



Universidad de Valladolid

Programa de Máster en Investigación Biomédica

Papel de las Quimerinas en el Metabolismo de la Glucosa

Trabajo de Fin de Máster

Presentado por: Evelyn Patricia Silva Concepción

Tutora: Dra. María José Caloca Roldán

Valladolid, junio de 2022

Tabla de contenido

Abstract	4
Siglas y abreviaturas	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Vía de señalización celular de la insulina	6
1.1.1. <i>Vía de señalización PI3K/AKT</i>	7
1.2. Resistencia a Insulina	8
1.2.1. <i>Resistencia a la insulina inducida por lípidos</i>	9
1.3. La Proteína Rac1	10
1.3.1. <i>Ciclo de activación de Rac</i>	11
1.4. Las quimerinas	12
1.5. Asociación de las proteínas Rac y β2-quimerina con la diabetes	13
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo general	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	15
4.2. Estimulación con insulina y preparación de lisados celulares	15
4.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección	15
4.4. Análisis por densitometría	16
4.5. Análisis de la formación de gotas lipídicas en células HepG2	16
4.6. Transfección de siRNA	17
4.7. Extracción de ARN	17
4.8. PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR)	18
4.9. Detección de los productos amplificados por q-RT-PCR	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Efecto de la concentración de glucosa en la activación de AKT por insulina en células HepG2	19
5.2. Efecto los ácidos grasos en la activación de AKT por insulina en células HepG2	20
5.3. Formación de depósitos de lípidos en células HepG2 por el exceso de nutrientes	21
5.4. Efecto de β2-quimerina en la activación de AKT en células HepG2 en condiciones de resistencia a insulina	22
5.5. Formación de gotas lipídicas en células HepG2 que sobreexpresan β2-quimerina	24
5.6. Eliminación de la expresión de β-2 quimerina en células HepG2	26
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES	28
8. BIBLIOGRAFÍA	29

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by the presence of chronic hyperglycemia associated with alterations in carbohydrate, protein and lipid metabolism. Insulin resistance is a condition in which tissues have a decreased response to the action of insulin, especially the liver, skeletal muscle and adipose tissue. It is currently known that, as a consequence of excess dietary lipids or obesity, there is an excessive increase of these acids in the bloodstream, causing free fatty acids (FFA) and their metabolic intermediates to act as important inducers of insulin resistance. The Rac1 protein is a small monomeric G protein that belongs to the Rho family of protein GTPases, and are important players in the regulation of glucose uptake and glucose metabolism in the body. Rac1 is regulated by a family of proteins called chimerins, which are the only GAPs capable of binding DAGs. To study the role of chimerins in glucose metabolism, we developed an in vitro model of insulin resistance in HepG2 cells, and also evaluated the effect of overexpression of this protein in this cell line.¹ High glucose concentration and palmitic acid treatment cause impaired insulin signaling in HepG2 cells and can induce lipid deposition. Furthermore, overexpression of β 2-chimerin improves insulin response in conditions of insulin resistance produced by high glucose concentration, while it has no effect on that produced by palmitic acid.

Siglas y abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGL: Ácidos Grasos Libres

AGS: Ácidos Grasos Saturados

AKT: Proteína quinasa B

AMP: Adenosín monofosfato

ARN: Ácido ribonucleico

AS160 Sustrato de Akt de 160 kDa

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: Albúmina de suero bovino

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DGKs: diacilglicerolquinasas

DM: Diabetes Mellitus

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHNA: Esteatohepatitis no alcohólica

ERK: quinasa regulada extracelularmente

FoxO: Forkhead box O

GAP: Proteína Activadora de GTPasas

GDI: Inhibidores de la Disociación de nucleótidos de guanina

GDP Guanosin difosfato

GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina

GFP: Proteína Fluorescente Verde

GLUT4: Transportador de glucosa

GSK3 Glucógeno sintasa quinasa

GTP Guanosin trifosfato

IR: Receptor de Insulina

IRS-1: Sustrato Receptor de Insulina

MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno

MEK: proteínas quinasa responsables de la fosforilación de ERKs

mTORC: Mammalian target of rapamycin complex 1

PAK: Kinasas activadas por p21

PBD: Dominio de Unión a p21

PBS: Tampón fosfato salino

PCK: Proteína quinasa C

PDK1: quinasa dependiente de fosfoinositidos-1

PDE3B: Fosfodiesterasa 3B

PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato

PKDs: proteínas quinasa D

PMA: Acetato de forbol miristato

PTB: dominio de unión a fosfotirosinas (PTB)

Raf: serina-treonina quinasas citosólicas específicas activadas por Ras

Ras: proteína GTPasa RAS (rats sarcoma)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Ser: Serina

SH2: dominio de homología 2 a Src (Src Homology 2) domain

SREBP1: Sterol regulatory element binding protein

TBST: Tampón salino Tris con Tween

Thr: treonina

Tyr: tirosina

1. INTRODUCCIÓN

Los niveles de glucosa en sangre están sometidos a un control estricto de manera que, en individuos sanos, se mantienen dentro de unos márgenes muy estrechos. Tras una comida, los nutrientes se absorben en los intestinos y entran en la circulación. Esto da lugar a un aumento transitorio postprandial de la glucosa en sangre y de los ácidos grasos libres. La glucosa en sangre vuelve rápidamente a la línea de base debido a un aumento de la secreción de la hormona insulina de las células β del páncreas. Cuando está en circulación, la insulina estimula la captación de glucosa en el músculo esquelético y en el tejido adiposo, junto con la inhibición de la producción hepática de glucosa. De este modo, la insulina devuelve la glucosa en sangre a niveles basales. Estos procesos están significativamente desregulados en condiciones metabólicas disfuncionales, como la diabetes y la obesidad [1].

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, de la sensibilidad a la acción de la hormona, o de ambas, en algún momento de su evolución [2].

El desarrollo de la Diabetes Mellitus Tipo 2 está provocado principalmente por dos mecanismos patogénicos: (a) un progresivo deterioro de la función de las células de los islotes pancreáticos que provoca una disminución de la síntesis de insulina y (b) una resistencia de los tejidos periféricos a la insulina que da como resultado un descenso de la respuesta metabólica a la insulina [3].

La insulina es una hormona peptídica segregada por las células β de los islotes de Langerhans, que mantiene los niveles normales de glucosa en sangre facilitando la captación celular de glucosa, regulando el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas y promoviendo la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitógenos [4].

1.1. Vía de señalización celular de la insulina.

La vía de señalización celular de la insulina es un proceso complejo que consta de varios pasos. Todo comienza con la autofosforilación de la cadena beta del receptor de insulina que activa el sustrato del receptor de insulina (IRS 1/2). La activación del IRS activa dos rutas principales: la ruta de PI3K/AKT, responsable de la acción metabólica de la insulina y la ruta de RAS-MAPK, que promueve las acciones mitogénicas de la insulina a través de la activación las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) (Figura 1) [5].

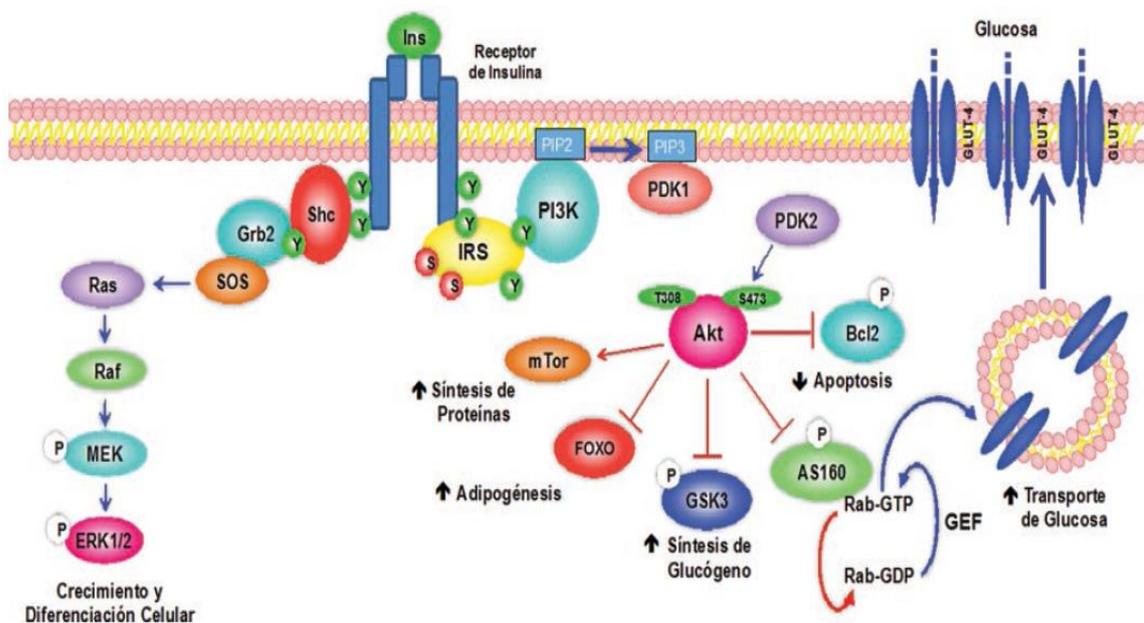


Figura 1: Vías de señalización de la insulina. Tras ser activado, el receptor de insulina recluta y fosforila principalmente dos proteínas adaptadoras: IRS y Shc. Estas proteínas desencadenan diferentes cascadas de señalización intracelular. Las vías mediadas por el IRS incluyen la PI3K/Akt, que desempeña un papel crucial en la activación y regulación de diversos eventos metabólicos, incluyendo el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos. En el caso de la proteína Shc, está asociada a la activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que regula las funciones proliferativas y de crecimiento. Modificada de Vázquez-Jiménez, JG et al. (2017)

1.1.1. Vía de señalización PI3K/AKT.

La proteína quinasa B (AKT) es el principal componente de la vía de señalización de la insulina que desempeña varias funciones cruciales en diversos aspectos del organismo, como la regulación del metabolismo, la homeostasis energética y la proliferación y muerte celular, especialmente en los tejidos hepáticos, musculares, renales y cerebrales [6].

