

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

CARACTERÍSTICAS de ACCIÓN del GLP-1 y EXENDINAS sobre el METABOLISMO de la GLUCOSA, en la OBESIDAD y DIABETES

Trabajo presentado por **M^a Pilar Tornero Esteban**,
Licenciada en CC. Químicas, para optar al grado de
Doctor.

Director: Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo Molina

Ponente: Prof. Inmaculada Canal Beltrán

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
PROPÓSITO	18
MATERIALES y MÉTODOS	19
SUJETOS de ESTUDIO	19
ANIMAL de EXPERIMENTACIÓN: <i>modelo de diabetes tipo 2</i>	19
Selección de los animales	20
MUESTRAS de ESTUDIO	20
MIOCITOS HUMANOS	21
4.1. Aislamiento de mioblastos	21
4.2. Cultivo y diferenciación	23
AISLAMIENTO de ADIPOCITOS	23
AGENTES de ESTUDIO	24
TRATAMIENTO de los ANIMALES	25
TRANSPORTE de GLUCOSA	25
ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA a	27
PROTOCOLO de ESTUDIO de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN	28
ACTIVIDAD PI3K	29
11.1. Inmunoprecipitación	30
11.2. Formación de PIP ₃	31
11.3. Extracción de lípidos	31
11.4. Separación de lípidos	32
ACTIVIDAD PKB, p70s6k y p44/42 MAPKs	33
12.1. Western blot	34
a) Separación de proteínas	34
b) Transferencia	35
c) Inmunodetección	36

TRANSLOCACIÓN de ISOFORMAS PKC	37
DETERMINACIÓN de la EXPRESIÓN del GLUT-4	38
14.1. ARNm-Glut-4	38
14.2. Proteína Glut-4	41
INFORMACIÓN de los RESULTADOS	41
RESULTADOS	42
CAPTACIÓN BASAL de GLUCOSA y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO respecto al SUJETO NORMAL	42
ACTIVIDAD GLUCOGÉNO SINTASA α y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO respecto al SUJETO NORMAL	45
ACTIVIDAD BASAL de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO respecto al SUJETO NORMAL 47	
3.1. PI3K/PKB.....	47
3.2. MAPKs	50
3.3. p70s6K	50
EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS sobre la TRANSLOCACIÓN de ISOFORMAS PKC, en el MIOCITO del SUJETO NORMAL	54
4.1. PKC-θ	54
4.2. PKC-λ	55
4.3. PKC-ϵ	59
TRATAMIENTO PROLONGADO con Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el TEJIDO ADIPOSO de la RATA NORMAL y DIABÉTICA TIPO 2	63
5.1. Transporte de glucosa	63
5.2. Expresión génica del Glut-4	64
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	73
ABREVIATURAS	87

INTRODUCCIÓN

La diabetes... ¿es una cuestión de nutrición? Numerosos estudios a lo largo de los años han mostrado que el aumento en el consumo de azúcar, y la mortalidad debida a la diabetes, van de la mano con el incremento del bienestar y desarrollo cultural.

En la Antigüedad, sólo se conocía la miel como edulcorante. De hecho, las primeras noticias sobre el azúcar llegaron a Europa en el 327 A.C., cuando Alejandro Magno, en el transcurso de sus campañas, informaba que *“en la India, existe una peculiar clase de vegetal rojo que produce cierto tipo de miel, que no necesita de la intervención de las abejas”* [Lippmann y col., 1890].

En el siglo VI, la caña de azúcar ya se importaba desde la India a Persia; pero la primera mención sobre la existencia de cristales de azúcar data de 627 D.C., cuando el emperador griego Heraclius, en la destrucción del palacio del rey de Persia, tiene conocimiento de ello. Así, el azúcar cristalizado se consideró como un tesoro real, y fue una rareza durante mucho tiempo [Lippmann y col., 1890].

Por sus propiedades energéticas y agradable sabor, el azúcar pasó a ser un elemento muypreciado; de hecho, Avicena (980-1037), médico árabe que había observado personalmente casos de diabetes, y que ya sabía de la existencia de diferentes tipos de azúcar —la morena con componentes de melaza, y la purificada de caña—, estableció, en un libro de medicina árabe, una lista de 650 remedios, de los cuales, más de cien debían ser preparados en un medio azucarado [Lippmann y col., 1890].

En el siglo XIX, el sabor dulce se convirtió en favorito en los preparados alimentarios, y en todo lugar el azúcar pasó a ser una seña de exquisitez, aumentando su consumo en tal medida que, en ciudades como Florencia, Bolonia y otras, se promulgó una ley que estrictamente regulaba su utilización como componente en confitería. Milán, por ejemplo, que entonces sólo tenía 200.000 habitantes, disponía de 100 tabernas, 400 pastelerías y 150 grandes establecimientos gastronómicos.

Lo anterior da una idea de que esas restricciones forzosas, independientemente de que pudieran estar basadas en un desequilibrio entre la oferta y la demanda del mercado, eran debidas a que se estaba produciendo un incremento excesivo en el consumo de este producto, y con seguridad de otros, por parte de la población.

El filósofo J. Zubiri señaló que “*Mientras los animales viven ajustados a su medio, los seres humanos tenemos que ajustarnos a él*”, y a este acomodamiento lo llamó justificación” [Zubiri, 1995]. A través de la cultura, los seres humanos nos “justificamos” con el medio ambiente, transformándolo para garantizar nuestra supervivencia. Los rápidos cambios culturales, y la diversidad misma de culturas, son las respuestas adaptativas a medios distintos. En los países desarrollados, el hábitat viene determinado por una abundancia de alimentos de gran densidad calórica que, consumidos en exceso, junto al sedentarismo, aboca a la población hacia el padecimiento de una de las enfermedades de nuestra era: la **obesidad**. En el mundo animal, se producen dos tipos de metabolismo diferente: el basal, que es el gasto energético utilizado en el mantenimiento de todos los sistemas vitales –latido del corazón, función pulmonar, movilización intestinal–, y el energético o de ejercicio. Ningún animal puede gastar más energía de la que el alimento le proporciona, puesto que el balance energético resultante le sería desfavorable [Campillo, 2007]

Pero..., ¿cuáles son las causas de la obesidad?

Parece lógico que un aporte de energía mayor que su gasto produzca un aumento de peso en términos generales. Pero toda vez que la obesidad se ha establecido, ésta se mantiene comúnmente a niveles de aporte calórico insuficientes para producir obesidad porque, de hecho, la propia obesidad impide el ejercicio. No obstante, los factores que predisponen a sufrir obesidad severa no se conocen bien, a pesar de las muchas investigaciones al respecto; de hecho, muchos pacientes obesos afirman ganar peso con cantidades de alimento que no inducirían obesidad en otras personas que lo mantienen normal, independientemente de la cantidad de alimento ingerido. En relación a ello, algunas teorías sugieren la existencia de una eficiencia metabólica distinta entre sujetos obesos y delgados, en base a que los primeros tendrían una capacidad de pérdida calórica diferente [Trayhurn y col., 1979; Thurlby y Trayhurn, 1979]. De forma simple, la generación de calor por el cuerpo estaría dentro de cuatro categorías [James y Trayhurn, 1976]: la inducida por actividad física, la producida por un metabolismo basal sostenido –mantenimiento basal funcional–, la liberada tras la absorción de nutrientes –termogénesis de la dieta– y la desarrollada para el mantenimiento de la temperatura corporal –termogénesis termorreguladora–; de hecho, y a partir de resultados de estudios en animales, se propuso que la predisposición a desarrollar obesidad está genéticamente influenciada por alteraciones en la capacidad termogénica [Coleman, 1978;

James y Thrayhurn, 1981]. Esta idea está inspirada en que, en el pasado, cuando la disponibilidad de alimento era intermitente, la presión genética estaría orientada hacia un metabolismo más eficiente, para que el mayor porcentaje de alimento ingerido pudiera ser acumulado, y proteger así al individuo durante periodos de carencia. Pero esta propiedad genética sería un defecto en la sociedad actual, en la que el alimento está constantemente disponible. Por consiguiente, según la perspectiva evolucionista, las personas obesas hubieran sido las supervivientes de las épocas de penuria alimentaria, si bien en la sociedad actual seríamos víctimas de aquella selección. Si realmente nuestros genes se asemejan más de lo que podríamos pensar a los del *Ardipithecus ramidus*, *Australopithecus afarensis* y *Homo ergaster*, y éstos guardan una relación directa con el requerimiento de nutrientes, parece lógico deducir que nuestra forma de alimentación tendría que asemejarse a la de ellos, pero con los matices pertinentes, ya que no tenemos que movernos en busca de comida, y nuestra actividad física es más sedentaria de lo que debería de ser. Según esto, se ha propuesto que nuestra alimentación ideal debería ser un cincuenta por ciento de la del *Ardipithecus ramidus*, un treinta por ciento de la del *Australopithecus afarensis*, un dieciocho por ciento de la del *Homo ergaster* y un dos por ciento de la del *Homo sapiens sapiens* [Campillo, 2007].

