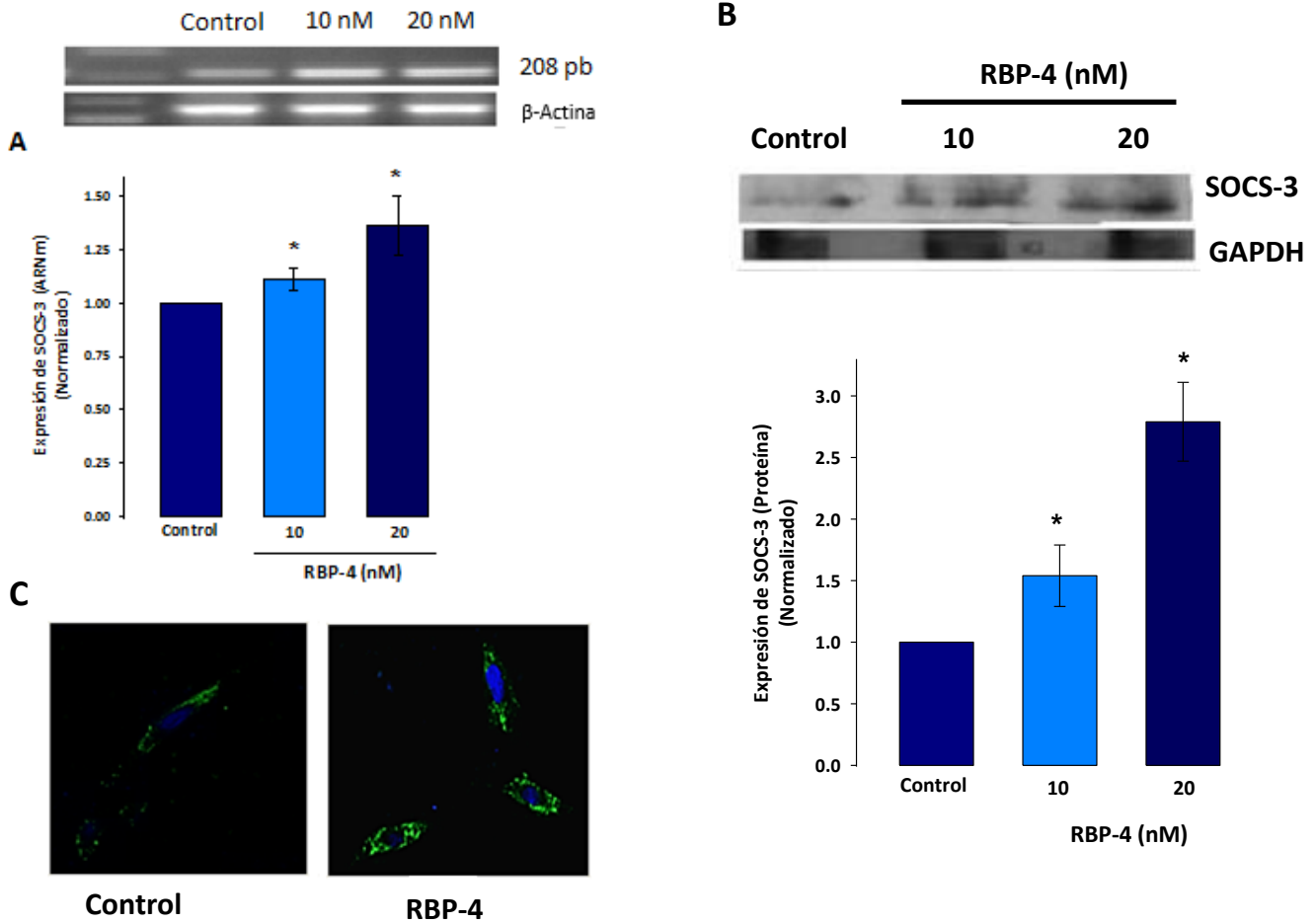


Figura 9. RBP-4 induce incremento en los niveles de expresión de SOCS-3. Miotubos L6 fueron tratados por 48 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para SOCS-3; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. **B)** Miotubos L6 fueron tratados por 72 horas con 10 y 20 nM de RBP-4, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas, se realizaron western blot para evaluar cambios en el contenido de la proteína SOCS-3; la gráfica resume los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del control de carga GAPDH, y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. ($n=3$) * $p<0.05$ **C)** Miotubos L6 fueron cultivados en placas Fluorodish y tratados por 72 horas con 10 nM de RBP-4, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas; al tener una confluencia del 60%, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo acoplado a FITC, por lo que la señal en verde correspondiente a SOCS-3; en azul, la señal de Hoechst correspondiente al núcleo (**Objetivo 40x**)

El tercer probable mecanismo a través del cual el RBP-4 pudiera estar induciendo resistencia a la insulina en las células L6 es por la generación de especies lipotóxicas, como el diacilglicerol y ceramida, las cuales son capaces de desacoplar la vía de señalización activada por insulina. El aumento en la producción de especies lipotóxicas se debe fundamentalmente a la acumulación atípica de triglicéridos en el citosol, ya que la vía de la beta-oxidación de ácidos grasos a nivel de la membrana mitocondrial esta inhibida. Se evaluó por tinción de rojo oleoso la acumulación de triglicéridos en las células L6 en la condición control y tratadas con 10 nM de RBP-4 por 72 h. La Figura 10 presenta una serie de microfotografías en campo claro donde se observa claramente un aumento en el número de gotas de grasa neutra color rojo que presentan las células L6 tratadas con RBP-4.

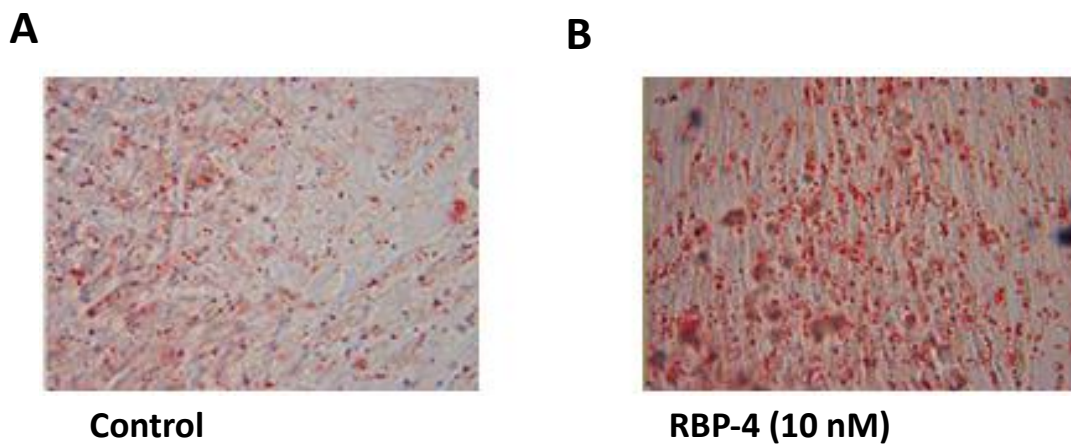


Figura 10. RBP-4 induce acumulación de triglicéridos. Miotubos L6 fueron cultivados por 7 días bajo dos condiciones; condición control, con recambio de medio de cultivo cada 24 horas (**A**), y bajo tratamiento con 10 nM de RBP-4 por 72 horas, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas (**B**). Los cultivos de las dos condiciones experimentales fueron fijados y teñidos con rojo oleoso, para obtener micrografías que evidencian la acumulación de triglicéridos (**Objetivo 40x**).