La vía crítica que vincula a las proteínas IRS con las acciones metabólicas de la insulina es la vía de la PI3-quinasa (PI3K) y AKT. La PI3-quinasa es un heterodímero compuesto por una subunidad reguladora y otra catalítica, cada una de las cuales se presenta en varias isoformas. El reclutamiento y la activación de la PI3K depende de la unión de los dos dominios SH2 de la subunidad reguladora a las proteínas IRS fosforiladas en tirosina. Esto da lugar a la activación de la subunidad catalítica, que fosforila rápidamente el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para generar el segundo mensajero lipídico fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Este último recluta a AKT a la membrana plasmática, lo que permite su activación por fosforilación [5].

Cuando se activa la vía de señalización, AKT es fosforilada en Thr308 por PDK1. En este proceso, la AKT se une al fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), lo que provoca un cambio de conformación y expone el dominio quinasa a la quinasa PDK1 en la membrana celular. Para la máxima activación, la fosforilación en otro residuo de serina (Ser473) por mTORC-2 es esencial para aumentar aún más su actividad.

Después de que AKT es fosforilada en Thr308 y Ser473, entonces ejecuta diversas acciones biológicas fosforilando una serie de proteínas intracelulares descendentes, como los miembros de la familia FoxO, la familia de proteínas Bcl-2, GSK-3 β , y mTOR, entre otros. AKT activa mTORC1, que fosforila e inhibe la proteína 4E-BP1, activa las proteínas ribosomales S6 quinasas S6K1 y S6K2 y SREBP1, y conduce a la regulación de una red de genes que controlan el metabolismo, la síntesis de proteínas y el crecimiento celular [5,6].

La activación de AS160 por AKT está implicada en la captación de glucosa mediada por la insulina. AKT también fosforila e inactiva la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), lo que provoca la activación de la glucógeno sintasa y la acumulación de glucógeno en el hígado. La fosforilación de la PGC-1 α dependiente de AKT regula negativamente la capacidad de la PGC-1 α para promover la gluconeogénesis y la oxidación de los ácidos grasos. La fosforilación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) por parte de AKT da lugar a su activación y a una disminución de los niveles de AMP cíclico, que desempeña funciones importantes en el efecto de la insulina para inhibir la lipólisis en los adipocitos y la secreción de insulina en las células β [5].

Por tanto, las alteraciones en cualquiera de los pasos de la cascada de señalización de la insulina pueden conducir a una resistencia a la insulina [7].

1.2. Resistencia a Insulina.

La resistencia a la insulina (IR) es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a la insulina dejan de hacerlo. De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, con aumento de la producción de glucosa hepática [8].

A nivel fisiológico, el hígado y el músculo esquelético son los dos órganos clave que responden a la insulina y son responsables de la mayor parte de la eliminación de glucosa después de una comida. Los estudios *in vivo* han demostrado que un defecto en la síntesis de glucógeno muscular estimulada por la insulina, debido a un defecto en el transporte de glucosa muscular, es crucial para la resistencia a la insulina en el músculo. En el hígado, los defectos en la síntesis de glucógeno hepático estimulada por la insulina y el aumento de las tasas de gluconeogénesis hepática, son los

principales factores que contribuyen a la resistencia a la insulina y a la hiperglucemia en ayunas [9].

Las causas moleculares de la resistencia a la insulina son diversas: involucra defectos en la unión de la insulina a su receptor y alteraciones posteriores a dicha unión. Entre estas se encuentran la disminución en el número de receptores de insulina y de la actividad de las quinasas PI3K y Akt, defectos en la expresión y la función del transportador GLUT4, y aumento de la fosforilación en residuos de serina/treonina de proteínas como el receptor de insulina o IRS, siendo este último mecanismo clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina [8].

El mecanismo de la resistencia a la insulina no se limita a la alteración de la señalización de la insulina, sino que también implica la compleja interacción de múltiples vías metabólicas. El análisis reciente de grandes conjuntos de datos generados por estudio metabolómicos y lipidómicos ha revelado el papel de metabolitos como los lípidos (ácidos grasos saturados e insaturados, ésteres ramificados de ácidos grasos hidroxilados, diacilglicerol, esfingolípidos, ceramidas y fosfolípidos) en la modulación de la sensibilidad a la insulina [10].

1.2.1. Resistencia a la insulina inducida por lípidos.

Actualmente se conoce que, como consecuencia del exceso de lípidos de la dieta o en la obesidad, se presenta un incremento excesivo de estos ácidos en el torrente sanguíneo, provocando que los ácidos grasos libres (AGL) y los intermediarios de su metabolismo actúen como importantes inductores de resistencia a la insulina. Además, la acumulación de lípidos en los hepatocitos provoca un aumento en el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, lo que puede conducir a una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) [10,11].

El DAG se acumula en el músculo esquelético y en el hígado cuando la tasa de aporte de ácidos grasos a estos tejidos supera las tasas de oxidación de grasas intracelulares y/o de conversión en lípidos neutros. En particular, este metabolito es un potente activador de varias isoformas de la Proteína quinasa C PKC (Figura 2) [9,10].

Se ha demostrado que el aumento en los niveles de DAG, por un incremento en plasma de los AGL, promueve la activación de PKC β II y PKC δ en el músculo esquelético de los humanos. La activación de ambas isoformas se ha asociado a la fosforilación en serinas del receptor de insulina y del IRS, lo que conlleva una disminución en el estado de fosforilación en tirosinas en ambas proteínas, afectando su señalización [10].

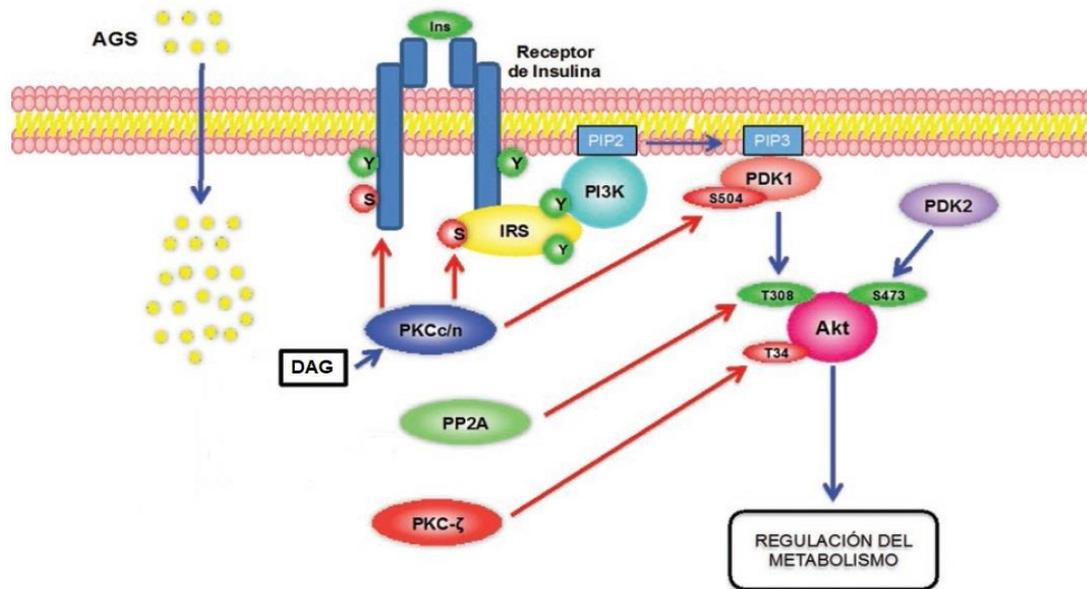


Figura 2: Diacilglicerol (DAG) como mediador de la resistencia a insulina inducida por los AGS. El metabolismo de los AGS conduce a la formación de intermediarios, como el DAG y las ceramidas. El DAG es un potente activador de las PKC clásicas y nuevas, que participan en la regulación negativa de la señalización de la insulina. Además, se han identificado otras dianas de fosforilación de la PKC, como la enzima PDK1, alterando su actividad enzimática y afectando la posterior activación de Akt. Modificada de Vázquez-Jiménez, JG et al. (2017).

1.3. La Proteína Rac1.

La proteína Rac1 es una pequeña proteína G monomérica que pertenece a la familia de proteínas Rho GTPasas, que a su vez forman parte de la superfamilia Ras. La proteína Rac1 tiene un rol fundamental en diferentes procesos celulares, como la reorganización del citoesqueleto de actina, la síntesis de ADN, progresión del ciclo celular, morfogénesis, producción de radicales libres y migración celular. Esta proteína se encuentra distribuida en todos los tejidos y alteraciones en su actividad se han asociado con diversas patologías como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas [12]. Recientemente, distintos miembros de las GTPasas de la familia Rho, entre las que se encuentra Rac1, se han identificado como efectores en la señalización de la insulina, regulando la secreción de insulina en el páncreas y la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo [13].

Varias líneas de investigación sitúan a las Rho GTPasas, en particular Cdc42 y Rac1, como actores importantes en la secreción de insulina estimulada por la glucosa a través de sus funciones en la reorganización del citoesqueleto de actina. En respuesta a un aumento postprandial de la glucosa en sangre, el citoesqueleto de actina de la célula β se reorganiza, permitiendo la translocación de las vesículas que contienen insulina a la membrana plasmática. En circunstancias normales, la activación de Cdc42 y Rac1 es necesaria para este proceso [13].

Las Rho GTPasas Rac1, RhoA y Cdc42 se expresan en gran medida en el músculo esquelético y en el tejido adiposo. La participación de Rac1 en la

translocación de GLUT4 estimulada por la insulina se ha atribuido a una remodelación de la actina mediada por Rac1 en las células del músculo esquelético. El tejido adiposo también es esencial para mantener la homeostasis metabólica y la salud. Las Rho GTPasas podrían desempeñar un papel en la captación de glucosa por parte de los adipocitos al regular la dinámica de las vesículas GLUT4. De hecho, la fusión de las vesículas de GLUT4 con la membrana de los adipocitos requiere una polimerización dinámica de la actina inducida por la insulina, lo que pone de manifiesto la contribución del citoesqueleto de actina en diferentes etapas del proceso de translocación de GLUT4 [13]. Esto sugiere que Rac1 juega un papel determinante en la regulación de la captación de glucosa y en el metabolismo de la glucosa en el organismo.