Pero al margen de todo lo anterior, la realidad es que hasta ahora no se puede establecer la causa específica que aboca a un individuo en concreto a sufrir obesidad, si bien parece claro que una dieta rica en carbohidratos y grasas, en combinación con escaso ejercicio físico, favorece la aparición de la misma, y que ésta, en un periodo variable de tiempo, conduce a resistencia a insulina y diabetes.

La **obesidad mórbida** —enfermedad crónica normalmente irreversible y actualmente incurable, salvo a través de cirugía restrictiva (bariátrica)—, suele ir asociada, a menudo, con una menor tolerancia a la glucosa, con resistencia a la acción de la insulina en el músculo y en la grasa, y con hiperinsulinismo en el ayuno y postprandium [Inoue, 1990]. Pero al margen de la responsabilidad de una dieta calórica descompensada (**Fig.1**), se sabe desde hace tiempo de la existencia de familias en las que la obesidad es una característica común de todos sus miembros [Bogardus y col., 1986; Bouchardt y Perusse, 1993].

En la actualidad, el tratamiento de la obesidad se basa en una dieta hipocalórica, acompañada de ejercicio; pero cuando se trata de obesidad mórbida, la terapia no es tan sencilla, ya que estos pacientes no responden con facilidad a ningún tratamiento médico, dietético, o de conducta [Van Epps-Fung y col., 1997]; en ellos, como ya se ha dicho, lo único eficiente es, por el momento, la cirugía restrictiva (bariátrica).

No obstante lo anterior, hasta la fecha se han propuesto otros tratamientos como es el del control del que se ha denominado gen de la obesidad, el *ob*. La región promotora del gen *ob*, localizado en el cromosoma 7, regula la respuesta a AMPc y glucocorticoides [Gong y col., 1996]. Su transcrito es un ARNm que se origina en el tejido adiposo blanco;

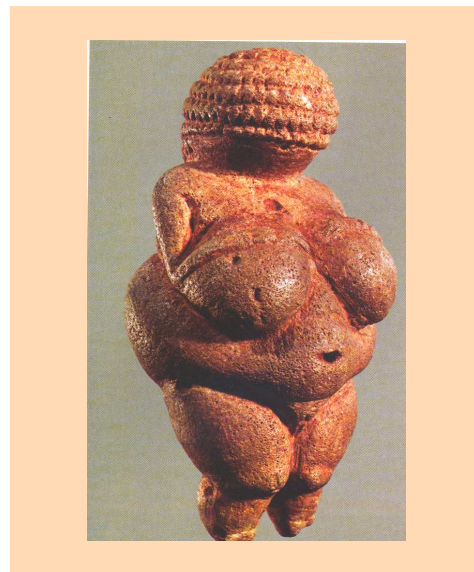


Figura 1. Venus de Willendorf

como resultado de su traducción, se produce una proteína, la leptina, de 166 aminoácidos, que tiene una alta homología entre especies. En el plasma, la leptina se encuentra parcialmente unida a proteínas, siendo mayor su proporción en sujetos delgados —cerca del 45%— que en obesos —aproximadamente un 20%— [Sinha y col., 1996]. Tanto mediante estudios clínicos, como por otros en animales, se ha descrito la existencia de un importante mecanismo fisiológico regulador del peso [Leibel y col., 1995], en el que se ha postulado intervendría la leptina [Campfield y col., 1995].

La expresión del gen de la leptina está influenciada por factores tales como la cantidad de energía almacenada en forma de grasa —tanto la proteína almacenada en plasma, como ARNm, es mayor en individuos obesos [Considine y col., 1996; Hamilton y col., 1995]—, por el tamaño del adipocito —los más grandes de un mismo individuo contienen más leptina [Hamilton y col., 1995]—, y por la sobrealimentación, con la que se observa un incremento de la leptina circulante al cabo de varios días, y una disminución con el ayuno a las pocas horas de su inicio [Saladin y col., 1995].

La secreción de leptina está directamente relacionada con la concentración, en sangre, de insulina [Saladin y col., 1995], glucocorticoides [Sliker y col., 1996] y citoquinas [Janik y col., 1997]. Asimismo, la producción de leptina parece ser distinta según el sexo, ya que su valor circulante es superior en las mujeres que en los hombres, en iguales condiciones

de edad, peso y grasa corporal, hecho que se ha relacionado con las diferencias hormonales, fundamentalmente la testosterona [Castracane y col., 1998].

Mutaciones en el gen de la leptina en ratones producen obesidad mórbida [Pellemounter y col., 1995]. En el hombre, estas mutaciones del gen son raras y, de hecho, hasta el momento se han detectado en pocos casos: uno, el que afecta al codon 133, en el que la eliminación de una guanina altera la fase de lectura, da lugar a un codon de terminación prematuro y a una proteína no funcional [Rau y col., 1999]; el otro, producido por la sustitución de una treonina por cisteína en el codon 105, da lugar a una mutación sin sentido, y genera, al igual que en el caso anterior, una proteína no secretable [Strobel y col., 1998]. Estas mutaciones originan no sólo obesidad mórbida, sino también hiperfagia e hipogonadismo hipotalámico.

El control de la leptina sobre el balance energético parece estar centrado, principalmente, en el cerebro. Sobre ello, se ha demostrado que su administración intracerebroventricular, más que la periférica, disminuye la cantidad de alimento ingerido y la masa adiposa [Halaas y col., 1995; Halaas y col., 1998], sin afectar, como ocurre en procesos de inanición, la muscular [Halaas y col., 1998], efectos que parecen ser producidos por activación de la lipólisis [Shimabukuro y col., 1997] y estimulación de la apoptosis en el adipocito [Quian y col., 1997]. Si bien estas características de la leptina la han llevado a ser propuesta como una posible hormona antiobesidad [Figlewicz y Benoit, 2008], estudios en sujetos obesos, a los que se administró leptina en grandes cantidades, no confirmaron su posible beneficio [Considine y col., 1996; Maffei y col., 1995]. Esto último podría ser debido a que la obesidad suele cursar ya con altas concentraciones de leptina –salvo en los casos de mutaciones en el gen– y resistencia a su acción [Escobar y col., 2000; Friedman y Halaas, 1998], ello producido por alteraciones en la síntesis y/o secreción, en el transporte al cerebro, en el receptor, o en su vía de señalización.

La resistencia a la insulina, patología frecuentemente asociada a obesidad, es un proceso que puede estar producido por alteraciones en su receptor o en su mecanismo de señalización celular. Se ha descrito que la cantidad de receptor de insulina presente en adipocitos, monocitos y eritrocitos de pacientes obesos y diabéticos es menor que en sujetos de peso normal [Beck-Nielsen, 1978; Davidson, 1985; Kahn, 1980; Pedersen, 1984], mientras que la unión de insulina a receptores solubilizados del músculo esquelético de individuos obesos, es normal [Arner y col., 1987; Caro y col., 1987]. Dado que el músculo está

considerado como el principal responsable de aclaración de la glucosa [De Fronzo, 1977], la resistencia a insulina no puede ser atribuida a alteraciones en el número de sus receptores.

Pero en el hecho probado de que una dieta hipercalórica, en combinación con insuficiente trabajo muscular, constituye el factor inductor más importante de la patogenia de la obesidad y de la diabetes tipo 2, hay que tomar en consideración que los factores ambientales –dieta y ejercicio– parecen actuar a través de dos vías fundamentales: una es el proceso de metabolización de la glucosa, regulado por insulina y otras hormonas, y la otra, la propia función de la célula β . El consecuente desarrollo de resistencia a insulina observada en la obesidad sostenida, y su descompensada secreción, precede a la aparición y establecimiento de un estado hiperglucémico durante muchos años, si no décadas [Kahn, 2003; Goldstein, 2003]. Varios son los componentes de la dieta, cuya presencia se ha prescrito como beneficiosa en situaciones diabéticas tipo 2. Por ejemplo, su enriquecimiento moderado con ácidos grasos monoinsaturados –aceite de oliva [Cancelas y col., 2006]–, y con goma de guar [Prieto y col., 2007], parece mejorar la sensibilidad a la insulina y favorecer un descenso post-*prandium* de la glucemia, sin modificar el peso. También, últimamente se ha demostrado que el inhibidor de la α -amilasa pancreática, presente en la alubia blanca –*Phaseolus vulgaris*–, administrada oralmente, reduce la glucemia y la cantidad de alimento y agua ingerida, en ratas normales y diabéticas tipo 2, y que, en estas últimas, también normaliza los niveles de disacáridos [Tormo y col., 2006].

El síndrome de resistencia a la insulina está caracterizado por un deterioro en la capacidad de respuesta de la célula a la hormona que, por tanto, provoca una captación de glucosa deficiente, manifestada por altas concentraciones de azúcar en la sangre y posterior aparición de diabetes tipo 2. La célula β no puede sostener indefinidamente una hiperproducción de insulina con el fin de compensar la resistencia a la hormona, por lo que, con el tiempo, ello aboca a una disfunción, primero, y ulterior muerte –diabetes tipo 1– de la célula [Beck-Nielsen y Groop, 1994; Turner y Clapham, 1998]. La resistencia a la insulina, con un estado de hiperinsulinemia sostenida, está ya presente en personas, generalmente obesas, décadas antes de que se manifieste una diabetes tipo 2 [Lillioja y col., 1993; Despres y col., 1996; Smith, 2002]. Además, se ha postulado que la resistencia a la

insulina se inicia en el tejido adiposo, el cual tendría un papel señero en la inducción y desarrollo del problema en el hígado y músculo [Smith, 2002].