Se ha observado en los hepatocitos, que la expresión de los genes que codifican para las enzimas asociadas a la beta-oxidación de ácidos grasos a nivel de la membrana mitocondrial es regulada negativamente por el factor de transcripción PGC1- α . Se analizó de manera inicial por RT-PCR, si la presencia de RBP-4 modifica los niveles de expresión del ARNm que codifica para el factor de transcripción PGC1- α . El gráfico de la Figura 11 muestra que las células L6 mantenidas por 72 horas en presencia de 10 nM de RBP-4 incrementan el nivel de expresión del ARNm para PGC1- α . Este resultado sugiere de manera muy preliminar que la acumulación atípica de triglicéridos inducida por RBP-4 se debe a una reducción en la expresión de las enzimas responsables de la beta oxidación.

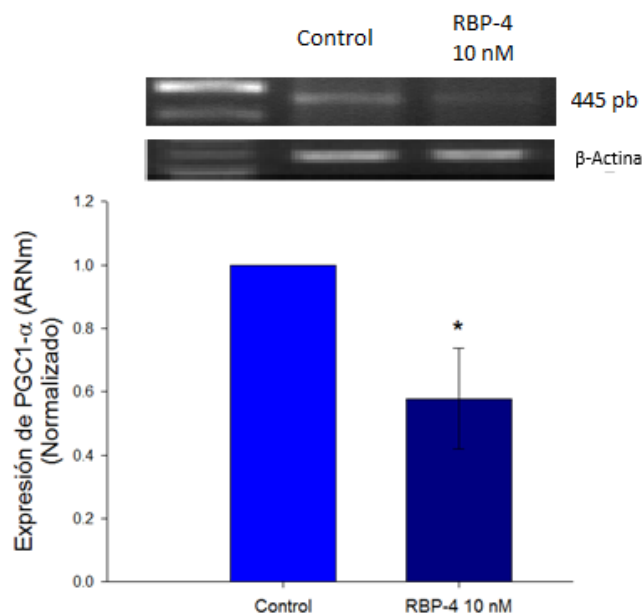


Figura 11. RBP-4 induce incremento en los niveles de expresión del ARNm que codifica para PGC1- α . Miotubos L6 fueron tratados por 24 horas con 10 nM de RBP-4, y a partir de estos cultivos se obtuvo ARNm para hacer RT-PCR en donde se evaluaron cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifica para PGC1- α ; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. ($n=3$) * $p<0.05$

En el año 2012, Norseen y colaboradores evidenciaron que el RBP-4 no solamente se une de manera específica al receptor STRA6, sino también es capaz de unirse al receptor TLR-4 e inducir resistencia a la insulina en los adipocitos. Se decidió investigar entonces, si las células L6 expresan la proteína TLR-4, por lo que se mantuvieron las células bajo condiciones control, y mediante ensayos de RT-PCR y western-blot, se logró determinar que efectivamente, las células L6 al igual que los adipocitos y los macrófagos, expresan el TLR-4, tanto a nivel de ARNm (Figura 12A) como de proteína (Figura 12B).

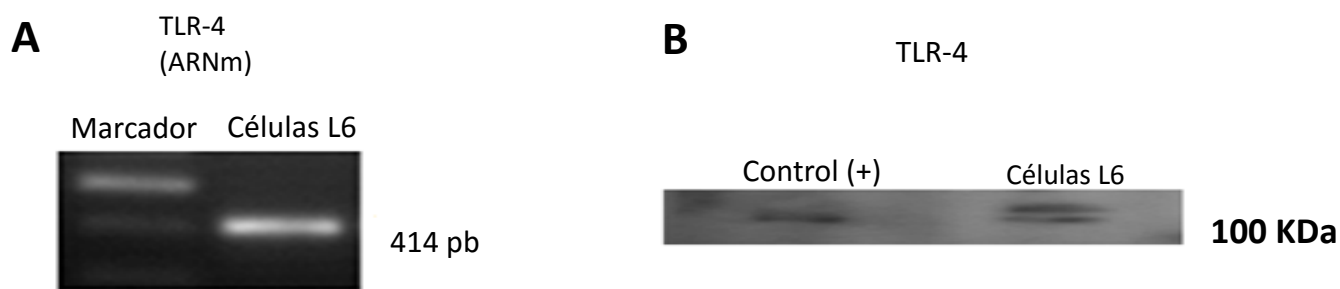


Figura 12. La línea celular L6 expresa TLR-4, receptor de la respuesta inmune que puede reconocer a RBP-4. A) A partir de un cultivo de miotubos de L6, se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR, que sirvió para detectar la presencia del ARNm que codifica para TLR-4. **B)** A partir de un cultivo de miotubos de L6 se obtuvo un lisado celular, el cual fue utilizado para hacer Western blot para detectar la presencia de la proteína TLR-4, utilizando como control + un lisado de células MDA-MB-231.

Hasta el momento, se ha mostrado evidencia que el RBP-4 induce resistencia a la insulina en las células L6, y que están participando muy probablemente tres diferentes mecanismos para generar dicha condición, el primero es una reducción a nivel de expresión del receptor a insulina, el segundo, se refiere a un incremento en la producción de IL-6 y SOCS-3, y el tercero, a la acumulación atípica de triglicéridos. Independientemente de estos tres mecanismos involucrados en la condición de resistencia a la insulina, todavía queda por resolver, cuál de los dos receptores específicos para RBP-4, STRA6 o TLR-4, es el responsable de desencadenar dicha respuesta. Por lo que se propuso resolver dicha pregunta, empleando el fármaco C34, que actúa como antagonista específico del TLR-4. Las células se incubaron en ausencia y presencia de 10 nM de RBP-4 y 10 μ M de C34. Al finalizar el tratamiento, se determinó la

incorporación de glucosa estimulada con insulina. La Figura 13 muestra que 10 nM de RBP-4 reduce la incorporación de glucosa un 30% con respecto a la condición control, tal y como se había descrito previamente, mientras que la presencia de C34 no induce cambio alguno, en cambio, si se bloquea la actividad de TLR-4 con C34, el efecto inhibitorio que ejerce el RBP-4 sobre la incorporación de glucosa es prevenido, manteniendo un valor muy similar a la condición control. Este resultado sugiere fuertemente que la resistencia a la insulina inducido por RBP-4 en el miocito esquelético es mediado por la activación de la proteína TLR-4.

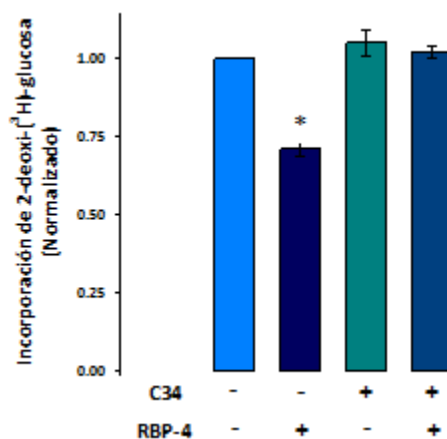


Figura 13. El uso de C34, antagonista de TLR-4, previene el efecto de RBP-4 sobre la capacidad de incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa en miotubos L6. Miotubos L6 fueron pre-tratados con 10 μ m de C34, 30 minutos antes del tratamiento con 10 nM de RBP-4. Los cultivos se mantuvieron por 72 horas, con recambios del medio de cultivo cada 24 horas, repitiendo las condiciones de pre-tratamiento con C34 y de tratamiento con RBP-4. Se cuantificó la incorporación total de glucosa en presencia de insulina, tanto en la condición control como en la tratada con IL-6. Las cpm obtenidas se ajustaron a la concentración de 100 mg de proteínas, y se normalizaron con respecto a los valores ajustados de la condición control ($n= 4$) * $p<0.05$.

Para demostrar que efectivamente, la activación de la proteína TLR-4 está asociada con la resistencia a la insulina en las células L6, se cuantificó la incorporación de glucosa en presencia de un agonista específico para TLR-4, como es el caso de LPS. La presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS por 72 horas reduce de manera significativa la incorporación de glucosa estimulada por insulina, aproximadamente un 20%, un valor muy parecido, al observado en presencia de 10 nM de RBP-4 (Figura 14).