1.3.1. Ciclo de activación de Rac.

Al igual que otras GTPasas, la proteína Rac puede encontrarse en dos estados conformacionales, un estado inactivo unido al GDP y un estado activo unido al GTP (Figura 3). La regulación de las GTPasas está controlada por tres tipos de proteínas: los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que inducen el cambio de GDP por GTP, promoviendo el paso de la GTPasa a su estado activo; los inhibidores de la disociación de GDP (GDI), que actúan uniéndose a la GTPasa en su estado inactivo e impiden la interacción de esta proteína con los GEF; y las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) que estimulan la hidrólisis de GTP, lo cual conduce a la inactivación de Rac [12].

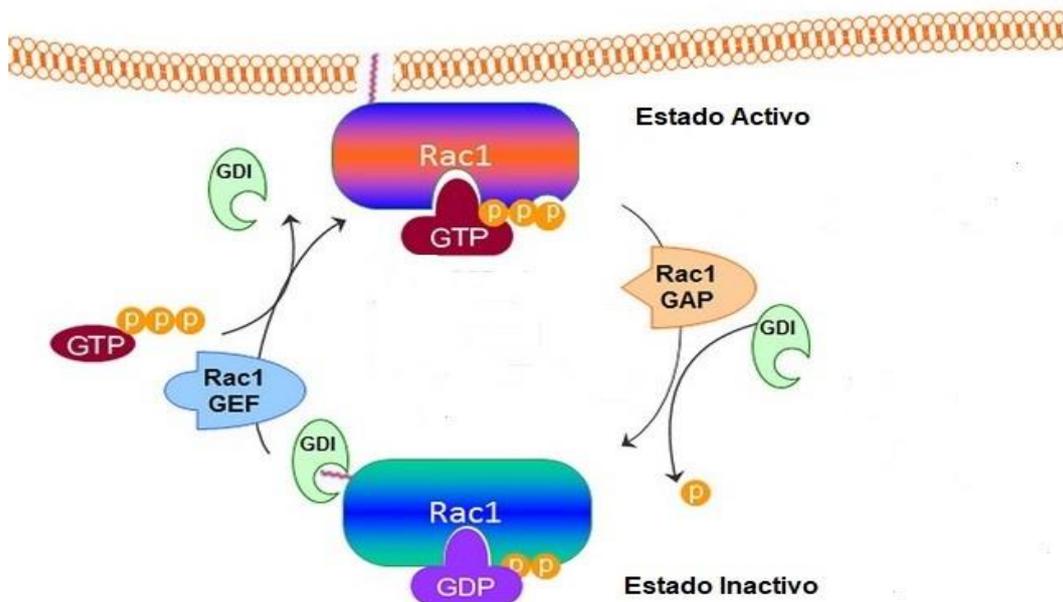


Figura 3: Regulación de Rac1. La proteína Rac1 se encuentra en el citoplasma unida a GDP e interactuando con los GDI, que la mantienen inactiva. Una vez que Rac1 se libera de los GDI, se transloca a la membrana plasmática, donde los GEF promueven el cambio de GDP a GTP (estado activo). Las GAP favorecen la hidrólisis de GTP a GDP, haciendo que la proteína Rac1 vuelva a su forma inactiva.

Tanto las proteínas GEF como las GAP tienen, además de su dominio catalítico, otros elementos estructurales que les permiten interactuar con otras proteínas y lípidos, confiriéndoles funciones adicionales en vías de señalización y en la formación de complejos proteicos. Dentro de estas proteínas reguladoras se encuentran la familia de las quimerinas, que son las únicas proteínas GAP capaces de unir DAG.

1.4. Las quimerinas.

Las quimerinas son GAPs específicas de Rac1, caracterizadas por la presencia de un dominio C1 de unión a DAG. La familia de la quimerina está compuesta por cuatro isoformas codificadas por dos genes diferentes [14]. El gen *CHN1* codifica las isoformas α 1- y α 2-quimerinas; mientras el gen *CHN2* codifica las isoformas β 1- y β 2-quimerinas. α 1- y α 2-quimerinas se expresan principalmente en cerebro, β 1-quimerina se expresa de forma exclusiva en los testículos, en tanto que β 2-quimerina se expresa prácticamente en todos los tejidos. Todas las quimerinas tienen un dominio Rac-GAP junto con el dominio C1; además, las isoformas de tipo 2 presentan una región N-terminal extendida que abarca un dominio de tipo SH2- [15].

Los dominios SH2 están compuestos por cerca de 100 aminoácidos. Comúnmente, las proteínas con dominios SH2 pueden unirse a residuos de tirosina fosforilados y su especificidad está determinada por la secuencia primaria que rodea las fosfotirosinas. El dominio SH2 de las quimerinas conserva las secuencias de unión a residuos de fosfotirosinas; sin embargo, al comienzo del dominio tiene un residuo de ácido glutámico, en lugar de un residuo de triptófano, como la mayoría de los dominios SH2 encontrados en otras proteínas [15]. Se ha demostrado que el dominio SH2 de las quimerinas le permite interactuar con proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas; sin embargo, su función biológica todavía no ha sido del todo establecida [16].

Los dominios C1, inicialmente descritos en las isoenzimas PKC, son estructuras de aproximadamente 50 aminoácidos que le permiten a las proteínas unirse a los lípidos. El dominio C1 de las quimerinas tiene un 40% de homología con el dominio C1 de las PKC, considerándose un dominio C1 típico, es decir, que puede unirse tanto a esteres de forbol como al DAG [15]. El dominio C1 es fundamental para la distribución e inserción de las quimerinas en la membrana plasmática [17].

En condiciones basales las quimerinas se encuentran distribuidas en el citoplasma en una conformación autoinhibida; tras la estimulación de receptores que resultan en la producción de DAG o esteres de forbol, las quimerinas cambian su conformación y exponen su dominio C1. La proteína desplegada se transloca y se distribuye en sitios específicos de la membrana plasmática, donde ejerce su función GAP sobre la proteína Rac1 [18]. Mutaciones puntuales y deleciones del dominio C1 suprimen la translocación de las quimerinas a la membrana plasmática, en respuesta a estímulos con PMA (un análogo de esteres de forbol) [17].

El dominio GAP se ubica en el extremo C-terminal de las quimerinas y está compuesto por alrededor de 150 aminoácidos. Se ha descrito que la actividad GAP de las quimerinas es específica de Rac1, pero no ejerce ningún efecto en otras GTPasas como RhoA y Cdc42. También se ha demostrado que la actividad GAP de las quimerinas se ve estimulada por presencia de fosfatidilserina (PS) y ácido fosfatídico (PA), mientras que los derivados del fosfatidilinositol (PI) la inhiben [19].

1.5. Asociación de las proteínas Rac y β 2-quimerina con la diabetes.

Debido a su papel clave en la captación de glucosa por el músculo esquelético y posiblemente por los adipocitos, las Rho GTPasas son relevantes en las enfermedades metabólicas, incluida la diabetes de tipo 2. La disminución de la señalización de Rac1 en el músculo esquelético se ha asociado a la resistencia a la insulina en sujetos humanos obesos y diabéticos de tipo 2 resistentes a la insulina, así como en ratones ob/ob diabéticos y roedores obesos con resistencia a la insulina inducida por la dieta. Esto también ha sido propuesto por estudios *in vitro* del músculo que muestran que la resistencia a la insulina inducida por la ceramida estaba asociada con marcadas deficiencias en la activación de Rac1 inducida por insulina [13].

Otros estudios recientes muestran que la falta de Rac1 en los músculos de ratones obesos inducidos por la dieta, exacerba la resistencia a la insulina, lo que sugiere la importancia de Rac1 para contrarrestar las disfunciones metabólicas. Estos estudios subrayan la posibilidad de que una actividad comprometida de Rac1 y/o una señalización descendente contribuyan al desarrollo de la resistencia muscular a la insulina [13].

Varios estudios han encontrado que polimorfismos en el gen que codifica para β 2-quimerina (*CHN2*) están asociados con el desarrollo de diabetes y sus complicaciones. En el año 2009 se describió por primera vez cómo una translocación en el gen *CHN2*, que inducía su menor expresión en tejido adiposo, músculo e hígado; estaba relacionado con un grave síndrome de resistencia a la insulina en la mayoría de los miembros de una familia [20].

A pesar de que existe evidencia genética que apoya la asociación entre β 2-quimerina y la diabetes, todavía no se han publicado muchos estudios experimentales que expliquen dicha asociación. En nuestro laboratorio estamos estudiando el papel de β 2-quimerina en la respuesta a insulina y como resultados preliminares se encontró que la sobreexpresión de β 2-quimerina en células de origen hepático afecta a la fosforilación de Akt en respuesta a insulina. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual β 2-quimerina participa en la ruta PI3K/Akt cuando las células son estimuladas con insulina. Para continuar con este estudio, en el presente trabajo nos planteamos estudiar si β 2-quimerina influye en la resistencia insulínica en células hepáticas.

2. HIPÓTESIS

Como se describe en la introducción, Rac1 tiene un papel importante en la homeostasis de la glucosa y una activación anómala de esta GTPasa se asocia con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. El control del ciclo de activación-desactivación de Rac1 se basa en las proteínas GEF y GAP. Teniendo en cuenta los datos de estudios genéticos en humanos, nuestros resultados preliminares y la capacidad de β 2-quimerina de unirse al DAG, mediador clave de la resistencia a la insulina inducida por lípidos, nuestra hipótesis es que β 2-quimerina es esencial en la regulación de los procesos mediados por Rac1 que participan en el control de la homeostasis de la glucosa y que la desregulación de esta proteína contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar el papel de β 2-quimerina en la resistencia a la insulina en células hepáticas.