Hoy día, dos son las teorías que, mayoritariamente, tienden a explicar la aparición de resistencia a insulina (**Fig. 2**). Una está basada en su posible origen inmune, que adjudica a la aparición o incremento de mediadores inflamatorios la responsabilidad e influencia perniciosa sobre el equilibrio entre el proceso de metabolización del azúcar –

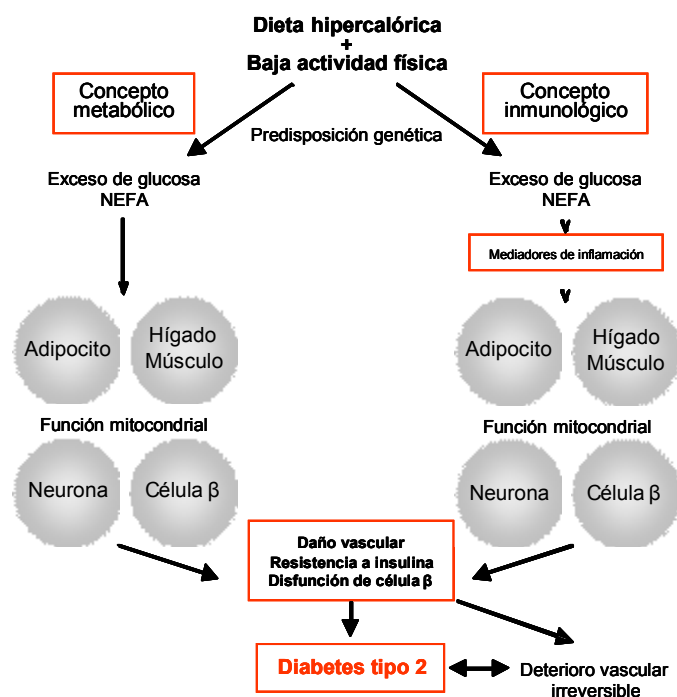


Figura 2. Conceptos metabólico e inmunológico del origen de la diabetes tipo 2.

regulado por insulina y otras hormonas– y el de la propia función de la célula β . Con el concepto inmunológico, se asume que la producción de mediadores proinflamatorios es un paso esencial en el fenómeno de glucotoxicidad y lipotoxicidad, que podría ser contrarrestado con otros mediadores antiinflamatorios como el IL-10, por ejemplo. La segunda teoría es conceptualmente metabólica, y toma en consideración que la función del tejido se ve directamente afectada por la acción tóxica de un exceso de glucosa, ácidos grasos no

esterificados (AGNE) y triglicéridos, probablemente mediado por un incremento en el estrés oxidativo [Jansson y col., 1995; Evans y col., 2003].

Muchos son los trabajos que en los últimos años han mostrado una estrecha relación entre valores altos de insulina, con enfermedad coronaria, obesidad, dislipemia o hipertensión arterial, así como con otros trastornos metabólicos y de coagulación [Rolla, 1994; Davidson, 1995]. Reaven [1994] describió el Síndrome X, caracterizado por hipertensión arterial, dislipemia –valores altos de triglicéridos, HDL y LDL con patrón tipo B–, hipeuricemia, y aumento del inhibidor del activador tisular de plasminógeno.

Si tomamos como premisa que el tejido adiposo sea en realidad un órgano endocrino más [Kershaw y Flier, 2004], que en determinadas circunstancias puede liberar un exceso

de ácidos grasos libres (AGL), angiotensina II y adipoquinas, estamos frente a factores potencialmente desestabilizantes del metabolismo. Por ejemplo, la concentración desproporcionada de AGL en sangre inhibe la captación de glucosa por el músculo [Shipp y col., 1961; Belfort y col., 2005], lo que unido a la de angiotensina II, provoca daños en el páncreas; y a pesar de que la célula β conserva actividad, ésta no es suficiente para contrarrestar la hiperglucemia originada –insulinorresistencia–. A ello hay que añadir el hecho de que la angiotensina II es, *per se*, un vasoconstrictor, que aumenta la presión arterial; además, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y otras citoquinas (interleuquinas), en exceso, no sólo promueven procesos inflamatorios que reducen, aún más, la eficacia de la insulina, sino que, también, generan hipertensión. El exceso de glucosa y AGL circulantes son la señal para que el hígado sintetice triglicéridos que, finalmente, resultan en un aumento de la relación LDL/HDL [Jandeleit-Dahm y col., 2005; Syvanne y Taskine, 1997]. Esto, en su conjunto, se conoce actualmente como *síndrome metabólico* [Opie, 2007], y su diagnóstico clínico se basa en valores aumentados de grasa abdominal, glucemia en ayunas, presión arterial, relación HDL/LDL y triglicéridos.

Pero la respuesta rápida de la célula β a cambios en la concentración extracelular de glucosa implica el acceso, necesariamente fluido, del azúcar al interior de la célula, a través de su membrana plasmática [Hellman y col., 1971; Matschisky y Elerman, 1968], en la que la presencia de una isoforma de los transportadores de glucosa, el Glut-2 [Thorens y col., 1988] –de baja afinidad para la glucosa–, y la fosforilación del azúcar a través de la glucoquinasa –isoenzima de la hexoquinasa con una alta K_m para la glucosa [Malaisse y col., 1976; Sener y col., 1986]–, son esenciales en su función secretora.

Al margen de la función primordial de la célula β , el proceso de captación de glucosa por parte de los distintos tejidos, inducido por insulina, también está mediado por distintos glucotransportadores –proteínas de membrana de 45-55 kDa–. Estos pertenecen a una familia de proteínas transportadoras que tienen una amplia distribución filogenética. Existen varias isoformas de transportadores de glucosa (GLUTs), las cuales difieren entre sí en sus características cinéticas y especificidad de tejido, de azúcares, y de otros compuestos orgánicos [Marger y Saier, 1993; Brown, 2000], que tienen una amplia distribución filogenética.

En el músculo, y también en el tejido adiposo, se expresa específicamente el **Glut-4** [Fukumoto y col., 1989], donde representa el 90% del total de glucotransportadores

presentes [Kandror y Pilch, 1996; Kahn, 1996]; ambos tejidos son denominados sensibles a insulina, porque la hormona induce en ellos un aumento del transporte del azúcar, el cual, sin embargo, y en estado basal, corre a cargo del Glut-1. El aumento en la captación de la hexosa se produce tras la translocación de vesículas membranosas con alto contenido en Glut-4, desde el interior celular a la membrana plasmática [Zorzano y col., 1989], deteniéndose el proceso cuando el transportador se interna de nuevo [Cushman y Wardzala, 1980]. La insulina [Guma y col., 1991], la contracción muscular por ejercicio [Lund y col., 1995] o estimulación eléctrica [Roy y col., 1997], la glucosa [Goodyear y col., 1996], y agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas [Pulido y col., 1996], inducen la translocación del glucotransportador. En este efecto de la insulina, inductor de captación de glucosa por células sensibles a la hormona, parece ser clave un incremento en la actividad PI3K [Shepherd y col., 1998]; pero aunque suficiente para su inicio, no se consigue con ello una activación completa del transporte [Frevert y Kahn, 1997], por lo que algunos autores creen en la necesaria participación de una segunda ruta de señalización [Isakoff y col., 1995]. Así, aunque el mecanismo de translocación del Glut-4 es aún desconocido, sí se ha demostrado que la PI3K puede estimular otras enzimas como la PKB o la PKC [Litherland y col., 2001]; además, moléculas como la fosfolipasa C, la isoforma 1 de la fosfolipasa D o la Rab4 [Imamura y col., 2003], parecen también estar involucradas en el proceso.

En la diabetes tipo 2, el efecto **incretina**, que corre fundamentalmente a cargo de dos hormonas gastrointestinales con propiedades insulínótropicas, el GLP-1 (glucagón like peptide-1) y el GIP (glucose-dependent insulintropic peptide o gastric inhibitory polypeptide), está reducido, o ausente [Creutzfeldt, 1979; Nauck y col., 1986]. Si bien la secreción del GLP-1 es ligeramente menor [Toft-Nielsen y col., 2001; Vilsboll y col., 2001], es sobre todo más baja la actividad insulínótropica del GIP [Krarup y col., 1987; Nauck y col., 1993a; Meier y col., 2002]; de hecho, mientras que el efecto insulínótropico del GLP-1 está bien conservado en estos pacientes [Nauck y col., 1993b; Kjems y col., 2003], el GIP es prácticamente inactivo [Nauck y col., 1993b; Meier y col., 2002; Vilsboll y col., 2001]. En sujetos normales, el GLP-1 es, probablemente, la incretina más importante [Nauck y col., 1993a]; como en el diabético tipo 2 el efecto incretina global está disminuido —debido probablemente a la incapacidad del páncreas endocrino para responder al GIP—, ello ha servido como una de las bases para la propuesta de utilización terapéutica del GLP-1.