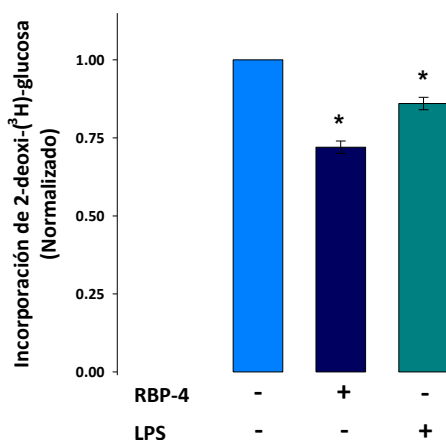


Figura 14. LPS, ligando canónico de TLR-4, reduce la capacidad de incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa en miotubos L6, con un efecto parecido al de RBP-4. Miotubos L6 fueron mantenidos por 72 horas con tratamientos simultáneos de 10 nM de RBP-4 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, recambiándose el medio de cultivo cada 24 horas, se cuantificó la incorporación total de glucosa en presencia de insulina, tanto en la condición control como en los tratamientos con RBP-4 y LPS. Las cpm obtenidas se ajustaron a la concentración de 100 mg de proteínas, y se normalizaron con respecto a los valores ajustados de la condición control ($n=4$) * $p<0.05$.

La activación de la proteína TLR-4 por LPS en el macrófago, induce un incremento significativo en la producción de citocinas pro-inflamatorias, IL-6 y TNF- α , a través de la activación del NF κ -B. Se incubaron las células L6 en presencia de LPS con el fin de evaluar si se comportan de manera parecida a los macrófagos en cuanto a la reacción inflamatoria. LPS induce un incremento de manera significativo en los niveles del ARNm que codifica para IL-6 (Figura 15A) y en los niveles de secreción de dicha citosina (Figura 15B). Además, LPS también estimula la acumulación atípica de triglicéridos en las células L6 (Figura 16).

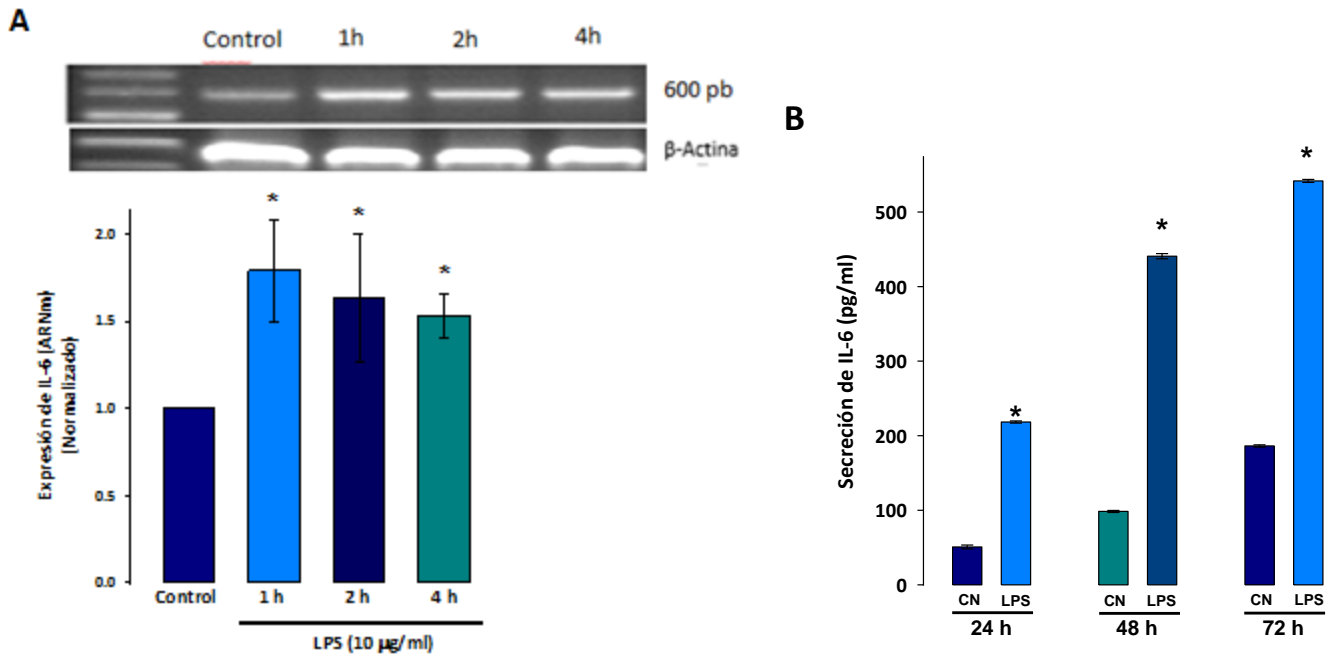


Figura 15. Figura 9. LPS induce incremento en los niveles de expresión de IL-6. Miotubos L6 fueron tratados a diferentes tiempos (1, 2 y 4 horas) 4 con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, a partir de estos cultivos se obtuvo ARN total para hacer RT-PCR y evaluar los niveles de expresión del ARNm que codifica para IL-6; los valores obtenidos tras el análisis densitométrico, fueron ajustados con respecto a los obtenidos de la densitometría del gen endógeno β -Actina y normalizados con respecto a los valores ajustados de la condición control. **B)** Inmunoensayo enzimático (ELISA), a partir de medio condicionado proveniente de cultivos de células L6 tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS para determinar la cantidad de IL-6 producida y secretada, tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento ($n=3$) $*p<0.05$

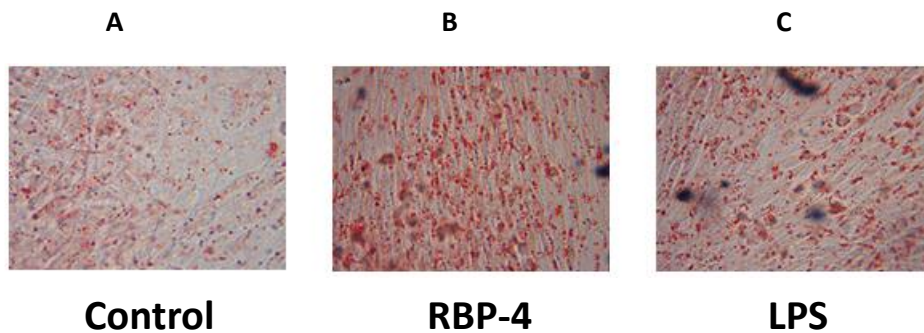


Figura 16. La activación de TLR-4 a través, del ligando endógeno RBP-4 como del ligando exógeno LPS, inducen acumulación de triglicéridos en miotubos L6. Miotubos L6 fueron cultivados por 7 días bajo tres condiciones; condición control, con recambio de medio de cultivo cada 24 horas **(A)**, bajo tratamiento con 10 nM de RBP-4 por 72 horas, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas **(B)** y bajo tratamiento con 5 µg/ml de LPS, con recambio de medio de cultivo y de péptido cada 24 horas **(C)**. Los cultivos de las tres condiciones experimentales fueron fijados y teñidos con rojo oleoso, para obtener micrografías que evidencian la acumulación de triglicéridos **(Objetivo 40x)**.

Estas evidencias permiten sugerir que la activación de la proteína TLR-4 es el punto crítico que induce la resistencia a la insulina en las células L6, y que esta activación puede originarse por un ligando endógeno, como RBP-4, o un ligando exógeno, como LPS.