3.2. Objetivos específicos.

1. Establecer un modelo de resistencia a la insulina en células HepG2.
2. Evaluar el efecto de β 2-quimerina en células HepG2 resistentes a insulina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Para los estudios se han utilizado células HepG2, una línea celular derivada de un carcinoma hepatocelular. Para el mantenimiento de esta línea celular adherente, se ha utilizado el medio DMEM con bajo contenido de glucosa (1 g/l) y alto contenido de glucosa (4,5 g/l), suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal, 1% de Glutamina y 1% Estreptomicina/Penicilina (todos los materiales de Life technologiesTM). Las líneas celulares estables HepG2-GFP y HepG2- β 2-quimerina, se cultivaron en el mismo medio suplementado con 400 μ g/ml de Geneticina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmosfera humidificada con un 10% de CO₂.

4.2. Estimulación con insulina y preparación de lisados celulares.

Para la estimulación con insulina se sembraron $3,0 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos. Tras 24h las células se incubaron en DMEM sin suero durante toda la noche. A continuación, las células se estimularon con dosis crecientes de insulina (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 nM) durante 5 minutos o con 10 nM de insulina a distintos tiempos (0, 5, 10, 15 y 30 minutos). Tras la estimulación, las células se lavaron con solución salina tamponada (PBS) y se lisaron en 200 μ l de tampón de lisis que contiene 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5 mM EDTA, 100nM Na₃VO₄, 100nM DTT, 10% NaDOC, 1mM NaF e inhibidores de proteasas (Cøplete, Roche Molecular Biochemicals). Los lisados se incubaron en hielo 10 minutos y luego se centrifugaron a una temperatura 4°C durante 10 minutos a 12000 rpm. Se recogió el sobrenadante al que se añadió una cantidad igual de tampón de muestra de Laemmli (SPLB) 1x, hirviendo esta mezcla durante 10 minutos.

4.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección.

Para la realización de esta técnica se han utilizado geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras preparadas y el marcador de pesos moleculares (Invitrogen) se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE). Una vez finalizada la electroforesis, se procede a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa para la posterior inmunodetección. Acabada la transferencia, se comprueba la eficiencia de la misma sumergiendo la membrana en una solución de rojo Ponceau al 5%. Esta solución tiñe las bandas de proteína de un color rojo, permitiendo comprobar si las proteínas se han transferido correctamente. Para la inmunodetección se realizaron los siguientes pasos:

Bloqueo de la membrana.

Los lugares de unión inespecíficos se bloquean sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en solución tamponada de TBS-T (25mM Tris-HCl /0,1% de Tween-20) con 5% de leche desnatada (solución de bloqueo), incubando 1 h a temperatura ambiente en un agitador. Pasado este tiempo, la membrana se lava 3 veces durante 5 minutos con TBS-T.

Incubación con el anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios utilizados han sido anti-p-AKT (Serina 473) y anti-AKT producidos en conejo (Cell Signalling), y anti-GFP (Covance) producido en ratón. Los anticuerpos se diluyen en solución de 5% BSA en una proporción de 1:1000 y 1:3000 en el caso de anti-GFP. La incubación se realiza durante toda la noche a 4°C en un agitador. Transcurrido este tiempo, la membrana se lava 3 vez durante 5 minutos con TBS-T.

Incubación con el anticuerpo secundario.

El anticuerpo secundario utilizado ha sido anti-conejo (Anti-Rabbit) y anti-ratón (anti-Mouse) en una concentración 1:5000 y 1:3000 respectivamente, preparados en solución de bloqueo. Se incuba el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se lava la membrana como se ha descrito anteriormente.

Revelado

Una vez incubada la membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos, revelamos la membrana por quimioluminiscencia utilizando el Kit ECL Western (Thermo Scientific) sobre placas fotográficas en cámara oscura.

4.4. Análisis por densitometría.

Para el análisis por densitometría de los geles de western blot se usó el software Quantity One de BioRad y su aplicación para medir volúmenes. Los valores obtenidos de este proceso fueron posteriormente analizados con Excel para realizar la representación gráfica.

4.5. Análisis de la formación de gotas lipídicas en células HepG2.

En primer lugar, se indujo la formación de gotas lipídicas por medio de la incubación de las células HepG2 en medio con alta glucosa o en medio con los ácidos grasos oleico o palmítico. Para ello, las células HepG2 fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro. Tras 24 horas las células se privaron de suero durante una noche y posteriormente se incubaron durante 24h con 200 µM de oleico o palmítico acomplejados con BSA en una proporción 2:1 (ácido graso:BSA). También se comparó la formación de gotas lipídicas en células cultivadas en medio con alta o baja concentración de glucosa.

Tras las estimulaciones correspondientes, las células, fueron lavadas con PBS y fijadas con formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos. Tras la fijación, las células se lavaron 3 veces con agua MiliQ y luego con isopropanol al 60%. A continuación, se procedió a la tinción de las gotas lipídicas con Oil Red O (6 partes del Stock y 4 partes de agua MiliQ), previamente filtrado, durante 15 minutos. Pasado este tiempo se realizaron varios lavados y se incubaron los cristales con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 100 ng/ml, durante 5 minutos en oscuridad, para visualizar los núcleos. Una vez realizada esta tinción, las células se lavaron con agua MiliQ, y los cristales se montaron sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje Mowiol (7µl por cristal).

Las células se analizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP5 en el Servicio de microscopía del IBGM y las imágenes se procesaron utilizando el programa ImageJ.

4.6. Transfección de siRNA.

Se utilizó un siRNA (Small interfering RNA) específico para β2-quimerina y un siRNA control (scrambled) (Dharmacon). Para la transfección se utilizó el reactivo TransIT-X2 (Mirus). Se cultivaron las células HepG2 en placas de 6 pocillos a una densidad de $6,0 \times 10^5$ células/ml y se incubaron durante la noche. Inmediatamente antes de la transfección se prepararon los complejos TransIT-X2: siRNA. Se colocaron 250 µl de medio de suero reducido Opti-MEM I en un tubo estéril y se añadieron los siRNA a concentración final de 25 nM por pocillo, pipeteando suavemente para mezclar completamente. A continuación, se añadieron 7,5 µl de TransIT-X2 y pipeteamos para mezclar completamente. Incubamos a temperatura ambiente durante 30 minutos para dar tiempo a que se formen los complejos. Luego añadimos los complejos a las células gota a gota en diferentes zonas de los pocillos. Finalmente, las células se incubaron durante 24 horas y se recogieron para analizar la expresión del gen diana.

4.7. Extracción de ARN.

Para la realización de la extracción del ARNm, se utilizó el reactivo TRIZOL® (Life Technologies) siguiendo los siguientes pasos:

Homogeneizado de la muestra

Se utilizaron las células HepG2 transfectadas con los siRNA. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se añadió 0,4 ml de reactivo TRIZOL directamente sobre las células, a continuación, se lisan las células directamente en la placa de cultivo pipeteando varias veces.

Separación de fases

Tras incubar la muestra homogeneizada durante 5 minutos a temperatura ambiente se añadió 0,2 ml de cloroformo y se agitó el tubo enérgicamente durante 15 segundos. Tras 2-3 minutos a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. De la mezcla de fases obtenidas, el ARN permanece exclusivamente en la fase

acuosa (fase superior) siendo esta de aproximadamente del 50% del volumen total. Se recoge la fase acuosa con cuidado de no tocar la interface ni la fase orgánica, y se la coloca en un nuevo tubo.

Aislamiento de ARN

Para precipitar el ARN, se añadió a la muestra 0,5 ml de isopropanol al 100% y tras 10 minutos a temperatura ambiente se centrifuga la muestra a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. El ARN sedimentado se lava con 1 ml de etanol 75%, se centrifuga a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C y el pellet de ARN se resuspende en agua libre de RNasa. La cantidad de ARN se cuantificó en un NanoDrop y la pureza se estimó mediante la relación A260/280, considerándose óptimo un valor de 1.8-2.0.

4.8. PCR cuantitativa en tiempo real (q-RT-PCR).

Se utilizó el kit QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR (Qiagen) que utiliza SYBR Green I, un colorante fluorescente que se une a todas las moléculas de ADN de doble cadena, dando una emisión fluorescente en la unión.

Se preparó la solución de reacción en un volumen final de 10 µl, añadiendo 5µl de master mix, 0,5µM de primer forward, 0,5 µM de primer reverse, 0,1 µl de QuantiTect RT-mix, y 150 ng de RNA.

A continuación, se programa el termociclador con una etapa de incubación inicial de 15 min a 95°C para activar la HotStarTaq ADN polimerasa, luego se programa el ciclo con las siguientes fases: una fase de desnaturalización de 15s a 94°C; una fase de anillamiento de 30s a 50–60°C; y una fase de extensión de 30s a 72°C, este ciclo se realiza durante 30-40 veces.

La adquisición de datos se debe realizar durante la etapa de extensión midiendo la fluorescencia emitida. Se finaliza realizando el análisis de la curva de melting del producto de PCR; donde se registran los valores en un rango de temperatura que va desde los 65°C a 95°C en aumentos progresivos de 5°C. Los productos de la amplificación se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

4.9. Detección de los productos amplificados por q-RT-PCR.

Los productos de ADN amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La agarosa se preparó en un tampón TBE pH 8,4 (Tris 89 mM, Borato 89 mM, EDTA 2mM) y para la visualización del ADN se le adicionó Gel Red (Biotum). En el gel se cargaron 10 µL de cada muestra más 2 µL del tampón de carga 6X (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,4% y EDTA 1mM). Se aplicó una corriente de 100 voltios durante 30 minutos y después se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador Bio-RAD Gel Doc XR.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de la concentración de glucosa en la activación de AKT por insulina en células HepG2.

Estudios previos demuestran que el tratamiento de las células HepG2 con alta glucosa provoca una reducción significativa de la señalización de la insulina [21]. Con el objetivo de establecer un modelo de resistencia a la insulina *in vitro*, las células HepG2, se cultivaron en medio DMEM con una concentración de glucosa de 4,5 g/L, durante 24h y evaluamos los efectos de la alta glucosa en el metabolismo celular de dicho modelo. Como situación control, también cultivamos esta línea celular en medio DMEM con una concentración de glucosa de 1g/L.