El GLP-1 no sólo estimula la secreción de insulina dependientemente de glucosa [Kreymann y col., 1987; Nauck y col., 1993^a; Göke y col. 1993^b], sino que también suprime la de glucagón [Orskov y col., 1988; Nauck y col., 1993^a], desacelera el vaciamiento gástrico [Wettergren y col., 1993; Willms y col., 1996; Nauck y col., 1997], y reduce el apetito induciendo saciedad [Flint y col., 1998; Gutzwiller y col., 1999; Zander y col., 2002], efecto que a la larga propicia una pérdida de peso [Zander y col., 2002]; además, también tiene influencia sobre la sensibilidad a la insulina [Gutniak y col., 1992; Zander y col., 2002]. Por otro lado, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha sugerido que el GLP-1 induce la diferenciación de precursores de células β endocrinas, que estimula la multiplicación de las mismas y también la formación de nuevos islotes pancreáticos tras pancreatectomía parcial [Wang y col., 1995; Stoffers y col., 2000; Hui y col., 2001; Abraham y col., 2002], al margen de inhibir la apoptosis de la célula β en respuesta a distintos tóxicos [Hui y col., 2003]. Esto último puede resultar en un incremento neto de la masa de células β tras una administración sostenida de GLP-1 [Brubaker y Drucker, 2004]. La práctica totalidad de estas acciones descritas en modelos experimentales o en sujetos sanos ha podido ser demostrada en pacientes diabéticos tipo 2, excepto la relacionada con el aumento de la masa de células β , debido a la falta de disponibilidad de un método que permita medir el total de las mismas *in vivo*. Por otro lado, se ha documentado que el GLP-1 incrementa la utilización de glucosa por el hígado, y que su efecto es aditivo al de la insulina, independientemente de la vía de administración [Dardevet y col., 2004].

Pero el hecho probado de que el GLP-1 no sólo es una incretina [Creutzfeldt, 1979] –su liberación aumenta tras la absorción de nutrientes, y luego estimula la secreción de insulina–, sino también que su efecto antidiabético es independiente de insulina, hizo pensar que este péptido, derivado de la molécula de proglucagón en su procesamiento post-traducciona l en las células L del intestino [Mojsov y col., 1986], debía necesariamente tener efectos directos en tejidos extrapancreáticos participantes en la homeostasis de la glucosa.

A lo largo de los años se ha sabido que el GLP-1 tiene receptores específicos en el tejido adiposo de la rata [Valverde y col., 1993] y del hombre –normal [Mérida y col., 1993] y diabético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994^b–, y en el hígado [Wheeler y col., 1993; Campos y col., 1994; Egan y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995] y músculo esquelético [Wheeler y col., 1993; Egan y col., 1994; Delgado y col., 1995] de la rata. El receptor en estos tejidos parece estructural y/o funcionalmente distinto al descrito en el páncreas –463 aminoácidos, y

pertenciente a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G [Thorens, 1992]–, asociado al sistema adenilato ciclasa-AMPC [Drucker y col., 1987; Göke y Conlon, 1988]. De hecho, tanto en el hígado como en el músculo, el GLP-1, a diferencia de su acción en el páncreas, no propicia la formación de AMPC [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a; Morales y col., 1997; Yang y col., 1998]. Pero no sólo en estos tejidos hay receptores para GLP-1, sino también en las glándulas oxínticas del estómago [Uttenthal y Blázquez, 1990], en el pulmón [Lankat-Buttgereit y col., 1994], y también en el cerebro [Uttenthal y col., 1992; Calvo y col., 1995; Álvarez y col., 1996; Navarro y col., 1996], en el que se ha sugerido, además, un efecto estimulador de la leptina sobre la expresión del receptor, que podría favorecer la acción anoréxica del péptido [Sanz y col., 2008].

En el hígado y músculo, cuyo receptor para GLP-1 es una glicoproteína de aproximadamente 63 KDa [Delgado y col., 1995; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1995], al menos uno de sus segundos mensajeros podría ser un IPG (inositolfosfoglicano). De hecho, se ha documentado que el GLP-1 induce la hidrólisis inmediata de GPIs (glicosilfosfatidilinositoles) –al igual que la insulina– en una línea celular de miocitos en cultivo, la BC3H-1 [Galera y col., 1996], en otra de hepatoma humano, la HepG2 [Trapote y col., 1996] y en el adipocito y hepatocito aislado de rata [Márquez y col., 1998].

Tanto en el hígado como en el músculo esquelético, el GLP-1 estimula el metabolismo de la glucosa, acción manifestada en un incremento en la incorporación de D-glucosa a glucógeno en hepatocitos aislados y en el músculo esquelético de la rata normal [Valverde y col., 1994; Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a] y también diabética [Morales y col., 1997], y en el músculo y miocitos humanos en cultivo primario [Luque y col., 2002]; además, su efecto glucogénico está asociado a un aumento de la actividad glucógeno sintasa *a*, y a una estimulación de la oxidación y utilización de glucosa [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994a]. En miocitos humanos, además, estimula el transporte de glucosa, y ésta y otras acciones se mantienen en células musculares de sujetos diabéticos [González y col., 2005b]. Los efectos del GLP-1 en el músculo son dependientes de diversas quinasas –PI3K/PKB, p70s6k, MAPKs y PKC–, también participantes en la acción de la insulina [Acitores y col., 2005; González y col., 2005a]. Por otro lado, el GLP-1 modula la expresión del respectivo glucotransportador mayoritario en el hígado y músculo, a nivel de la traducción y/o postraducción, tanto en la rata normal como diabética tipo 1 y tipo 2, aunque se ha sugerido que la participación de la insulina sea, posiblemente, necesaria, para que el

GLP-1 induzca una estimulación del proceso transcripcional [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001].

En el músculo de rata diabética tipo 2, que tiene un transporte y oxidación de glucosa más bajo, y una más alta actividad glucógeno sintasa a y liberación de piruvato, no se detecta *in vitro* modificación de estos valores con GLP-1 [Arnés y col., 2008a]; además, el GLP-1 no altera la actividad de ninguna de las quinasas, que se sabe incrementa en el músculo de la rata normal. En relación a esto, se sugirió que esa falta de efecto del GLP-1 *in vitro* no excluía, por otro lado, el que pudiera tenerlo en tratamiento prolongado, como se ha demostrado después [Arnés y col., 2008b].

En el tejido adiposo, el GLP-1 influye tanto en el metabolismo de la glucosa como en el de los lípidos. En el adipocito de la rata [Valverde y col., 1993] y del hombre –normal [Mérida y col., 1993] y diabético [Villanueva-Peñacarrillo y col., 1994b]– se ha descrito la presencia de una unión específica para el GLP-1. En un estudio de identificación de las características de esta unión, indicativa de la existencia de un receptor, se detectó que el GLP-1 no sólo estimula la producción de IPGs [Márquez y col., 1998], como en el caso de células musculares [Galera y col., 1996] y hepáticas [Trapote y col., 1996], sino también la producción de AMPc [Ruiz-Grande y col., 1992]. El aumento de estos dos propuestos segundos mensajeros sugiere la existencia de dos receptores para el GLP-1, lo que viene reforzado por el hecho de que esta hormona no sólo estimula la síntesis de glucógeno y el transporte, oxidación y utilización de glucosa en el tejido adiposo [Perea y col., 1997; Sancho y col., 2005; Sancho y col., 2006], además de modular los niveles del glucotransportador en adipocitos 3T3-L1 [Wang y col., 1997] y en la rata normal y diabética [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], sino que tiene también una doble acción sobre el metabolismo lipídico: como la insulina, es lipogénico, y el efecto de ambos –que es, por otro lado, aditivo– no se manifiesta en presencia de glucagón; pero, como el glucagón, también es lipolítico, y tanto el efecto del uno como el del otro se anula en presencia de insulina [Ruiz-Grande y col., 1992; Perea y col., 1997]. Como en el caso del hígado y músculo, estos efectos del GLP-1 también son visibles en el adipocito del hombre [Sancho y col., 2007], y parecen estar mediados por un incremento en la actividad de distintas quinasas [Sancho y col., 2005, Sancho y col., 2007]. El efecto del GLP-1, al menos el relacionado con el transporte de la glucosa y metabolismo lipídico, se mantienen en estado diabético tipo 2, incluso con mayor e igual potencia, respectivamente, que el de la insulina y el glucagón [Sancho y col., 2005]. Además, es posible que el GLP-1 contribuya a la normalización de las

condiciones metabólicas del obeso mórbido tras cirugía restrictiva [Valverde y col., 2005], y que también pueda contrarrestar la acción defectuosa de la insulina sobre el transporte de glucosa del adipocito en la diabetes, al margen de amortiguar la hiperactividad de la insulina sobre la lipogénesis en el obeso, también mediante su potenciado efecto sobre la lipólisis [Sancho y col., 2007].

Todo lo anterior refuerza la propuesta de utilización del GLP-1 como agente terapéutico en la diabetes tipo 2 [Gutniak y col., 1992], y también lo hace el hecho de que el efecto antidiabético del GLP-1 sea evidente tras su inyección subcutánea en estos pacientes [Gutniak y col., 1994] –en los que también el GLP-1, sea o no amidado, tiene efecto insulínico [Elahi y col., 1994]–.