DISCUSION

La resistencia a la insulina es una condición que precede al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, padecimiento que ocupa la segunda causa de muerte a nivel mundial en la población adulta, tanto en hombres como en mujeres. Un porcentaje importante de personas con obesidad tienen un alto riesgo de presentar resistencia a la insulina, lo que hace suponer que algún factor o factores endocrinos asociados a la condición de obesidad sean responsables de la resistencia a la insulina. El adipocito, además de almacenar energía, secreta una gran cantidad de hormonas, factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias, conocidas en su conjunto como adipocinas. Estudios clínicos han mostrado un correlato positivo entre los niveles plasmáticos de adipocinas, tales como leptina, IL-6, TNF- α , resistina y RBP-4, con la resistencia a la insulina que presentan las personas obesas. Ensayos *in vitro* han evidenciado que la leptina, IL-6, TNF- α y RBP-4 inducen resistencia a la insulina en cultivos de adipocitos, hepatocitos, miocitos y células beta del páncreas, sin conocerse a detalle el mecanismo molecular involucrado. Uno de los indicadores más comúnmente usados para determinar a nivel celular la resistencia a la insulina es cuantificando la incorporación total de 2-deoxi- 3 H-glucosa (2DG- 3 H) estimulada por insulina.

En el año 2005, Yang y colaboradores, mostraron que los adipocitos secretan una nueva adipocina, el RBP-4, péptido capaz de inducir resistencia a la insulina en miocitos esqueléticos y hepatocitos. Por su parte, Berry y colaboradores en el año 2011, identificaron que el RBP-4 en su forma holo (RBP-4 unido a retinol) induce resistencia a la insulina en la línea tumoral de hepatocitos HepG2, al unirse a su receptor de membrana STRA6 y activar la vía de señalización JAK2-STAT5, observándose un incremento en la producción de la proteína SOCS-3, la cual desacopla la vía de señalización activada por insulina. El músculo esquelético es el responsable del 80% de la incorporación de glucosa postprandial, lo que realza su importancia fisiológica en la condición de resistencia a la insulina. Se desconoce hasta el momento el mecanismo a través del cual el RBP-4 induce resistencia a la insulina en miocitos esqueléticos.

Por lo que en el presente estudio nos propusimos estudiar el mecanismo mediante el cual, el RBP-4 induce resistencia a insulina en músculo esquelético, para lo cual utilizamos la línea celular L6, proveniente de músculo esquelético de rata. Esta línea celular presenta de origen un fenotipo de mioblasto, para los ensayos experimentales, los mioblastos los diferenciamos a miotubos, ya que este fenotipo comparte características con los miotubos provenientes de humanos, tales como la expresión de marcadores específicos, transportador de glucosa GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4, entre otros (Sarabia et al., 1990; Wilson et al., 1995; Yap et al., 2007). Las condiciones de cultivo y experimentales a las que fueron sometidos los miotubos no afectaron de manera significativa su viabilidad celular.

Los miotubos L6 al igual que los C2C12, son modelos experimentales ampliamente utilizados para estudiar la resistencia a la insulina, prefiriéndose el uso de los miotubos L6, ya que presentan un mayor efecto sobre la incorporación de glucosa estimulada por insulina que los miotubos C2C12 (Sarabia et al., 1990). Varios grupos de investigación trabajan con miotubos L6 resistentes a la insulina con el fin de poder revertir dicha condición (Wu et al., 2016).

En el presente trabajo, determinamos si la presencia de RBP-4 induce resistencia a la insulina en miotubos L6, para lo cual se consideró como un indicador de dicha condición la incorporación total de 2DG-³H estimulada por insulina, es decir, la que ocurre a través de los transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-4), intercambiadores y otra vías inespecíficas. Es importante mencionar que el transporte de glucosa mediado por GLUT-1, intercambiadores y otras proteínas no es estimulado por insulina, el único modo de transporte de glucosa estimulado por insulina es el que se da a través del transportador GLUT-4, por lo que cualquier diferencia que encontramos en la incorporación total de 2DG-³H estimulada por insulina en presencia de RBP-4, se debe principalmente a cambios en el transporte de glucosa mediado por GLUT-4, transportador relacionado con la resistencia a la insulina.

Los miotubos L6 al ser mantenidos en presencia de 10 nM de RBP-4 por 72 horas presentan una reducción significativa en la incorporación total de 2DG-³H, parámetro empleado para evaluar la resistencia a la insulina. La concentración sérica de RBP-4 en individuos con obesidad y resistencia a insulina es alrededor de 1 μ M. Sin embargo, no se sabe cuál es la concentración que puede llegar a alcanzar RBP-4 en músculo esquelético para inducir resistencia a insulina, y por cuánto tiempo debe durar el estímulo. Por este motivo, y para estandarizar el uso de RBP-4 en nuestros ensayos, decidimos

realizar curvas dosis-efecto y curso-temporal, resultando que usando RBP-4 a 10 nM durante 72 horas, se obtienen miotubos L6 con la característica propia de la resistencia a insulina, capacidad disminuida de incorporar glucosa bajo el efecto de insulina.

Hasta el momento, sólo se sabe que dos tipos de células son capaces de producir RBP-4: los hepatocitos y los adipocitos. La función biológica de cada una de estas células es muy distinta, por lo que la expresión y producción de esta proteína se debe dar bajo diferentes circunstancias. La primera función que le fue caracterizada a RBP-4 fue la de transportar retinol (holo-enzima), siendo el hígado el principal sitio de almacenamiento de retinol, por lo que resulta lógico pensar que la expresión y producción de RBP-4, por parte de este órgano, obedece a la demanda que debe cubrir para distribuir retinol a órganos y tejidos del organismo. Por otro lado, se ha establecido el papel del adipocito en la regulación del metabolismo de glucosa y lípidos, a través de la producción de adipocinas, entre las que se encuentran el RBP-4. Actualmente no se ha demostrado que el adipocito tenga la capacidad de almacenar retinol, por lo que el RBP-4 producido por estas células ésta en su forma libre de retinol (apo-enzima), forma probablemente capaz de regular directamente el metabolismo de glucosa y lípidos.

Esta información indica que el RBP-4 plasmático lo podemos encontrar libre (forma apo) o unido a retinol (forma holo). Trabajos epidemiológicos correlacionan el cociente apo/holo de RBP-4 como el principal indicador predisponente a la resistencia a insulina asociada a la obesidad; cuanto mayor es el cociente apo/holo de RBP-4, mayor es la predisposición de desarrollar la condición de resistencia a insulina (Mills et al., 2008; Erikstrup et al., 2009). Esto sugiere que el RBP-4 proveniente del adipocito es capaz de inducir resistencia a la insulina.

Ensayos de biología molecular y de inmunodetección demostraron que nuestro modelo experimental expresa tanto a nivel de ARNm como de proteína, dos receptores de membrana específicos para unir RBP-4: STRA6 y TLR4. Por lo que decidimos investigar cuál de los dos receptores está involucrado en la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 en los miotubos L6. El uso de C34 y LPS, antagonista y agonista respectivamente de TLR4, dejaron en claro la participación de este receptor en la inducción de la resistencia a la insulina en los miotubos L6. Este dato es reforzado por dos trabajos publicados previamente, el primero de ellos por Berry y colaboradores en el año 2011, quienes mostraron que RBP-4 para inducir resistencia a la insulina en hepatocitos a través de la activación de su

receptor STRA6, era necesario que RBP-4 estuviera unido a retinol; el segundo trabajo, publicado por Norsen y colaboradores en el año 2012, pone en evidencia la capacidad del RBP-4 libre de unirse a la proteína TLR-4 presente en macrófagos para inducir una reacción inflamatoria. Estudios posteriores, corroboran la activación de TLR4 a través de RBP-4 estudiando otras enfermedades (Farjo et al., 2012; Gao et al., 2016), incluso, como un mecanismo para polarizar células efectoras del sistema inmune para promover un microambiente pro inflamatorio (Moraes-Vieira et al., 2014). Estas evidencias nos permiten sumar la activación del TLR4 como mecanismo para inducir resistencia a insulina en los miotubos L6.

Para este estudio, se propuso investigar 3 probables mecanismos por los que el RBP-4 pudiera ser capaz de inducir resistencia a insulina: 1) a través de la disminución de la expresión génica y funcional de elementos que participan en la señalización de insulina, 2) debido a un incremento en los niveles de expresión de una citocina pro-inflamatoria como IL-6 y la proteína SOCS-3, y 3) por la acumulación atípica de triglicéridos, condición que induce la generación de especies lipotóxicas.