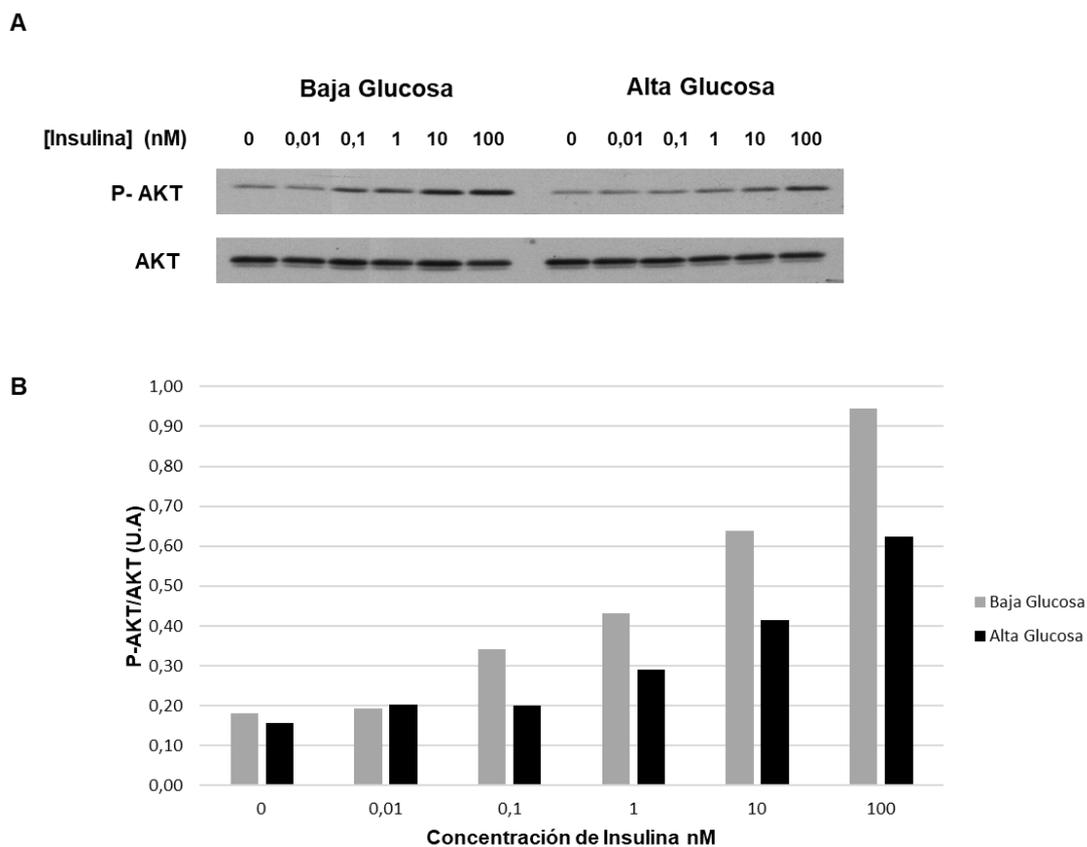


Figura 4: Efectos de la concentración de glucosa en la fosforilación de AKT en respuesta a la estimulación con insulina. A) Western Blot de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) y AKT total (AKT) en lisados celulares tras la estimulación de las células HepG2 con insulina a diferentes concentraciones. B) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P-AKT/AKT total.

Para ello se estimularon las células con diferentes concentraciones de insulina y analizamos la fosforilación de AKT mediante la técnica de Western

Blot. En la figura 4 se evidencia como las células cultivadas en medio con baja glucosa muestran un aumento progresivo en la fosforilación de AKT, a medida que aumenta la concentración de insulina, mientras que las cultivadas en medio con alta glucosa, presentan una marcada disminución en la fosforilación de AKT.

5.2. Efecto los ácidos grasos en la activación de AKT por insulina en células HepG2.

La mayoría de las complicaciones asociadas a los trastornos metabólicos, como la diabetes de tipo 2, la obesidad, la resistencia a la insulina y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), están relacionadas con la hiperglucemia y el aumento de la concentración de ácidos grasos saturados libres en la sangre [22]. Pruebas recientes sugieren que los AGL, específicamente los saturados, pueden regular las proteínas que se activan aguas abajo del IRS, a nivel de la PDK1 y la Akt [10].

Por tal motivo decidimos estudiar el efecto de los ácidos grasos libres en estas células, para lo cual se incubaron durante 24h con 200 μ M de oleico o palmítico conjugados con BSA en una proporción 2:1 (ácido graso:BSA). Las células de control para estas condiciones se trataron sólo con BSA.

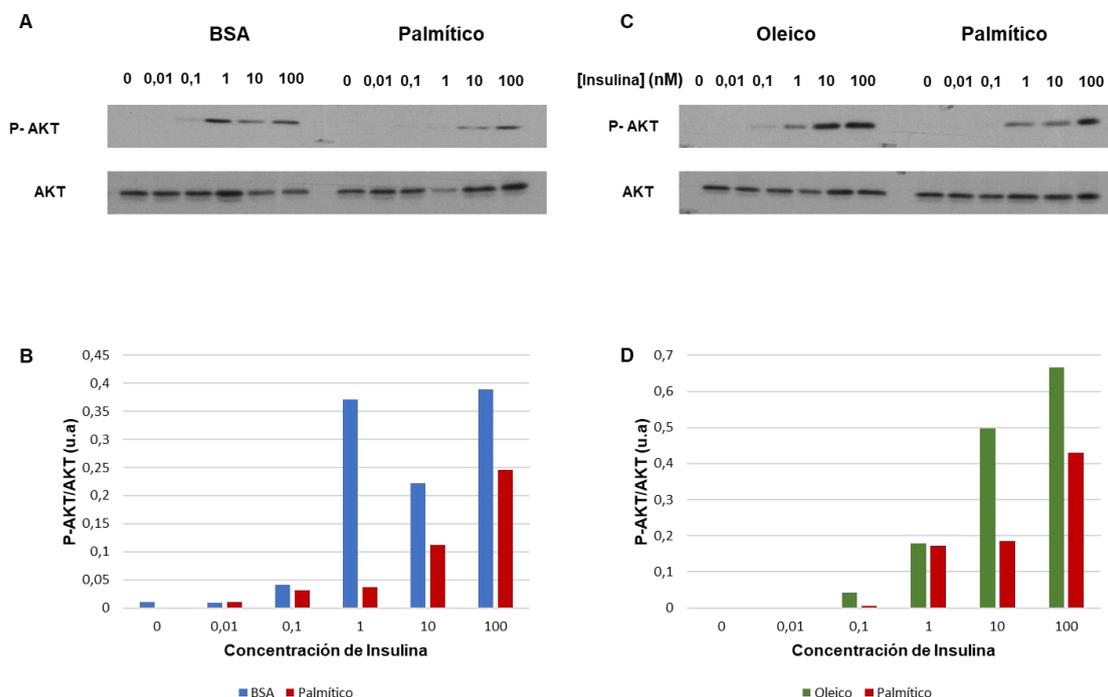


Figura 5: Efecto de los ácidos grasos en la activación de AKT en células HepG2. A) Western Blot de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) y AKT total (AKT) en células tratadas con BSA y Palmítico tras la estimulación con diferentes concentraciones de insulina. B) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P- AKT/AKT total. C) Western Blot de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) y AKT total (AKT) las células tratadas con Oleico y Palmítico tras la estimulación con diferentes concentraciones de Insulina. D) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P- AKT/AKT total.

En primer lugar, se realizó una curva de dosis respuesta con distintas concentraciones de insulina. Tras la estimulación, se analizaron los lisados celulares y observamos una disminución en la fosforilación de AKT en las células que habían sido tratadas con ácido palmítico, mientras que las tratadas con ácido oleico, presentaban unos niveles de fosforilación de AKT similares a las células control (Figura 5).

En segundo lugar, realizamos una estimulación con 10 nM de insulina a distintos tiempos (*time course*) (Figura 6). En este caso, también se puede observar la disminución en la fosforilación de AKT en las células tratadas con palmítico. Además, observamos que, en todas las condiciones, la mayor fosforilación de AKT ocurre a los 5 minutos de realizada la estimulación.

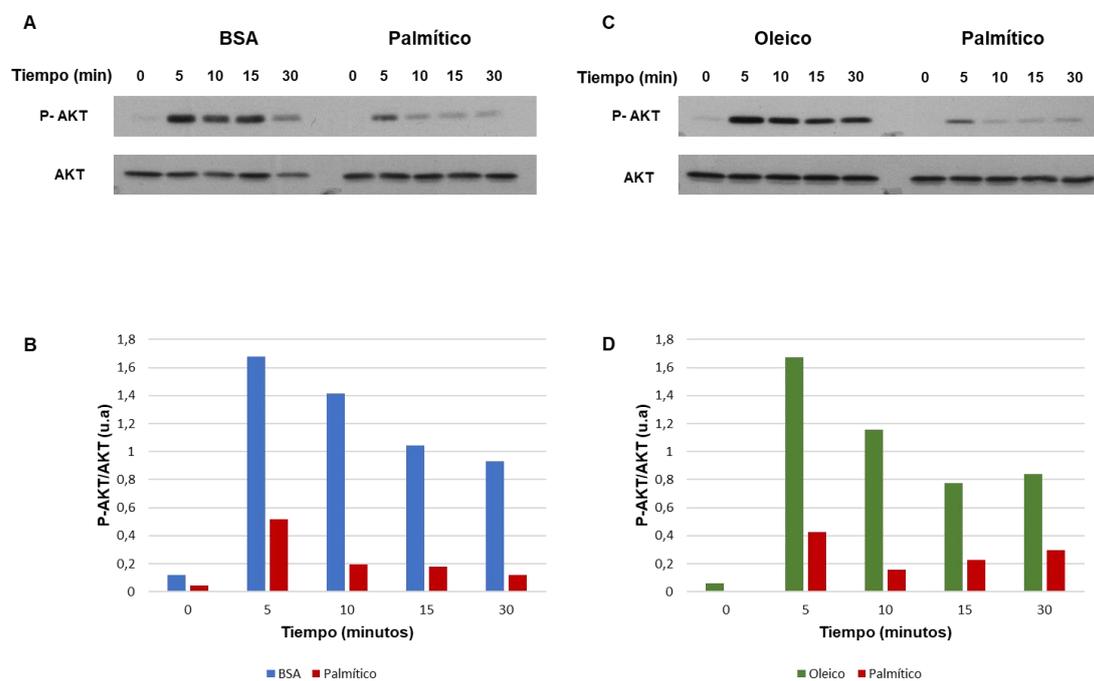


Figura 6: Efectos del aumento de ácidos grasos en la activación de AKT en células HepG2. A) Western Blot de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) y AKT total (AKT) en las células tratadas con BSA y Palmítico tras la estimulación con 10 nM de insulina a distintos tiempos. B) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P- AKT/AKT total. C) Western Blot de los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) y AKT total (AKT) en las células tratadas con Oleico y Palmítico tras la estimulación con 10 nM de insulina a distintos tiempos. D) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P- AKT/AKT total.