No obstante, las sucesivas investigaciones están sacando a la luz otros efectos del GLP-1, que no están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa o el de los lípidos. De hecho, se ha propuesto al GLP-1, y a análogos con capacidad de unión a su receptor cerebral [Göke y col., 1995], y de acción más prolongada, como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico [Larsen y Holst, 2005]. Esta última propiedad de péptido está basada en su demostrada acción neurotrófica en células neuronales en cultivo –a las que protege contra la apoptosis inducida por glutamato, y contra el daño oxidativo [Perry y col., 2002]–, y en su capacidad para modificar el proceso del precursor de la proteína β amiloide, y en la de reducir, en neuronas del hipocampo, *in vitro*, y en función de la dosis, los niveles de la propia proteína [Perry y col., 2003]. En relación a esto, se ha documentado, en ratones, que el GLP-1 es un potente neuroprotector, y su receptor cerebral ha sido relacionado con el aprendizaje, puesto que aquellos animales con sobreexpresión del mismo en el hipocampo muestran una mayor capacidad de memorización [During y col., 2003].

Últimamente, se ha propuesto que las incretinas, es decir, el GLP-1 y el GIP, podrían intervenir, directa o indirectamente, en el proceso de remodelado óseo que se produce tras la absorción de nutrientes [Clowes y col., 2005]. En relación a ello, se ha sugerido, por resultados de un trabajo en ratones carentes del receptor pancreático del GLP-1, que el mecanismo de señalización de este receptor tendría un papel esencial en el proceso de resorción del hueso [Yamada y col., 2008]; además, nuestro laboratorio ha observado, en un modelo de diabetes tipo 2 inducida con estreptozotocina, y también en otro de

resistencia a insulina obtenido por sobrealimentación con fructosa, que el tratamiento sostenido con GLP-1 parece tanto estimular la formación del hueso como incrementar su resistencia, parámetros inicialmente deteriorados en ambos estados [Nuche-Berenguer y col., 2008a].

Pero una vez en el torrente sanguíneo, el GLP-1 es degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), lo que hace que su vida media sea inferior a 2 minutos [Kieffer y col., 1995; Deacon y col., 1995; Holst y Deacon, 1998]; luego, si bien se han puesto grandes expectativas en él como agente terapéutico en la diabetes tipo 2, ese inconveniente obliga a que su administración sea casi continua o muy frecuente. Aunque la eliminación de este obstáculo está siendo estudiada de forma constante en distintos laboratorios –una propuesta fue su administración como tableta inserta en la mucosa bucal [Gutniak y col., 1997]–, también se están investigando las propiedades de otros posibles agentes antidiabéticos como es el caso de la exendina 1-39amida, o exendina-4 (Ex-4), que posee muchos de los beneficios fisiológicos y farmacológicos del GLP-1, sin mostrar, en principio, esa desventaja antes mencionada.

La **Ex-4** es la forma natural de la Exenatide® –exendina-4 sintética–, utilizada hoy día en la terapia de la diabetes, sola o en combinación con otros hipoglucemiantes orales [Iltz y col., 2006]. Fue originariamente aislada de la saliva del lagarto *Heloderma Suspectum*, comúnmente llamado Monstruo de Gila [Eng y col., 1992]; su liberación se produce tras morder a su presa –ingestión de alimentos–, y representa el primer ejemplo de una hormona endocrina secretada por una glándula salival [Young, 2002]. Se desconoce si la Ex-4 tiene un papel en la homeostasis calórica de

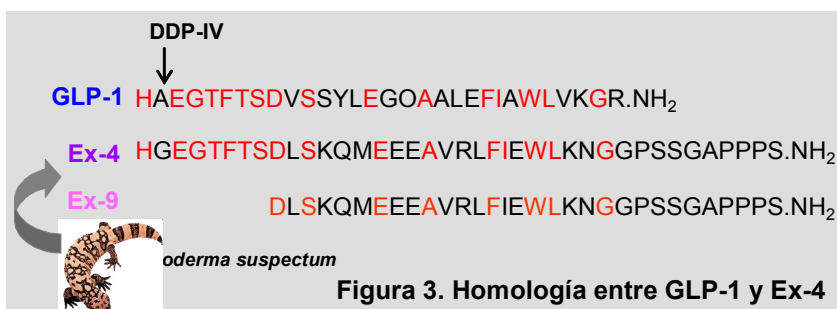


Figura 3. Homología entre GLP-1 y Ex-4

este lagarto, pero sí parece que participa en la regulación de su motilidad intestinal [Christel y col., 2007]. Su secuencia de aminoácidos tiene un 53% de homología con la del GLP-1 (fig. 3), pero procede de la transcripción de un gen distinto y no de un homólogo del gen del proglucagón del mamífero [Chen y Drucker, 1997]. Inyectado en el hombre, este péptido es resistente a degradación por DPP-IV, y, quizás por ello, tiene una vida media mayor que la del GLP-1. Pero aunque la Ex-4 no es un análogo del GLP-1, es decir, la estructura de su molécula sintética no ha sido obtenida por modificación de la secuencia

del GLP-1, ambos péptidos, la Ex-4 y el GLP-1, comparten muchos de sus efectos glucorreguladores, los cuales pueden estar mediados, entre otros, no sólo por el receptor pancreático del GLP-1 [Göke y col., 1993a], sino también en los descritos en tejidos extrapancreáticos [Arnés y col. 2008a]. Las acciones glucorreguladoras de la Ex-4 incluyen la insulínótropica dependiente de glucosa [Young y col., 1999; Parkes y col., 2001; Egan y col., 2002; Kolterman y col., 2003], que incluso propicia la reaparición de la primera fase de secreción en diabéticos tipo 2 —inicialmente disminuida en estos pacientes [Fehse y col., 2005]—, la supresión de la de glucagón [Kolterman y col., 2003], la deceleración del vaciamiento gástrico [Young y col., 1999; Kolterman y col., 2003], que puede estar paradójicamente acelerada en sujetos diabéticos [Rayner y col., 2001], y su efecto reductor sobre la cantidad de alimentos a ingerir [Bhavsar y col., 1998; Szayna y col., 2000]. Además, la Ex-4 promueve la proliferación de la célula β y neogénesis del islote pancreático desde células precursoras (fig. 4), tanto *in vitro* como *in vivo* [Xu y col., 1999; Turrel y col., 2001; Turrel y col., 2002]. Estas acciones glucorreguladoras de la Ex-4, combinadas con sus ventajas farmacocinéticas, le confieren como resultado un mayor potencial *in vivo* respecto al GLP-1 nativo [Young y col., 1999; Greig y col., 1999].