Los principales elementos moleculares de la vía de señalización activada por insulina que resultan afectados en la condición de resistencia a insulina son el receptor a insulina y el transportador GLUT-4, por lo que se decidió explorar si RBP-4 es capaz de inducir cambios en los niveles de expresión de esos dos elementos. En primer lugar, se encontró que el RBP-4 tiene un efecto negativo en la expresión del receptor a insulina, mientras que, contrario a lo que esperábamos, hay un incremento en los niveles de expresión de GLUT-4, probablemente debido a un efecto compensatorio. Con estos resultados creemos que, a pesar del incremento en los niveles de expresión de GLUT-4, la disminución en la expresión del receptor a insulina es más que suficiente para reducir la incorporación total de 2DG-³H. Consideramos que el transportador GLUT-4 que se está produciendo en mayor cantidad, se queda acumulado en las vesículas intracelulares, las cuales no se movilizan a la membrana plasmática hasta que no sean fosforiladas por la proteína Akt, activación que depende a su vez de la unión de insulina con su receptor, cuya expresión está disminuida por la presencia de RBP-4. Esta hipótesis pudiera ser corroborada en un futuro por ensayos de inmunofluorescencia, que permitiría determinar la localización subcelular de GLUT-4 en los miotubos L6, tras los tratamientos descritos con RBP-4 para inducir resistencia a insulina.

Con respecto a la activación de TLR4 por RBP-4 en macrófagos, se observa un incremento en los niveles de producción de IL-6 y TNF- α dependiente de la translocación del NF κ -B al núcleo celular. Al

incubar adipocitos en medio de cultivo proveniente de macrófagos estimulados con RBP-4 se induce resistencia a la insulina, observándose un incremento en la expresión de la proteína SOCS-3, la cual desacopla la vía de señalización activada por insulina, explicando de esta manera como las citocinas pro-inflamatorias provenientes de los macrófagos activados con RBP-4 reducen la incorporación de 2DG-3H en los adipocitos.

Los miocitos esqueléticos además de su papel en la capacidad motora del organismo, son capaces de producir de manera local citocinas pro-inflamatorias cuando TLR4 resulta activado (Kim et al., 2012), la liberación de estas citocinas genera un microambiente inflamatorio que pudiera por un lado, ayudar a la remoción de las células musculares muertas o dañadas durante la actividad física, y por otro lado, a regular el metabolismo de carbohidratos y lípidos, que a largo plazo pudiera ser la causa de la resistencia a la insulina.

Resulta importante establecer dos hechos: 1) el RBP-4 es capaz de inducir la expresión y secreción de citocinas pro inflamatorias como IL-6 y TNF- α , en macrófagos a través de la activación de TLR-4 (Norsen et al., 2012); y 2) los miocitos esqueléticos mediante la activación de TLR4 por LPS secretan IL-6 (Kim et al., 2012). Estos hechos apoyan nuestra propuesta experimental, de que la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 en miotubos L6 puede deberse a la expresión de IL-6. Experimentos realizados en el presente trabajo muestran que IL-6 por sí misma reduce la incorporación total de 2DG- 3 H y aumenta los niveles de expresión de la proteína SOCS-3.

Al revisar los resultados obtenidos con RBP-4 e IL-6, se puede observar que en ambas condiciones se presenta el mismo efecto, una reducción en la incorporación de 2DG-3H estimulada por insulina y un aumento en la expresión de la proteína SOCS-3, la diferencia radica en el hecho de que para encontrar el efecto máximo de RBP-4 se requieren 72 horas de tratamiento, mientras que para la condición de IL-6, se requieren solamente 48 horas, este desfase temporal nos sugiere que son dos eventos relacionados en el tiempo, que la resistencia a la insulina inducida por RBP-4 es mediada por la producción previa de IL-6. Una manera de poner a prueba nuestra propuesta es mantener los miotubos L6 en presencia de RBP-4 y un antagonista del receptor a IL-6, si estamos en lo correcto, RBP-4 bajo esas condiciones experimentales deberá ser incapaz de inducir resistencia a la insulina.

El tercer mecanismo propuesto como responsable de la resistencia a la insulina es la acumulación atípica de triglicéridos, fuente para la generación de especies lipotóxicas como DAG y ceramidas, que de manera indirecta desacoplan la vía de señalización de insulina. Estudios anatomohistopatológicos muestran que biopsias de músculo esquelético provenientes de pacientes obesos con resistencia a la insulina y/o diabetes tipo 2, presentan una acumulación atípica de triglicéridos, sugiriéndose como probable factor inductor de la resistencia a la insulina. En este sentido, se decidió evaluar si el RBP-4 además de estimular la producción de IL-6 y SOCS-3, era capaz de inducir la acumulación atípica de triglicéridos en los miotubos L6, con un factor adicional inductor de resistencia a la insulina. La tinción de rojo oleoso deja en claro que efectivamente, RBP-4 estimula la acumulación atípica de triglicéridos, muy probablemente afectando la expresión de enzimas relacionadas a la β -oxidación de lípidos, impidiendo que estos sean transferidos a la mitocondria y se queden acumulando en el citoplasma. De manera muy preliminar, por ensayos de RT-PCR mostramos que RBP-4 reduce el nivel de expresión del PGC1 α , que funciona como factor de transcripción de PPAR γ , el cual está correlacionado positivamente con la β -oxidación de lípidos. Experimentos posteriores contemplan evaluar el nivel de expresión y la actividad de la PPAR γ , así como medir los niveles de las especies lipotóxicas como DAG y ceramida.

Con la finalidad de validar nuestros resultados, es decir, que efectivamente RBP-4 induce resistencia a la insulina en miotubos L6 mediante la activación de TLR4, realizamos experimentos paralelos empleando LPS, ligando exógeno clásico de TLR4. Los resultados obtenidos muestran que LPS, al igual que RBP-4, inducen resistencia a la insulina en nuestra línea celular L6, representada por una disminución en su capacidad para incorporar glucosa bajo el estímulo de insulina. Además, se pudo observar también que LPS, al igual que RBP-4, indujo un incremento en la expresión y secreción de IL-6 y en la acumulación de triglicéridos.

La activación de TLR-4 por LPS en las células L6, se ha caracterizado en nuestro laboratorio, definiendo que la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, es dependiente de MyD88, que conduce a su vez a la translocación del factor transcripcional NF- κ B; esta información nos permite sugerir que ésta vía muy probablemente es activada RBP-4 al unirse a TLR4. De manera general, proponemos un modelo hipotético mediante el cual el RBP-4 induce resistencia a la insulina en miotubos L6 (Figura 17).