5.3. Formación de depósitos de lípidos en células HepG2 por el exceso de nutrientes.

La resistencia a la insulina produce el aumento de la lipólisis del tejido adiposo, lo cual libera una gran cantidad de ácidos grasos libres (AGL) que se acumulan en el hígado y generan la esteatosis hepática. El acúmulo de AGL interfiere a su vez en la resistencia hepática a la insulina y genera alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Por tal motivo decidimos estudiar las condiciones que producen esteatosis en esta línea celular.

Para comprobar los efectos de la alta glucosa y los ácidos grasos (ácido oleico y ácido palmítico) sobre la deposición de lípidos en las células HepG2, las células se cultivaron en condiciones de baja y de alta glucosa en cubreobjetos circulares de 12mm, y se trataron con ácido palmítico y ácido oleico como se describe en Materiales y Métodos. Tanto las células HepG2 cultivadas en alta glucosa como las tratadas con palmítico y oleico mostraron un aumento de los depósitos de gotas lipídicas en el citosol (Figura 7).

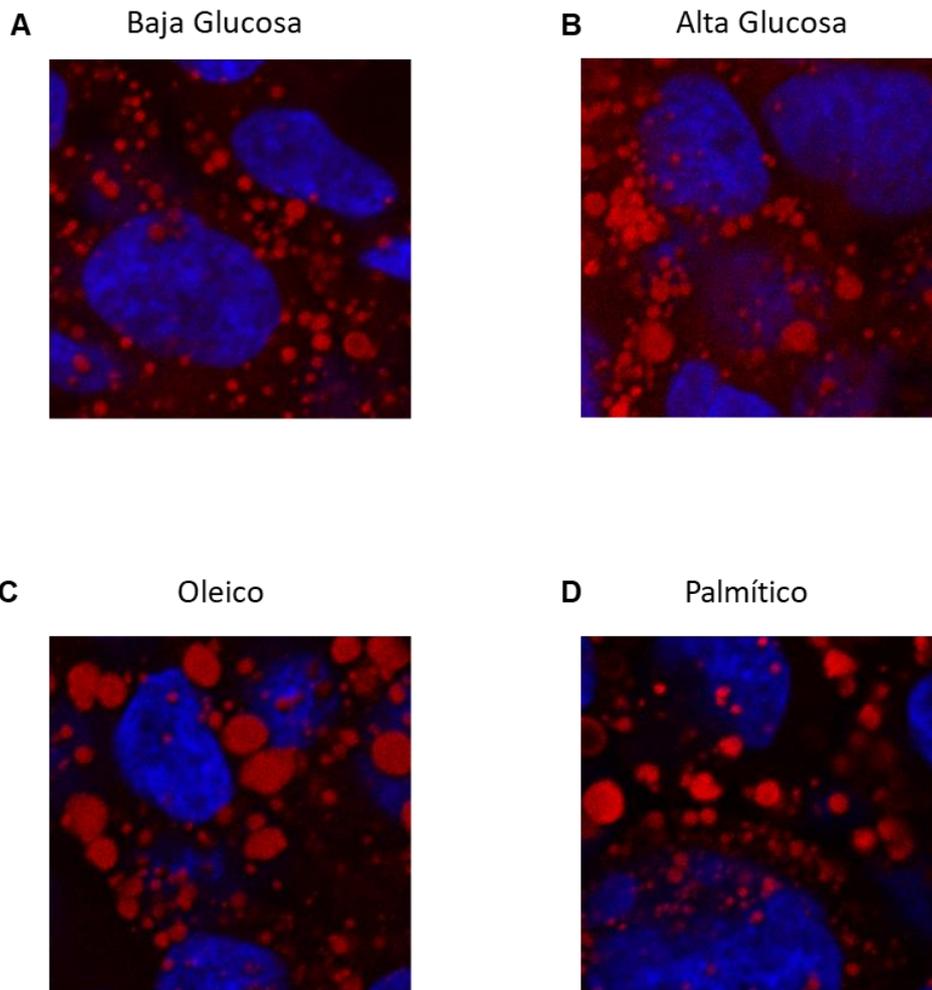


Figura 7: Efecto de la alta glucosa y alto ácido palmítico en la acumulación de lípidos en las células HepG2. Se utilizó Oil Red O para la tinción de las gotas lipídicas y DAPI para la tinción nuclear. Se visualizó con en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (60 aumentos). Las gotas de lípidos aparecen en rojo y los núcleos en azul.

5.4. Efecto de β 2-quimerina en la activación de AKT en células HepG2 en condiciones de resistencia a insulina.

Para evaluar el papel de β 2-quimerina en la señalización de insulina se había generado previamente, en nuestro laboratorio, una línea celular HepG2 que sobreexpresaba la proteína β 2-quimerina fusionada con GFP, además de una línea control que expresaba la proteína GFP. En este trabajo utilizamos estas líneas celulares para determinar si β 2-quimerina afecta a la activación de

AKT en las condiciones en las que observamos claramente de resistencia a la insulina en los experimentos anteriores.

En primer lugar, se determinó el efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de AKT por insulina en distintas concentraciones de glucosa. Para ello, las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de baja y alta glucosa y se estimularon con 10nM de insulina a distintos tiempos. Tras el análisis por Western Blot, se observó en ambas condiciones una mayor fosforilación de AKT en las HepG2 que sobreexpresan β 2-quimerina, en comparación con el control, siendo la diferencia mayor en condiciones de baja glucosa (Figura 8).

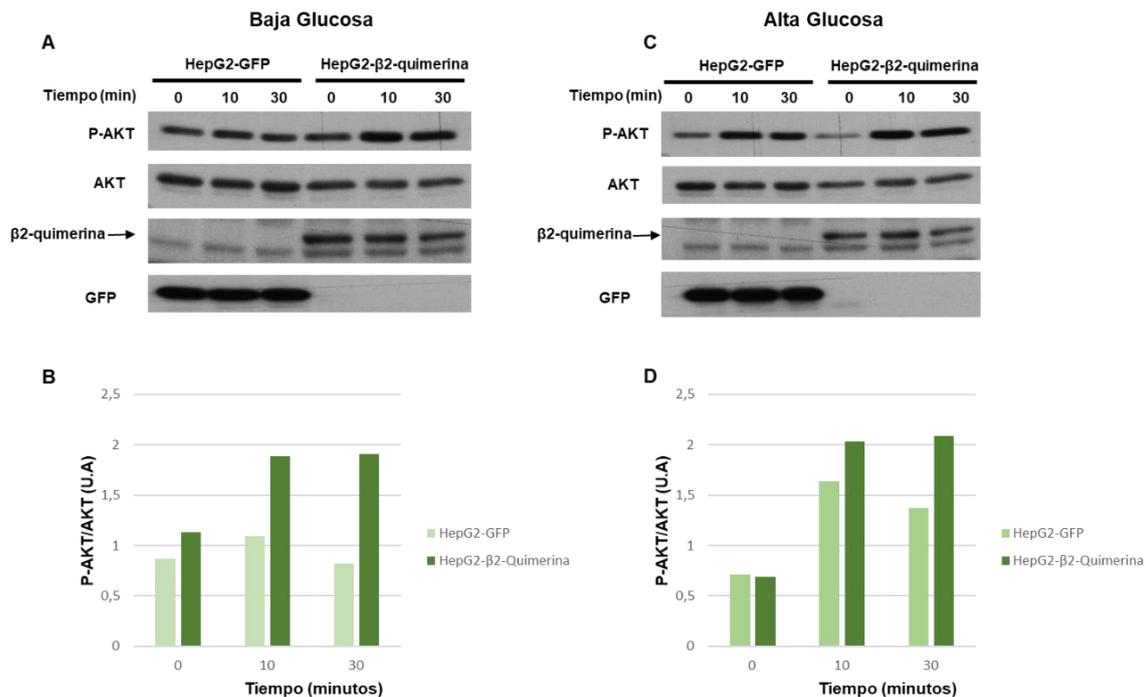


Figura 8: Activación de AKT en células HepG2 que sobreexpresan la β 2-quimerina A) Western Blot de las células en medio con baja glucosa tras la estimulación con 10 nM de insulina a distintos tiempos. B) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P-AKT/AKT total. C) Western Blot de las células en medio con alta glucosa tras la estimulación con 10 nM de insulina a distintos tiempos. D) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P-AKT/AKT total.

En segundo lugar, se analizó el efecto de β 2-quimerina en la fosforilación de AKT por insulina en condiciones de resistencia a insulina inducida por palmítico. En este caso, las células fueron tratadas con ácido palmítico o ácido oleico como control y estimuladas con una concentración de 10 nM de insulina durante 30 minutos, condiciones en las que se observó un efecto más claro de la resistencia a la insulina (Figura 9). Al igual que en el experimento anterior, las células tratadas con palmítico presentan una disminución en la fosforilación de AKT, en comparación con las tratadas con oleico. Sin embargo, en este experimento no se observan diferencias entre las células que sobreexpresan β 2-quimerina y el control.