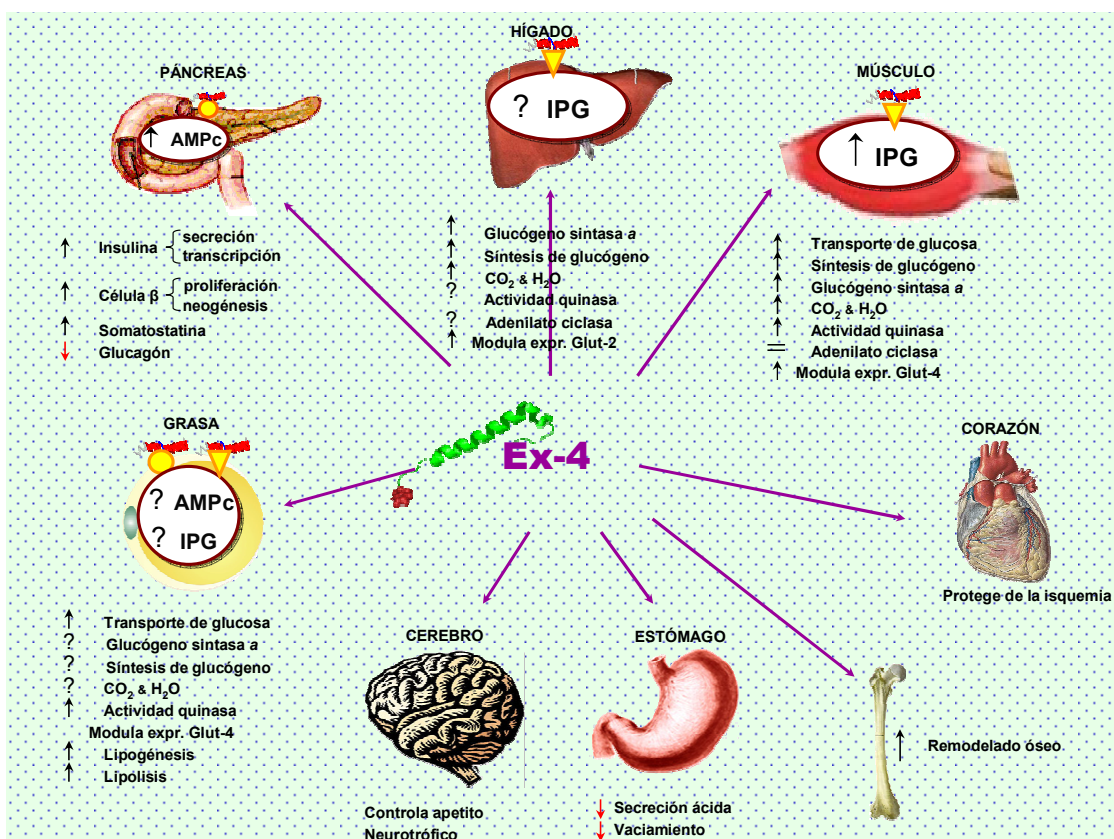


Figura 4. Acciones pancreáticas y extrapancreáticas de la exendina-4

Si bien esas propiedades farmacocinéticas ventajosas han impulsado la pronta comercialización y utilización de la Ex-4 en la terapia de estados de homeostasis de glucosa alterados, hasta la fecha no son muchos los trabajos de investigación dirigidos hacia el conocimiento específico de sus acciones, y características, en los distintos tejidos mayoritariamente participantes en la metabolización del azúcar y lípidos. No obstante, hoy día se sabe que (**fig. 4**), en el tejido adiposo, la Ex-4 y su forma truncada, la **Ex-9** (exendina 9-39amida), mimetizan al GLP-1 y a la insulina en su acción estimuladora sobre el transporte de glucosa y sobre la lipogénesis en el adipocito de la rata normal [Sancho y col., 2005]. Sin embargo, sólo la Ex-4 es, como el GLP-1, lipolítica, y estos efectos de las exendinas están mediados por distintas quinasas [Sancho y col., 2005]; además, la acción estimuladora de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa en el adipocito, se mantiene en un modelo de diabetes tipo 2 inducida en la rata por tratamiento con estreptozotocina al nacer [Sancho y col., 2005]. En el tejido adiposo del hombre, la Ex-4, como el GLP-1, pero no la Ex-9, estimula la captación de glucosa con la misma eficiencia que la insulina, y en el obeso mórbido [Sancho y col., 2007], como el GLP-1, no modifica el transporte de glucosa basal, y su efecto sobre la lipólisis también es menor que en situación normal; sin embargo, la acción sobre la lipogénesis tanto de la Ex-4 como de la Ex-9, y la de la insulina, está realmente aumentada, incluso por encima, sobre todo en el caso de la insulina, respecto al sujeto normal. Además, la Ex-4, pero no su forma truncada, mimetiza al GLP-1 en sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa en el hígado y músculo esquelético de la rata, a través de un incremento en la actividad glucógeno sintasa α , síntesis de glucógeno y oxidación y utilización de la glucosa [Alcántara y col., 1997]. Por otro lado, y sin embargo, en el músculo del hombre, ambas, la Ex-4 y la Ex-9 estimulan el metabolismo del azúcar [Luque y col., 2002], y también como el GLP-1, la actividad de diversas quinasas, participantes, algunas de ellas, en esta acción [González y col., 2005a].

Resultados muy recientes muestran que la Ex-4, como el GLP-1, podría mejorar las alteraciones en el remodelado óseo en situación de diabetes y de resistencia a insulina, a través de su posible acción osteogénica [Nuche-Berenguer y col., 2008].

La Ex-9 deriva de la Ex-4 por pérdida de ocho de sus aminoácidos del extremo amino terminal (**Fig. 3**), y es antagonista tanto del receptor del GLP-1 en varios sistemas celulares [Göke y col., 1993a] como de alguna de sus acciones *in vivo* [Kolligs y col., 1995; Cancelas y col., 2001a]. La Ex-9 ha sido utilizada, junto con la Ex-4, en la caracterización

tanto del receptor como de los efectos del GLP-1 en diversos tejidos diana. La Ex-9 se une al receptor pancreático del GLP-1 [Göke y col., 1993a], y también al presente en el músculo de la rata, si bien por éste tiene muy baja afinidad [Arnés y col., 2008a]. Además, no sólo bloquea la secreción de insulina estimulada por GLP-1 [Kolligs y col., 1995] –con lo que, en consecuencia, aumentan los niveles de glucosa en plasma–, sino que también incrementa la glucemia *post-prandium* en respuesta a glucosa intragástrica o intraduodenal [Edwards y col., 1999; Kolligs y col. 1995], e inhibe, en la célula β pancreática, la formación de AMPc inducida por GLP-1 [Perfetti y Merkel, 2000].

Además, se ha demostrado que el tratamiento con Ex-4 no modifica el transporte de glucosa en el músculo esquelético de la rata normal, si bien lo normaliza en la diabética; pero mientras que, y a diferencia de lo previamente descrito sobre el GLP-1 [Villanueva y col., 2001], este péptido sólo parece modificar la proteína Glut-4, inicialmente alterada [Arnés y col., y 2008b], sí estimula la expresión del Glut-2 en el hígado tanto de la rata normal como diabética, y parece normalizar la cantidad reducida del contenido de glucógeno hepático en la diabética [Arnés y col., 2008b].

Pero aunque, en general, la Ex-4 y la Ex-9 son agonista y antagonista, respectivamente, no sólo del receptor pancreático para GLP-1, sino también de su efecto estimulador sobre el metabolismo de la glucosa en hepatocitos y músculo esquelético de rata [Alcántara y col., 1997], y también de la acción insulínica del péptido [Cancelas y col., 2001a, Cancelas y col., 2001b], se ha demostrado que en la línea de mioblastos L6 [Yang y col., 1998], en otra de adipocitos, la 3T3-L1 [Montrose-Rafizadeh y col., 1997], y en el músculo esquelético y miocitos humanos [Luque y col., 2002], ambas, Ex-9 y Ex-4, mimetizan la acción del GLP-1 sobre algunos parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa.

En definitiva, las propiedades terapéuticas de la Ex-4, a aplicar en casos que cursan con secreción alterada de insulina, o acción defectuosa de ésta, hacen acreedor a este péptido del interés en su estudio, dirigido al conocimiento de sus mecanismos de acción.

PROPÓSITO

La exendina (1-39)amida (Ex-4) es un péptido de origen natural, no mamífero, que tiene una alta homología en su secuencia de aminoácidos con la del GLP-1. La Ex-4 es agonista de los receptores del GLP-1 en muchos sistemas celulares y tejidos –pancreático y no pancreáticos–, y también de alguno de sus efectos sobre distintos parámetros del metabolismo de la glucosa y lípidos en el hígado músculo y/o tejido adiposo; además, este péptido, como el GLP-1, es insulinoatrófico, y tiene un fuerte carácter antidiabético, incluso más potente y prolongado. Pero la Ex-4, a diferencia del GLP-1, carece de puntos sensibles a degradación por dipeptidil peptidasa IV, lo que la hace valedora del interés en el estudio de sus mecanismos de acción, hacia su utilización como agente terapéutico.

La exendina (9-39)amida (Ex-9), forma truncada de la Ex-4, y antagonista del receptor para GLP-1 y también de algunos de sus efectos en el músculo y otros tejidos de rata, es, sin embargo, como la Ex-4, agonista, en el músculo esquelético del hombre.

La obesidad mórbida puede cursar con un metabolismo de la glucosa alterado acompañado por niveles bajos de GLP-1 circulante, que tienden a su normalización tras cirugía restrictiva.

A través de este estudio, se ha pretendido conocer, sobre la Ex-4 y Ex-9, en relación al GLP-1:

- Su acción sobre el transporte y metabolismo de la glucosa, en el músculo esquelético del obeso mórbido en relación al sujeto normal.
- Las características de la actividad de enzimas de señalización celular en el músculo esquelético del obeso mórbido en relación al sujeto normal, y el efecto sobre las mismas de ambas exendinas, y del GLP-1 e insulina.
- El efecto de la acción prolongada de la Ex-4, en tratamiento sostenido, sobre el transporte de glucosa y la expresión del glucotransportador mayoritario del tejido adiposo, en un modelo de diabetes experimental tipo 2 respecto a la situación normal.

MATERIALES & MÉTODOS

1. SUJETOS de ESTUDIO

En el análisis de los distintos parámetros de este trabajo, participaron un total de 10 pacientes obesos mórbidos (10M; edad: 44 ± 5 años; glucosa en plasma: 100 ± 1 mg/dl; colesterol: 183 ± 19 mg/dl; triglicéridos: 145 ± 16 mg/dl; $HbA_{1c} > 6,5$ %) y seis mujeres sin alteración del metabolismo hidrocarbonado (edad: 80 ± 2 años; glucosa en plasma: 104 ± 3 mg/dl; colesterol: 161 ± 2 mg/dl; triglicéridos: 80 ± 5 mg/dl; $HbA_{1c} < 4,5$ %) utilizadas como controles de referencia. Sólo se incluyó en el estudio aquellos pacientes que no tenían ninguna otra patología añadida, salvo la mencionada. Todos los sujetos procedían bien del Servicio de Cirugía Traumatológica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, o del de Cirugía General del Hospital Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares. El proyecto fue aprobado por los respectivos Comités Éticos de ambos hospitales.

2. ANIMAL de EXPERIMENTACIÓN: *modelo de diabetes tipo 2*

En este trabajo se han utilizado ratas Wistar macho del bioterio de la Fundación Jiménez Díaz, alimentadas *ad libitum* con dieta estándar (UAR Panlab, Barcelona, España) y agua.

La diabetes tipo 2 se generó en la rata por tratamiento con estreptozotocina (STZ), agente de acción citotóxica altamente específica para la célula beta pancreática [Junod y col., 1967], según se relata a continuación.

Material

Estreptozotocina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.