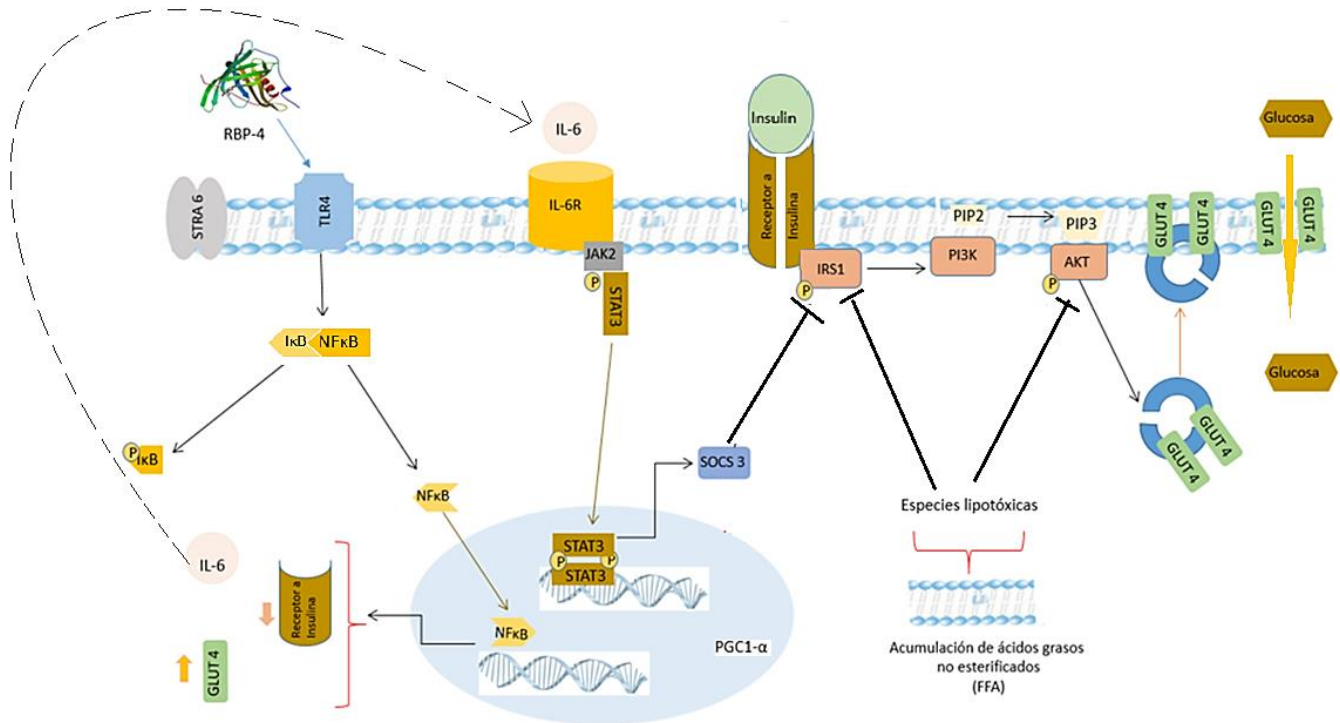


Figura 17. Esquema que representa el papel de la activación de TLR4, a través del ligando endógeno RBP-4, en el desacople de la vía de señalización activada por insulina. RBP-4 es capaz de activar a TLR-4, con lo que desencadena una vía de señalización que lleva a la translocación de factores de transcripción como NfκB, que incrementa los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-6. A su vez, IL-6 inducen resistencia a insulina a través de dos mecanismos: incremento en los niveles de producción de la molécula desacoplante de la señal de insulina SOCS3, además de la acumulación de lípidos, inducida por la disminución de PGC1- α . Aún no sabemos si la activación de TLR4 por parte de RBP4 y LPS inducen de forma directa o indirecta la disminución en los niveles de expresión del receptor a insulina.

CONCLUSIONES

- 1) RBP-4 reduce la incorporación de glucosa estimulada con insulina en células L6. Este efecto depende de la concentración del péptido, así como de la duración del tratamiento.

- 2) La línea celular L6 expresa el receptor STRA6, que es específico para RBP-4.

- 3) La reducción en la incorporación de glucosa inducida por RBP-4 se puede explicar por tres diferentes mecanismos: el primero, una reducción en los niveles de expresión del receptor a insulina, el segundo, un incremento en la producción de IL-6 y la proteína SOCS-3; y tercero, la acumulación atípica de triglicéridos.

- 4) La presencia de IL-6 en el medio extracelular es suficiente para reducir la incorporación de glucosa estimulada por insulina en las células L6, la cual puede explicarse por un incremento en los niveles de expresión de la proteína SOCS-3 que desacopla la vía de señalización de insulina y por una acumulación atípica de triglicéridos.

- 5) Las células L6, al igual que los adipocitos y macrófagos expresan la proteínas TLR-4.

- 6) El efecto inhibitorio del RBP-4 sobre la incorporación de glucosa es mediado por la proteína TLR-4.

- 8) La activación de la proteína TLR-4, ya sea por RBP-4 como ligando endógeno, o LPS como ligando exógeno, induce resistencia a la insulina en las células L6.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad F., Azevedo J.L., Cortright R., Dohm G.L., and Golsdtein B.J. 1997. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest.* 100:449-458.
- Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., and Hemmings B.A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15:6541-6551.
- Argilés J.M., López-Soriano J., Almendro V., Busquets S., and López-Soriano F.J. 2005. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev.* 25:49-65.
- Astrup A., Dyerberg J., Selleck M., and Stender S. 2008. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev.* 9:48-52.
- Bays H., Mandarino L., and DeFronzo R.A. 2004. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:463-478.
- Berry D., and Noy N. 2011. Signaling by vitamin A and retino-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1821:168-176.
- Berry D.C., Jin, H., Majumdar A., and Noy N. 2011. Signalin by vitamin a and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *PNAS.* 108:4340-4345.
- Blaner W. 2007. STRA 6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens. *Cell Metabol.* 5:164-165.
- Blomhoff R., and Blomhoff H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 66: 606-630.
- Boden G., and Shulman G.I. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 32:14-23.
- Borrajo E. 2002. Aspectos actuales de la obesidad. *An Esp Pediatr.* 56:1S-11S.
- Bouchard C. 1997. Genetics of human obesity: recent results from linkage studies. *J Nutr.* 127:188S-189S.
- Brady M.J., Nairn A.C., and Saltiel A.R. 1997. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem.* 272:29668-29703.
- Bray G.A, Bellanger T. 2006. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine.* 29:109-117.
- Brozinick J.T. Jr., Roberts B.R., and Dohm G.L. 2003. Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes.* 52:935-941.
- Buchanan T.A., Xiang A.H., Peters R.K., Kjos S.L., Marroquin A., Goico J., Ochoa C., Tan S., Berkowitz K., Hodis H.N., and Azen S.P. 2002. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk Hispanic women. *Diabetes.* 51:2796-2803.

- Burman P., and Martin R, Lindgren A.C. 2001. Endocrine Dysfunction in Prader-Willi Syndrome: A Review with Special Reference to GH. *End Rev.* 22:787-799.
- Chatterjee P. 2010. Hepatic inflammation and insulin resistance in pre-diabetes – further evidence for the beneficial action of PPAR- γ agonist and a role of SOCS-3 modulation. *Brit J Pharmacol.* 160:1889-1891.
- Chiprut R., Castellanos A., Sánchez C., Martínez D., Cortez M. E., Chiprut R., and Del Conde P. 2001. La Obesidad en el Siglo XXI. Avances en la etiopatogenia y tratamiento. *Gad Méd Méx.* 137:323-331.
- Clark J.M., and Brancati F. 2000. The challenge of obesity-related chronic diseases. *J Gen Intern Med.* 15:828-829.
- Coppack S.W. 2005. Adipose tissue changes in obesity. *Biochem Soc Trans.* 33:1049-1052.
- Corpeleijn E., Saris W., and Black E. 2009. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obesity Rev.* 10: 178-193.
- Costa B., Barrio, F., Cabré J.J., Piñol, J.L., Cos X., Solé, C., and Salas-Salvadó, J. 2012. Delaying progression to type 2 diabetes among high-risk Spanish individuals is feasible in real-life primary healthcare settings using intensive lifestyle intervention. *Diabetologia.* 55:1319-1328.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovic M., and Hemmings B.A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789.
- Cummings D.E. and Schwartz, M.W. 2003. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Ann. Rev. Med.* 54:453-471.
- Dandona P., Aljada A., Chaudhuri A., Mohanty P., and Garg R. 2005. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation.* 111:1448-1454.
- DeFea K., and Roth R.A. 1997. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36:12939-12947.
- DeFronzo R.A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 88:787-835.
- DeFronzo R.A., Tobin J.D., and Andres R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Amer. J. Physio.* 237(3): 214-23.
- Diabetes U.K. Diabetes in the UK 2010: Key statistics on diabetes. Diabetes UK; 2010. [Consultado 2012 noviembre]. Disponible en: http://www.diabetes.org.uk/Documents/Reports/Diabetes_in_the_UK_2010.pdf.
- Diamond J.M. 1992. Diabetes running wild. *Nature.* 357:362-363.
- Dietze D., Koenen M., Röhrig K., Horikoshi H., Hauner H., and Eckel J. 2002. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes.* 51:2369-2376.
- Dietze-Schroeder D., Sell H., Uhlig M., Koenen M., and Eckel J. 2005. Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors. *Diabetes.* 54:2003-2011.
- Donnelly R., Emslie-Smith AM., Gardner I., and Morris A. 2000. ABC of vascular disease: Vascular complications of diabetes. *BMJ.* 320:1062-1066.

Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E., Cormlish W., Collins S., Loy A.L., Normandin D., Cheng A., Himms-Hagen J., and Chan C.C. 1999. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 283:1544-1548.

Esteve E., Ricart W., and Fernández-Real. 2009. Adipocytokines and insulin resistance. *Diabetes Care*. 32:5362-5367.

Ezzati M., López A.D., Rodgers A., Vander Hoorn S., and Murray C.J. 2002. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *The Lancet*. 360:1347-1360.

Farooqi I.S., Keogh J.M., Yeo G.S., Lank E.J., Cheetham T., and O'Rahilly S. 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med*. 348: 1085-1095.

Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C. H., Prentice, A.M., and O'Rahilly, S. 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 341:879-884.

Farooqi, I.S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J. M., and Dattani, M. T. 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 356:237-247.

Felber J.P., and Golay A. 2002. Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 26:S39-S45.

Ferris W.F., and Crowther N.J. 2011. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovasc J Afr*. 22:147-154.

Finucane M.M., Stevens G.A., Cowan M.J., Danaei, G., Lin, J.K., Paciorek, C. J., and Farzadfar, F. 2011. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 91 million participants. *The Lancet*. 377:557-567.

Flegal K.M. 2005. Epidemiologic aspects of overweight and obesity in the United States. *Physiol Behav*. 86:599-602.

Freidenberg G.R., Reichart D., Olefsky J.M., and Henry R.R. 1998. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin Invest*. 82:1398-1406.

Friedman J.M. 1994. Leptin and the regulation of body weight. *Keio J Med*. 60:1-9.

Gao Z., Hwang G., Bataille F., Lefevre M., York D., Quon M., and Ye J. 2002. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*. 277:48115-48121.

Ginsberg H.N. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest*. 106: 47-53

Godínez S.A., Marmolejo G.E., Márquez E., Siordia J.J. and, Baeza R. 2002. La grasa visceral y su importancia en obesidad. *Rev Endocrinol Nutr*. 10:121-127.

González M, Bastidas BE, Ruiz B, Godínez S, Panduro A. 2002. Funciones Endocrinas de la Célula Adiposa. *Rev Endocrinol Nutr*. 10:140-146.

Graham T.E., Yang Q., Blüher M., Hammarstedt A., Ciaraldi T.P., Henry R.R., and Kahn B.B. 2006. Reinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 354:2552-2563.

Hager J. 2003. Targeting obesity through genetics. *Curr Drug Discov*. 15-19.

Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., and Friedman J.M. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269:543-546.

Haslam D.W., and James W.P. 2005. Obesity. *The Lancet*. 366:1197-1209.

Hernández-Valencia M. 2006. Clinical effects of the alterations that emerge in the signaling mechanisms of the insulin receptor. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 44:383-388.

Hinds T. D., Stechschulte L. A., Cash, H. A., Whisler D., Banerjee A., Yong W., and Sanchez E.R. 2011. Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid and PPAR- γ receptors. *J Biochem Mol Biol*. 286:42911-42922.

Hotamisligil G.S., and Spiegelman B.M. 1994. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 43:1271-1278.

INEGI, Estadísticas vitales. Mortalidad. Consulta en agosto de 2012. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp> .10

International Diabetes Federation. Atlas de Diabetes. Update 2012. 5th edición. [Consultado 2012 diciembre]. Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>.

Jacob S., Mascham J., Rett K., Bretchtel K., Volk A., Renn W., Maerker E., Matthaei S., Schick F., Claussen C.D., and Haring H.U. 1999. Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 48:1113-1119.

Janke J., Engeli S., Boschmann M., Adams F., Böhnke J., Luft F., and Jordan J. 2006. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes*. 55:2805-2810.

Jornayvaz F., Samuel V., and Shulman G. 2010. The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr*. 30: 273-290.

Katsanis N., Lupski J., and Beales P.L. 2001. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet*. 10:2293-2299.

Kawaguchi R., Yu J., Honda J., Hu J., Whitelegge J., Ping P., Wiita P., Bok D., and Sun H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. 315:820-825.

Kawaguchi R., Yu J., Wiita P., Ter-Stepanian M., and Sun H. 2008. Mapping the membrane topology and extracellular ligand binding domains of the retinol binding protein receptor. *Biochemistry*. 47:5387-5395.

Kawaguchi R., Zhong M., Kassai M., Ter-Stepanian M., and Sun H. 2015. Vitamin A Transport Mechanism of the Multitransmembrane Cell-Surface Receptor STRA6. *Membranes*. 5:425-453.

Kershaw E.E., and Flier J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2548-2556.

Kim JA, Park HS, Kang SR, Park KI, Lee DH, Nagappan A, Shin SC, Lee WS, Kim EH, Kim GS (2012) Suppressive effect of flavonoids from Korean Citrus aurantium L. on the expression of inflammatory mediators in L6 skeletal muscle cells. *Phytother Res* 26:1904-1912.

- King H., Aubert R.E., and Herman W.H. 1998. Global Burden of Diabetes, 1995– 2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 21:1414-1431.
- Kivitie-Kallio S., and Norio R. 2001. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. *Am J Med Genet*. 102:125-135.
- Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., Hamman R.F., Lachin J.M., Walker E.A.I. Nathan D.M., Diabetes Prevention Program Research Group. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 346:393-403.
- Kotnik P., Fisher-Posovzky P., and Wabitsch M. 2011. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endoc*. 165: 703-711.
- Krebs M., and Roden M. 2005. Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. *Diabetes Obes Metab*. 7:621-632.
- Kumashiro N., Erion D.M., Zhang D., Kahn M., Beddow S.A., Chu X., and Petersen K.F. 2011. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *PNAS*. 108: 16381-16385.
- Lago F., Dieguez C., Gómez-Reino J., and Gualillo O. 2007. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 3:716-724.
- Lee Y.H., Giraud J., Davis R.J., and White M.F. 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*. 278:2896-2902.
- Li J., DeFea K., and Roth R.A. 1999. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 274:9351-9356.
- Lillioja S., Mott D.M., Spraul M., Ferraro R., Foley J.E., Ravussin E., Knowler W.C., Bennett P.H., and Bogardus C. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*. 329:1988-1992.
- Liu Y.F., Paz K., Herchkovitz A., Alt A., Tennenbaum T., Sampson S.R., Ohba M., Kuroki T., LeRoith D., and Zick Y. 2001. Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem*. 276:14459-14465.
- Lolmède K., Duffaut C., Zakaroff-Girard A., and Bouloumié A. 2011. Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes Metab*. 37:283-290.
- McGarry J.D. 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 51:7-18.
- McGarry, J.D. 1998. Glucose-fatty acid interrelations in health and disease. *Am J Clin Nutr*. 67:500S-504S.
- Meisinger C., Rückert I. M., Rathmann W., Döring A., Thorand B., Huth C., and Koenig W. 2011. Retinol-binding protein 4 is associated with prediabetes in adults from the general population. *Diabetes Care*. 34: 1648-1650.
- Mockus I. 2001. Leptina: Regulación y Asociaciones en la Obesidad. *Salud UIS*. 33: 84-89.
- Moeschel K., Beck A., Weigert C., Lammers R., Kalbacher H., Voelter W., Scheicher E.D., Haring H.U., and Lehmann R. 2004. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1)

attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem.* 279:25157-24163.

Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., and Cheetham C.H. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 387:903-908.

Moreno M.J., and Martínez J.A. 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *Anales Sis San Navarra.* 25:29S-39S.

Mostafaie N., Sebesta C., Zehetmayer S., Jungwirth S., Huber K. R., Hinterberger M., and Krugluger W. 2011. Circulating retinol-binding protein 4 and metabolic syndrome in the elderly. *Wien Med Wochenschr.* 161:505-510.

Mothe I., and VanObberghen E. 1996. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem.* 271:11222-11227.

Munzberg, H., and Myers Jr M.G. 2005. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* 5:566–570.

Muoio D., and Newgard C. 2005. A is for adipokine. *Nature.* 436: 337-338.

Nadler S.T., Store J.P., Schueler K.L., Tanimoto G, Yandell B.S., and Attie A.D. 2000. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:11371-11376.

Ng M., Fleming T., Robinson M., Thomson B., Graetz N., Margono C., and Abraham J.P. 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.* 384:766-781.

Nogueiras R., Wiedmer P., Perez-Tilve D., Veyrat-Durebex C., Keogh J.M., Sutton G.M., and Howles P.N. 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest.* 117:3475-3488.

Norseen J., Hosooka T., Hammarstedt A., Yore M.M., Kant S., Aryal P., and Usheva A. 2012. Retinol Binding Protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing pro inflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun .N-terminal kinase and toll like receptor 4 dependent and retinol independent mechanism. *Mol Cell Biol.* 32:2010-2019.

Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Nota Descriptiva No.312. OMS; 2012. [Consultado 2012 diciembre]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>

Öst A., Danielsson A., Lidén M., Eriksson U., Nystrom F. H., and Strålfors P. 2007. Retinol-binding protein 4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS-1 and ERk1/2 in primary human adipocytes. *FASEBJ.* 21:3696-3704.

Ouchi N., Parker J.L., Lugus J.J., and Walsh K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology,* 11:85-97.

Pan D.A., Lillioja S., Kriketos A.D., Milner M.R., Baur L.A., Bogardus C., and Storlien L.H. 1997. Skeletal muscle trygliceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes.* 46:983-988.

Pederson T.M., Kramer D.L., and Rondinone C.M. 2001. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50:24-31.

- Pender C., Goldfine I.D., Kulp J.L., Tanner C.J., Maddux B.A., MacDonald K.G., Houmard J.A., and Youngren J.F. 2005. Analysis of insulin-stimulated insulin receptor activation and glucose transport in cultured skeletal muscle cells from obese subjects. *Metabolism*. 54:598-603.
- Petersen K., and Shulman G. 2006. Etiology of insulin resistance. *American J Med*. 119:105-165.
- Pi-Sunyer F.X. 1993. Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med*. 119:655-660.
- Rasouli N., and Kern P. 2008. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 93:S64-S73.
- Reaven G.M. 1995. The fourth musketeer—from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*. 38:3-13.
- Reaven GM. 1992. The role of insulin resistance and hyperinsulinemia in coronary heart disease. *Metabolism*. 41:16-19.
- Saltiel A.R. 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104:517-529.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1985. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*. 1982:545S-452S.
- Sarabia V, Ramlal T, Klip A (1990) Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture. *Biochem Cell Biol* 68:536–542
- Schmitz-Peiffer C. 2000. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle. Mechanism induced by lipid oversupply. *Cell Signal*. 12:583-594.
- Seedo S. 2000. Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the assessment of obesity management. *Med. Clin*. 115:587-597.
- Sell H., Dietze-Schroeder D., and Eckel J. 2006. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 17:416-422.
- Shaker O., El-Shehaby A., Zakaria A., Mostafa N., Talaat S., Katsiki N., and Mikhailidis D. P. 2011. Plasma visfatin and retinol binding protein-4 levels in patients with type 2 diabetes mellitus and their relationship to adiposity and fatty liver. *Clin Biochem*. 44:1457-1463.
- Simón E., and Del Barro, A.S. 2002. Leptina y Obesidad. *Anales Sis San Navarra*. 25: 53-64.
- Simons K., and Eehalt R. 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. 110: 597-603.
- SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud. Mortalidad. Principales causas de mortalidad general. 2010. Consultada el 22 de octubre de 2011.
- Skurk T., Alberti-Huber C., Herder C., and Hauner H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 1023-1033.
- Stevens G., Rivera-Dommarco J., Carvalho N., and Barquera S. 2008. Characterizing the epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLOS Medicine*. 5:1-11.

- Sun X.J., Crimmins D.L., Myers M.G., Miralpeix M., and White M.F. 1993. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol.* 13:7418-7428.
- Sundelin J., Eriksson U., Melhus H., Nilsson M., Lundvall J., Båvik CO., Hansson E., Laurent B., and Peterson P.A. 1985. Cellular retinoid binding proteins. *Chem Phys Lipids.* 38:175-185.
- Tirosh A., Potashnik R., Bashan N., and Rudich A. 1999. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 274:10595-10602.
- Tordjman K.M., Leingang K.A., James D.E., and Mueckler M.M. 1989. Differential regulation of two distinct glucose transporter species expressed in 3T3-L1 adipocytes: effect of chronic insulin and tolbutamide treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:7761-7765.
- Trayhurn P. 2005. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. *Endocrinology.* 146:1003-1005.
- Unger R.H., and Orci L. 2000. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24:S28-S32.
- Valenzuela A. 2004. Tejido adiposo: algo más que grasa corporal. *Rev Esp Obes.* 2:327-350.
- Van der Kaay J., Batty I.H., Cross D.A., Watt P.W., and Downes C.P. 1997. A novel, rapid, and highly sensitive mass assay for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃) and its application to measure insulin-stimulated PtdIns(3,4,5)P₃ production in rat skeletal muscle in vivo. *J Biol Chem.* 272:5477-5481.
- Villalpando S., Shamah-Levy T., Rojas R., and Aguilar-Salinas C.A. 2010. Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. *Salud Pública Mex.* 52:S72-S79.
- Warram J.H., Martín B.C., Krolewski A.S., Soeldner J.S., Kahn C.R. 1990. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic patients. *Ann Intern Med.* 113:909-915.
- Wellen K.E., and Hotamisligil G.S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112:1785-1788.
- White M.F. 1988. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* 182:3-11.
- White M.F., Livingston J.N., Backer J.M., Lauris V., Dull T.J., Ullrich A., and Kahn C.R. 1998. Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell.* 54:641-649.
- Wilson CM, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A (1995) Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. *FEBS Lett* 368:19-22.
- Wolf G. 2007. Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr. Rev.* 65:385-388.

- Wolf G. 2007. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nut Rev.* 65:251-256.
- World Health Organization. 2014. Obesity and overweight. Fact sheet N°311. Updated August 2014.
- Worm D., Vinten J., Staehr P., Henriksen J. E., Handberg A., and Beck-Nielsen H. 1996. Altered basal and insulin-stimulated phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity in skeletal muscle from NIDDM patients compared with control subjects. *Diabetologia.* 39:1208-1214.
- Wu Y, Lu H, Yang H, Li C, Sang Q, Liu X, Liu Y, Wang Y, Sun Z (2016) Zinc stimulates glucose consumption by modulating the insulin signaling pathway in L6 myotubes: essential roles of Akt-GLUT4, GSK3 β and mTOR-S6K1. *J Nutr Biochem* 34:126-135.
- Yang Q., Graham T.E., Mody N., Preitner F., Peroni O.D., Zabolotny J.M., and Kahn B. B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 436:356-362.
- Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, Ashida H (2007) Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology* 55:103-8
- Yoshilazu T., Sakaue H., and Kasuga M. 2006. RBP4, an unexpected adipokine. *Nature Med.* 12:30- 31.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., and Friedman J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.
- Zierath J., Krook A., and Wallberg-Henriksson. 2000. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia.* 43:821-835.