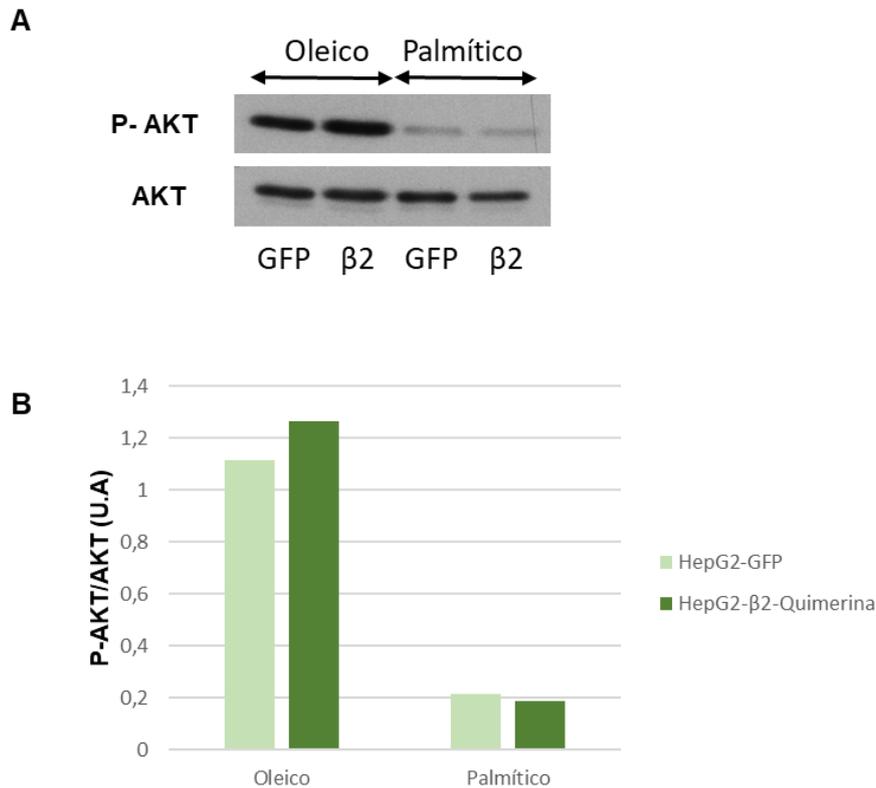


Figura 9: Activación de AKT en células que sobreexpresan β 2-quimerina, tratadas con ácido palmítico y ácido oleico 30 minutos después de la estimulación con 10 nM de insulina. A) Western Blot de los lisados celulares. B) Representación gráfica del análisis por densitometría de la relación P- AKT/AKT total.

5.5. Formación de gotas lipídicas en células HepG2 que sobreexpresan β 2-quimerina.

Además, evaluamos la formación de gotas lipídicas en estas células. Primeramente, se compararon las células cultivadas en baja glucosa y en alta glucosa, observándose un aumento en el acúmulo de lípidos en condiciones de alta glucosa, tanto en las células que sobreexpresan la β 2-quimerina, como en las células control (Figura 10).

Luego analizamos las células tratadas con palmítico y oleico, y comprobamos que, en ambas condiciones, las células muestran un mayor depósito de lípidos en comparación con la situación control, siendo más evidente en las tratadas con palmítico (Figura 11). No se apreciaron diferencias claras ni en el número ni en el tamaño de las gotas lipídicas en las células que sobreexpresan β 2-quimerina, aunque sería necesaria la cuantificación de estos parámetros para tener un resultado concluyente.

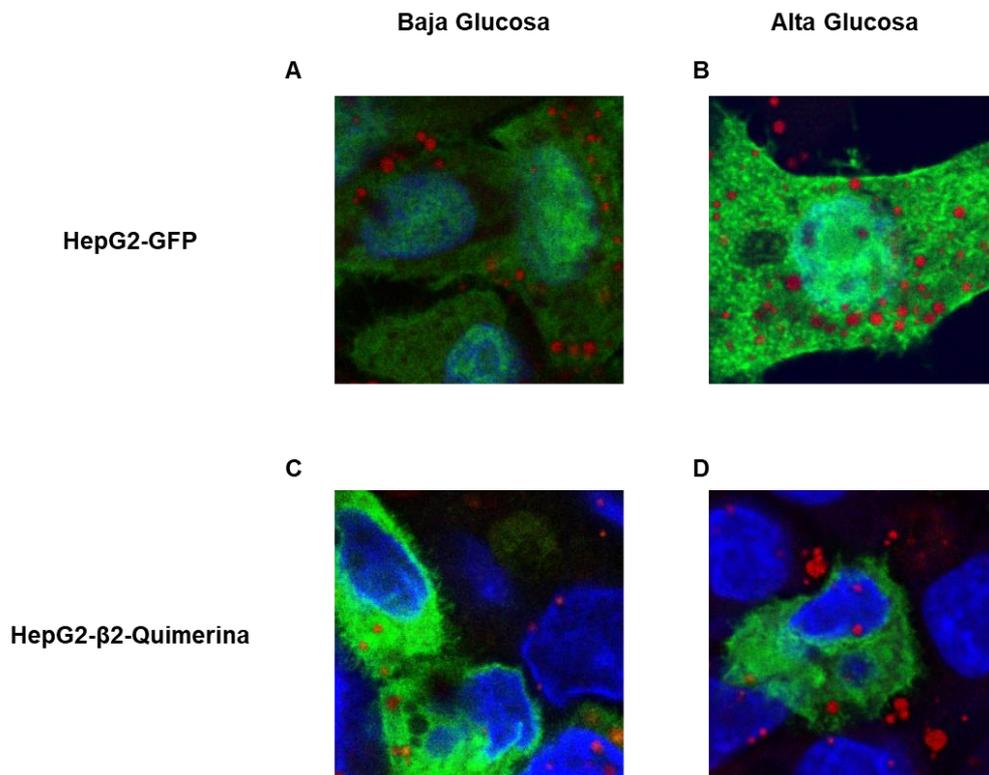


Figura 10: Efecto de la alta glucosa en la acumulación de lípidos. Se utilizó Oil Red O para la tinción de las gotas lipídicas y DAPI para la tinción nuclear. Se visualizó con en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (60 aumentos). Las gotas de lípidos aparecen en rojo, los núcleos en azul y la GFP en verde.

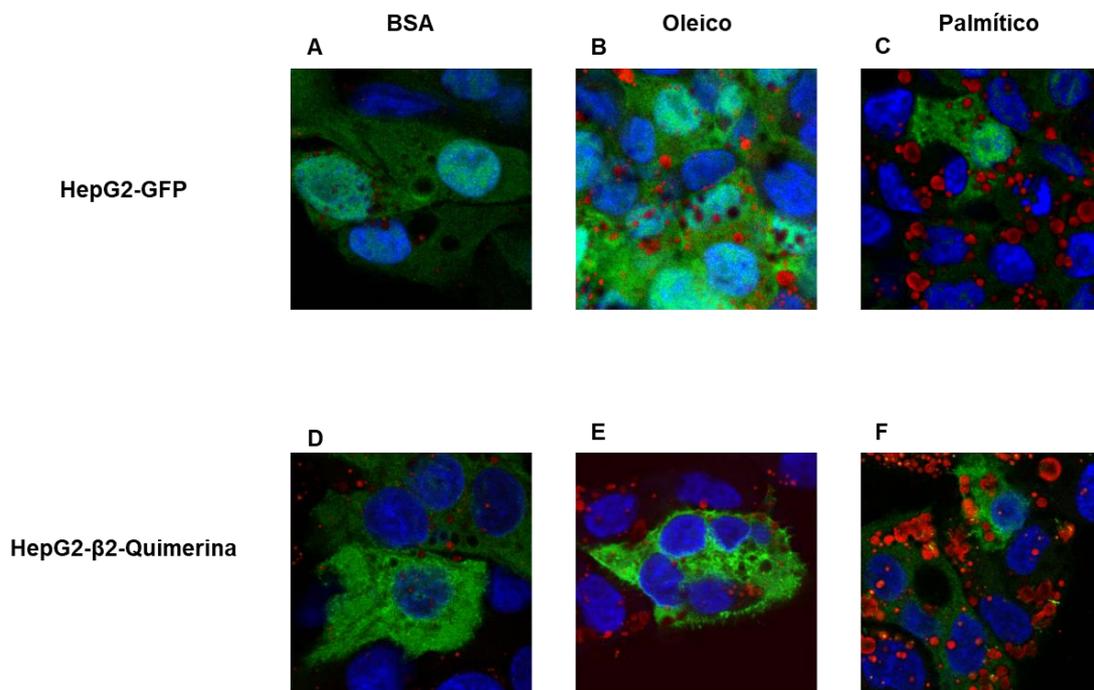


Figura 11: Efecto del ácido palmítico y oleico en la acumulación de lípidos. Se utilizó Oil Red O para la tinción de las gotas lipídicas y DAPI para la tinción nuclear. Se visualizó con en el microscopio confocal Leica TCS SP5 (60 aumentos). Las gotas de lípidos aparecen en rojo, los núcleos en azul y la GFP en verde.

5.6. Eliminación de la expresión de β -2 quimerina en células HepG2.

Para realizar una evaluación más completa del papel de la β 2-quimerina decidimos utilizar la técnica de silenciamiento génico mediante la transfección de siRNA. Se utilizó un siRNA específico para β 2-quimerina y un siRNA control y se llevó a cabo la transfección como se describe en Materiales y Métodos. Luego de 24 horas, se recogieron las células para analizar la expresión del gen diana.

La expresión relativa de β 2-quimerina se determinó mediante la técnica de qRT-PCR usando el método de "delta delta Ct" ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), observándose una disminución de la expresión de un 25%. Los productos amplificados mediante la PCR fueron detectados en un gel de agarosa al 2%, comprobándose que se habían amplificado los fragmentos de ADNc correspondientes a los genes de β 2-quimerina y β -actina (Figura 12).

Debido al que el silenciamiento del gen *CHN2* no fue suficiente, es necesaria la puesta a punto de este protocolo para poder caracterizar el efecto de la eliminación de la expresión de β 2-quimerina en la señalización de insulina en células hepáticas.