Citrato sódico, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.

Procedimiento

Se preparó una disolución de STZ en citrato sódico 0,05 M, pH 4,5 (20 mg/ml), de la que se inyectó intraperitonealmente una dosis única de 25 μ l (100 μ g STZ/g de peso corporal) a la rata, en el mismo día de su nacimiento [Portha y col., 1979]. Transcurridas 6-7 semanas, se estudió en cada animal, para su selección, el grado de tolerancia a la glucosa intravenosa.

2.1. Selección de los animales

Se evaluó en la rata mediante estimación del índice de aclaramiento del azúcar, por observación del perfil de glucemia tras la administración intravenosa de D-glucosa [Portha y col., 1979].

Material

Pentobarbital sódico (Pentothal®), Abbott Laboratories, S.A., Madrid, España

Seda quirúrgica 2/0, B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España

D-glucosa anhidra, E. Merck, Darmstadt, Alemania

NaCl al 0,9% (Salino), B. Braun Medical S.A., Barcelona, España

Heparina al 1%, Rovi S.A., Barcelona, España

Procedimiento

A las de 6-7 semanas de edad, la rata, en ayuno de 16 horas, es anestesiada por inyección intraperitoneal de una disolución de Pentothal® diluido en salino (50 mg/ml), administrado en la proporción de 45 µg/g de peso corporal. Tras un período de reposo de diez minutos, se obtiene –de una incisión practicada en el extremo de la cola– una muestra de sangre, para la determinación de la glucemia basal. Seguidamente, se le inyecta, en unos cinco segundos, y a través de una de las venas femorales, una disolución de glucosa al 20% en salino, en la proporción de 0,5 mg/g de peso, tomándose muestras de sangre a los 2, 5, 10, 20 y 30 minutos siguientes. Para evitar la coagulación de la sangre en el extremo de la cola durante el período de duración de la prueba, ésta se mantiene sumergida en heparina al 0,1% en salino. Al finalizar, se sutura la herida con seda quirúrgica. Los valores de glucemia obtenidos se utilizan para la estimación del coeficiente de utilización del azúcar (K) –expresado en $\text{min}^{-1} \times 10^{-2}$ –, que se calcula según la relación $(\text{Ln } 2/t_{1/2} - t_0) \times 100$, donde t_0 es el minuto en el que la glucosa plasmática alcanza el valor máximo, y $t_{1/2}$ es en el que ese máximo ha descendido, o descendería, a la mitad.

Aquellos animales que presentaron un coeficiente de utilización del azúcar menor de $2,5 \times 10^{-2} \times \text{min}^{-1}$, fueron considerados diabéticos (DT2), y seleccionados para el estudio.

3. MUESTRAS de ESTUDIO

Este trabajo se ha llevado a cabo, por un lado, en miotúbulos en cultivo, diferenciados de mioblastos previamente aislados de músculo esquelético –*vastus lateralis* o abdominal– y, por otro, en el tejido epididimario de la rata macho normal y diabética. Las piezas de

músculo esquelético (≈ 400 mg) fueron obtenidas en el transcurso de intervenciones quirúrgicas de fractura de cadera (sujetos normales) o bariátrica (pacientes obesos), casos en los que las piezas fueron fragmentos residuales de la propia cirugía, a la que el sujeto estuvo sometido por indicación médica; no obstante, se obtuvo previamente el consentimiento del paciente, tras ser éste informado del propósito del estudio.

Las biopsias de músculo se utilizaron para la preparación de miocitos en cultivo primario (M&M, 4). El tejido adiposo de la rata se utilizó para el fraccionamiento de membranas (M&M, 13) o aislamiento de adipocitos (M&M, 5).

4. MIOCITOS HUMANOS

Se establecieron por cultivo primario, a partir de mioblastos aislados y sometidos a crecimiento y diferenciación. Para ello, se desarrolló un protocolo, que es una combinación, con modificaciones, de otros previamente descritos [Blau y Webster, 1981; Henry y col., 1995].

4.1. Aislamiento de mioblastos

La muestra de músculo, inmediatamente después de ser recogida del quirófano, se sometió a tratamiento con tripsina y EDTA, para la extracción de sus células satélite –mioblastos con capacidad de proliferación–, que se encuentran, en muy bajo número, situadas entre la membrana basal y el retículo sarcoplásmico de las fibras del músculo adulto.

Material

Frascos estériles de 75 cm², *Costar Corporation, Cambridge, MA, EE.UU.*

Agitador, *Biomerioux,*

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Incubador de CO₂ *RSBiotech, South Newmoor, Escocia, Gran Bretaña*

Reactivos

hEGF, *Clonetics, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Dexametasona, *Clonetics, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Albúmina bovina, BSA, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Suero fetal bovino, FBS, *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

Gentamicina, *Lab. Normon, S.A., Madrid, España*

Anfotericina, *Clonetics, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Penicilina combinada con Estreptomina (10.000 UI/ml/10.000 µg/ml), *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

L-Glutamina 200 mM, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Colágeno de rata, *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Tripsina 2,5% (p/v), *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

EDTA 2% (p/v), *Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.*

Ácido acético, *Scharlau S.A., Barcelona, España*

Medios

HAM'S F-10, *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

DMEM 1x (*Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña*)

M-199 (*Gibco, Paisley, Escocia, Gran Bretaña*)

Alpha-MEM, que contiene 5,5 mM D-glucosa) *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

Disolución de tripsina/EDTA-a: tripsina 0,05% y EDTA 0,02%, en HAM'S.

Disolución de tripsina/EDTA-b: tripsina 0,025% y EDTA 0,01%, en HAM'S.

De Crecimiento: DMEM/M-199 3/1, (v/v) con hEGF (10 ng/ml), Dexametasona (0,39 µg/ml), BSA (0,5 mg/ml), Gentamicina (50 µg/ml), Anfotericina (50 ng/ml), Penicilina combinada con Estreptomina (50 UI/ml/50 µg/ml), FBS (10% v/v)

De Fusión: Alpha-MEM, suplementado (v/v) con FBS 2%, antibiótico (Penicilina /Estreptomina) 100 UI/ml/100 µg/ml y Glutamina 1%.

Disolución de colágeno: 2,5 mg de colágeno/25 ml ácido acético 0,1 M

Procedimiento

La pieza de músculo esquelético recién obtenida, una vez limpia de sangre y tejido conectivo –por lavado con HAM'S F10–, fue sometida a disociación en condiciones estériles, mediante tres tratamientos sucesivos de 20 minutos con 25 ml de tripsina/EDTA-a, en un frasco estéril de 75 cm², a temperatura ambiente y con agitación energética. A las células, que con el fin de evitar la acción de las proteasas se recogen y mantienen a 4°C tras cada tratamiento de disociación, se añadió FBS en la proporción de 10% (v/v) final, y se sedimentaron a 900 g durante 4 minutos; tras ello, se resuspendieron en 5 ml de medio de crecimiento. Con el fin de eliminar de la preparación el número de fibroblastos, o reducir éstos [*Blau y Webster, 1981*], las células se sembraron en una placa estéril de 100 mm de diámetro, libre de colágeno, donde se mantuvieron durante 20 minutos a 37°C; después, se recogieron las no adheridas, y se inició su proliferación y cultivo en frascos de 75 cm², previamente tratados durante 5 horas con 1 ml de una disolución de colágeno de rata.

4.2. Cultivo y diferenciación (Fig. 5)

Las células se mantuvieron a 37°C en medio de crecimiento (M&M, 4.1.), con recambios de éste cada 3-4 días, en un incubador con atmósfera de O₂/CO₂ (95%/5%), hasta alcanzar, aproximadamente, el 80% de confluencia, lo cual suele ocurrir al cabo de 4-6 semanas. En ese momento, se llevó a cabo una tripsinización suave (tripsina/EDTA-b), con el fin de separar y recoger las células, las cuales, tras esto, y para proseguir con su diferenciación en miotúbulos, se cuantificaron y sembraron en la proporción de 20.000 células por pocillo, estéril y de 35 mm de diámetro.

Las células sembradas se mantuvieron entre 10-15 días, hasta alcanzar el 70-80% de confluencia; en ese momento, el medio de crecimiento se sustituyó por el de fusión, con el fin de lograr la diferenciación de mioblastos a miotúbulos, lo que suele ocurrir en 3-4 días. La eficacia del método de diferenciación fue comprobada por comparación de la actividad creatina quinasa [Gerhard., 1983] entre células sin diferenciar y diferenciadas [Luque y col., 2002], que se duplica en el paso de mioblastos a miotúbulos.

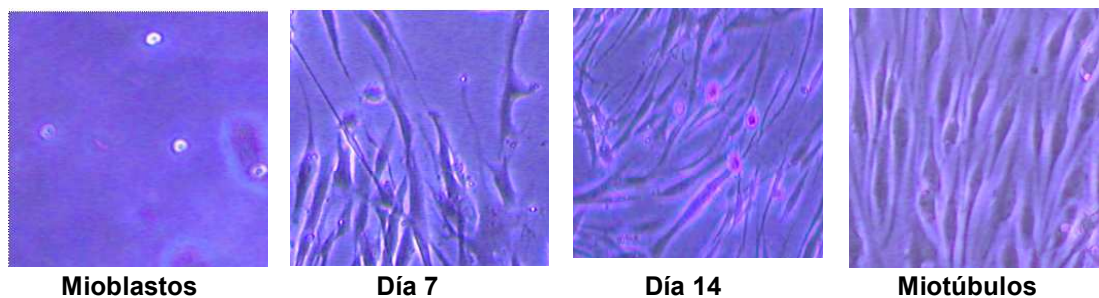


Figura 5. Secuencia en el proceso de células musculares humanas obtenidas por cultivo primario, desde mioblastos hasta su diferenciación a miotúbulos.