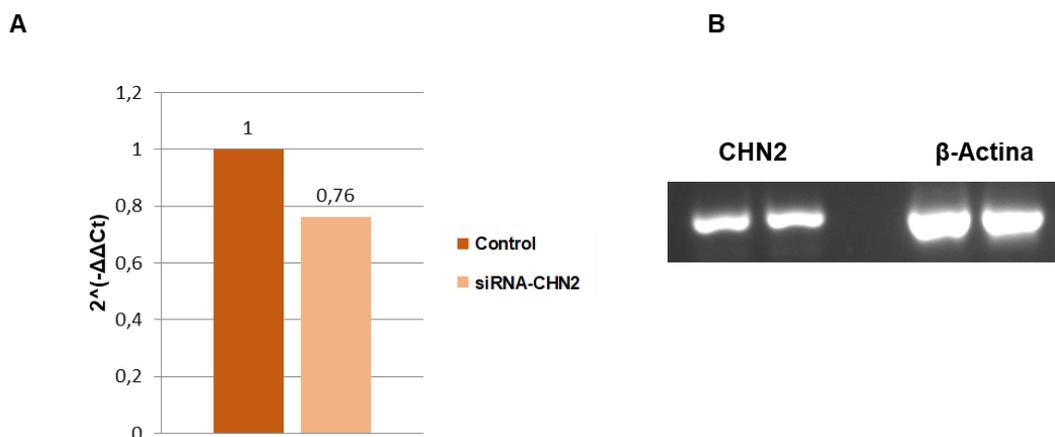


Figura 12: Silenciamiento de la expresión de *CHN2* con siRNA. A) Representación gráfica de la expresión relativa del gen *CHN2* mediante q-RT-PCR. B) Gel de agarosa al 2%, donde se pueden observar los productos amplificados.

6. DISCUSIÓN

En el estado de resistencia a insulina, la señalización de la insulina, desde su interacción con el receptor hasta su acción final, se ve atenuada, lo que conduce a una salida de glucosa hepática incontrolada que provoca hiperglucemia. El aumento de la gluconeogénesis en el hígado de los pacientes diabéticos se considera uno de los principales responsables de la hiperglucemia en ayunas [23]. La glucolipototoxicidad induce el síndrome metabólico, como se observa en la diabetes tipo 2 resistente a la insulina, la obesidad la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y las complicaciones cardiovasculares [22]. Por tal motivo expusimos las células HepG2 a altas concentraciones de glucosa (glucotoxicidad) y ácido palmítico, el ácido graso saturado más abundante (lipotoxicidad) y se analizó la respuesta a insulina de estas células mediante la fosforilación de AKT. En consonancia con los estudios citados anteriormente, nuestros resultados indicaron una menor fosforilación de AKT en las células expuestas a altas concentraciones de glucosa, así como en las tratadas con ácido palmítico. Se ha observado previamente que el uso de ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico, puede conducir a una inducción directa de la acumulación de lípidos en las células HepG2 [24,25], desencadenando una esteatosis hepática. Esta observación fue apoyada de nuevo por nuestros resultados, donde hemos visualizado el aumento de la formación de depósitos lipídicos en las células HepG2 con la tinción Oil Red O.

Las quimeras son una familia de proteínas activadoras de GTPasas (GAP) específicas para Rac, reguladas por diacilglicerol. Numerosas pruebas indican que estas proteínas desempeñan importantes funciones en el metabolismo celular. En un estudio preliminar realizado en nuestro laboratorio, se encontró que la sobreexpresión de β 2-quimerina en células HepG2 aumentaba la fosforilación de AKT en respuesta a la insulina. Siguiendo es línea de investigación, sobre el papel de la β 2-quimerina en el metabolismo de la glucosa en célula hepáticas hemos comprobado que las HepG2 que sobreexpresan esta proteína responden mejor a la insulina, ya que presentan mayor fosforilación de AKT ante la estimulación con esta hormona en condiciones de baja y alta glucosa. Sin embargo, esta diferencia no se observó con el tratamiento con ácido palmítico, donde no se registraron diferencias en la fosforilación de AKT en comparación con el control.

Por último, es importante resaltar que los experimentos se deben repetir al menos dos o tres veces para corroborar su validez en términos estadísticos. Estos resultados pueden ser importantes para la comprensión de los mecanismos moleculares causantes de las complicaciones inducidas por la hiperglucemia/hiperlipidemia en la diabetes y la obesidad, así como en la identificación de futuras dianas terapéuticas para el manejo de estas patologías.

7. CONCLUSIONES

1. La alta concentración de glucosa y el tratamiento con ácido palmítico ocasionan un deterioro de la señalización de insulina en células HepG2, consistente con un fenotipo de resistencia a la insulina.
2. Tanto la alta concentración de glucosa, como el tratamiento con ácido oleico y palmítico pueden inducir el depósito de lípidos en las células HepG2.
3. La sobreexpresión de β 2-quimerina mejora la respuesta a insulina en condiciones de resistencia insulínica producida por alta concentración de glucosa, mientras que no tiene efecto en la producida por palmítico.
4. La sobreexpresión de β 2-quimerina no afecta a la formación de las gotas lipídicas en células HepG2.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018 Jul 2;217(7):2273-2289. doi: 10.1083/jcb.201802095. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29622564; PMCID: PMC6028526.
2. Conget I. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus [Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus]. *Rev Esp Cardiol.* 2002 May;55(5):528-35. Spanish. doi: 10.1016/s0300-8932(02)76646-3. PMID: 12015934.
3. Carrera Boada CA, Martínez-Moreno JM. Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo "insulin resistance-secretion deficit". *Nutr Hosp.* 2013 Mar;28 Suppl 2:78-87. doi: 10.3305/nh.2013.28.sup2.6717. PMID: 23834050.
4. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005 May;26(2):19-39. PMID: 16278749; PMCID: PMC1204764.
5. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Jan 1;6(1):a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191. PMID: 24384568; PMCID: PMC3941218.
6. Wei Y, Zhou J, Yu H, Jin X. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019 Mar;83(3):429-435. doi: 10.1080/09168451.2018.1549974. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30488766.
7. Marušić M, Paić M, Knobloch M, Liberati Pršo AM. NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2021 Feb 17;2021:6613827. doi: 10.1155/2021/6613827. PMID: 33681089; PMCID: PMC7904371.
8. Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. *Gac Med Mex.* 2017 Mar-Apr;153(2):214-228. Spanish. PMID: 28474708.
9. Erion DM, Shulman GI. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med.* 2010 Apr;16(4):400-2. doi: 10.1038/nm0410-400. PMID: 20376053; PMCID: PMC3730126.
10. Vázquez-Jiménez JG, Roura-Guiberna A, Jiménez-Mena LR, Olivares-Reyes JA. El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gac Med Mex.* 2017;153(7):852-863. doi: 10.24875/GMM.17002714. PMID: 29414963.
11. Idilman IS, Ozdeniz I, Karcaaltincaba M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Semin Ultrasound CT MR.* 2016 Dec;37(6):501-510. doi: 10.1053/j.sult.2016.08.003. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27986169.
12. Bosco EE, Mulloy JC, Zheng Y. Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cellular and molecular life sciences.* 2009; 66(3): 370-374.
13. Møller LLV, Klip A, Sylow L. Rho GTPases-Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. *Cells.* 2019 May 9;8(5):434. doi: 10.3390/cells8050434. PMID: 31075957; PMCID: PMC6562660.
14. Siliceo M, García-Bernal D, Carrasco S, Díaz-Flores E, Coluccio Leskow F, Teixidó J, Kazanietz MG, Mérida I. Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and

- chemotaxis of T cells. *J Cell Sci.* 2006 Jan 1;119(Pt 1):141-52. doi: 10.1242/jcs.02722. Epub 2005 Dec 13. Erratum in: *J Cell Sci.* 2006 Jan 15;119(Pt 2):388. Leskow, Federico C [corrected to Coluccio Leskow, Federico]. PMID: 16352660
15. Yang C, Kazanietz MG. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochemical Journal.* 2007; 403(1): 1-12.
 16. Ip JP, Shi L, Chen Y, Itoh Y, Fu WY, Betz A, et al. α 2-chimaerin controls neuronal migration and functioning of the cerebral cortex through CRMP-2. *Nature neuroscience.* 2012; 15(1): 39-47.
 17. Caloca MJ, Garcia-Bermejo ML, Blumberg PM, Lewin NE, Kremmer E, Mischak H, et al. β 2-Chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999; 96(21): 11854-11859.
 18. Wang H, Yang C, Leskow FC, Sun J, Canagarajah B, Hurley J. H, Kazanietz MG. Phospholipase C γ /diacylglycerol-dependent activation of β 2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *The EMBO journal.* 2006; 25(10): 2062-2074.
 19. Caloca MJ, Wang H, Kazanietz MG. Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of β 2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor. *Biochemical Journal.* 2003; 375(2): 313-321.
 20. Suliman SG, Stanik J, McCulloch LJ, Wilson N, Edghill EL, Misovicova N, et al. Severe Insulin Resistance and Intrauterine Growth Deficiency Associated With Haploinsufficiency for INSR and CHN2. *Diabetes.* 2009; 58(12): 2954-2961.
 21. Ding X, Jian T, Wu Y, Zuo Y, Li J, Lv H, Ma L, Ren B, Zhao L, Li W, Chen J. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019 Feb;110:85-94. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.018. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30466006.
 22. Alnahdi A, John A, Raza H. Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients.* 2019 Aug 22;11(9):1979. doi: 10.3390/nu11091979. PMID: 31443411; PMCID: PMC6770774.
 23. Malik SA, Acharya JD, Mehendale NK, Kamat SS, Ghaskadbi SS. Pterostilbene reverses palmitic acid mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation. *Free Radic Res.* 2019 Jul;53(7):815-827. doi: 10.1080/10715762.2019.1635252. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31223033; PMCID: PMC6675602.
 24. Lee JY, Cho HK, Kwon YH. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism.* 2010 Jul;59(7):927-34. doi: 10.1016/j.metabol.2009.10.012. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20006364.
 25. Su RC, Lad A, Breidenbach JD, Blomquist TM, Gunning WT, Dube P, Kleinhenz AL, Malhotra D, Haller ST, Kennedy DJ. Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the *Leprdb/J* mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PLoS One.* 2019 Dec 5;14(12):e0225604. doi: 10.1371/journal.pone.0225604. PMID: 31805072; PMCID: PMC6894821.