5. AISLAMIENTO de ADIPOCITOS

Las células fueron preparadas del tejido epididimario de la rata macho, normal y diabética tipo 2 (M&M, 2), mediante digestión enzimática con colagenasa P [Rodbell, 1964].

Reactivos

Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil]-etasulfónico (HEPES), *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.*

Aprotinina (Trasylo[®]) 100.000 UIC/ml, *Bayer, Leverkusen, Alemania*

Colagenasa P de *Clostridium histolyticum*, *Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania*

D-glucosa anhidra, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Albúmina bovina, Fracción V (BSA), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

KH₂PO₄, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

MgSO₄•7H₂O, *Panreac Química S.A., Barcelona, España*

HNaCO₃, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

CaCl₂, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

NaCl al 0,9% (Salino), *B. Braun Medical S.A., Barcelona, España*

Tripan blue, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Medios

KRB: NaCl 118 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄•7H₂O 1,2 mM, HNaCO₃ 25 mM y CaCl₂ 2,5 mM.

De extracción: KRB con BSA al 3%, D-glucosa 3,3 mM, HEPES 10,9 mM y Trasylol® 500 UIC, pH 7,4.

Azul de Tripán: NaCl 118 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, HNaCO₃ 25 mM, azul de Tripán 0,2%, pH 7,4.

Procedimiento

El tejido adiposo –grasa epididimaria de rata–, se introduce en un vial de plástico que contiene colagenasa P disuelta en medio de extracción (8 mg en 3 ml), y se trocea manualmente con ayuda de tijeras; a continuación, la muestra se mantiene a 37°C y con agitación rápida, hasta su completa disgregación. Los adipocitos dispersos se separan por filtración a través de una malla de nylon de 0,6 mm de poro, y se lavan 3 veces con 10 ml de medio de extracción que, tras ello, se descarta. La calidad de la preparación se evalúa mediante la prueba de exclusión del Azul de Tripán (25 µl adipocitos + 25 µl Azul de Tripán + 450 µl medio de extracción). Todas las preparaciones utilizadas en este estudio contenían, al menos, un 90% de células viables.

6. AGENTES de ESTUDIO

En este trabajo, se ha utilizado:

Insulina de cerdo, *Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca*

GLP-1(7-36)amida, *Bachem AG, Bubendorf, Suiza*

Exendina 1-39amida [Ex-4], donada por el Dr. J. Eng, NY, EE.UU.

Exendina 9-39amida [Ex-9], donada por el Dr. J. Eng, NY, EE.UU.

7. TRATAMIENTO de los ANIMALES

Con el fin de estudiar el efecto a largo plazo de la Ex-4 sobre la expresión del glucotransportador mayoritario en el tejido adiposo del modelo de diabetes experimental tipo 2 (DT2), con respecto a la rata normal, se utilizó, como vía de administración del péptido, una bomba osmótica implantada subcutáneamente. Como control del tratamiento, ratas de ambos grupos fueron tratadas, en paralelo, con disolución salina.

Reactivos

Exendina-4, donada por el Dr. J. Eng, NY, EE.UU.

Bomba osmótica mod. ALZET 1003D, Alza Corp., Palo Alto, EE.UU..

Seda quirúrgica 2/0, B. Braun Surgical S.A., Barcelona, España.

NaCl al 0,9% (Salino), B. Braun Medical S.A., Barcelona, España

Procedimiento

A todas las ratas de estudio –normales y DT2– que habían sido sometidas cuatro días antes a una sobrecarga intravenosa de glucosa (M&M, 2.1.), se les implantó subcutáneamente, en la región interescapular, la bomba osmótica rellena con Ex-4 a la concentración de 0.1 nmol/Kg/h en salino, que se fue liberando a un ritmo de 1 μ l/h (información del fabricante y verificada en nuestro laboratorio), para el mantenimiento de los niveles del péptido a $\approx 10^{-9}$ M. En paralelo al tratamiento con Ex-4, ratas de ambos grupos –normal y DT2– recibieron salino a través de la bomba osmótica (control).

Antes de iniciar el tratamiento y finalizando el mismo, se extrajeron muestras de sangre para la determinación de la concentración plasmática de glucosa, por el método de la glucosa oxidasa y de insulina, por radioinmunoanálisis [Herbert y col., 1965]. A los tres días del tratamiento, se sacrificó al animal, del que se recogió el tejido adiposo epididimario, para la medida de la expresión del glucotrasportador (M&M, 14).

8. TRANSPORTE de GLUCOSA

Se estudió como incorporación de 2-deoxi-D-glucosa –marcada radiactivamente– al interior celular.

Material

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Reactivos

Citocalasina B, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-Deoxi-D-[1,2-³H(N)]glucosa, *Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.*

NaOH, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

DMSO, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Ftalato de bis (2-etil-hexilo), *Scharlau S.A., Barcelona, España*

Líquido de centelleo, *Ultima gold, Packard, Groninger, Holanda*

Medios

Alpha-MEM (que contiene 5,5 mM D-glucosa), *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

NaOH 1N

Medio Incubación miocitos (KRB): Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, MgSO₄, CaCl₂, KCl 2,5mM, NaH₂PO₄ y CH₃COCOONa 1mM, pH 7,4.

Medio de incubación adipocitos: KRB (M&M, 5) con BSA al 2%, HEPES 10,9 mM y Trasylol® 500 UIC, pH 7,4.

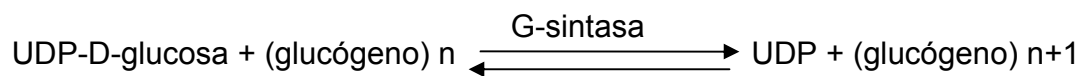
Procedimiento

Los miocitos (20.000/pocillo) o los adipocitos aislados (10⁵ células) — en la proporción de 10⁶ células/ml—, se incubaron en medio de incubación durante 30 o 15 minutos respectivamente a 37°C, sin (control) o con los péptidos de estudio. Seguidamente, se añadió 0,2 µCi de 2-deoxi-D-glucosa a cada tubo, y la mezcla se incubó durante 3 minutos a 37°C con 0,2 µCi (10 µl) de 2-deoxi-D-[1,2-³H(N)]glucosa (6,7 nCi/mmol). El contenido total de glucosa fue corregido con el valor del transporte inespecífico, obtenido en algunas muestras de células de cada experimento tratadas en paralelo con 3,23 mM de citocalasina B. La reacción se interrumpió por sometimiento de las muestras a 4°C, durante 1 minuto, y las células se lavaron dos veces con 1 ml de medio de incubación, con el fin de eliminar el exceso de glucosa radiactiva no incorporada. Los miocitos, disueltos en 1 ml de NaOH 1 N, se añadieron a 5 ml de líquido de centelleo, para la estimación de su contenido en radiación. En el caso de los adipocitos para la separación de la fase acuosa —radiactividad libre— de la oleaginoso —adipocitos—, se transfirieron dos fracciones de 150 µl de cada muestra a sendos tubos de microfuga con 100 µl de ftalato de bis (2-etil-hexilo), y se sometieron a 12.000xg durante 1 minuto. Cada tubo se cortó por la interfase, y la radiactividad asociada a las células se midió en 3 ml de líquido de centelleo, en un contador de radiación beta.

9. ACTIVIDAD GLUCOGENO SINTASA a

Se utilizaron células diferenciadas, sembradas en la proporción de 20.000 por pocillo de 35 mm de diámetro. Los miocitos se incubaron inicialmente en ausencia (control) y presencia de los péptidos de estudio. La actividad glucógeno sintasa a se midió según el método ya descrito [Hue y col., 1975], en presencia de Na₂SO₄, –inhibidor de la forma inactiva, b, del enzima–, y como formación de glucógeno a partir de UDP-¹⁴C-glucosa, según la reacción:

El procedimiento de extracción del glucógeno formado fue el descrito por nuestro laboratorio [Hue y col., 1975].



Material

Contador de radiación beta BECKMAN LS 6000TA, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.

Reactivos

Glicilglicina, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.

Glucógeno, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.

UDP-glucosa, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.

UDP-¹⁴C-glucosa, American Radiolabeled Chemicals, INC., St Louis, MO, EEUU.

Líquido de centelleo, Última gold, Packard, Groninger, Holanda

KOH, E. Merck, Darmstadt, Alemania

Medios

Alpha-MEM, (que contiene 5,5 mM D-glucosa), Biochrom KG, Berlín, Alemania

KOH 0,5 N

De Fusión: Descrito en el punto 9 de este capítulo.

De Homogeneización: FNa 100 mM, Glucógeno 0,5% (p/v), Glicilglicina 50 mM y EDTA 35 mM, pH 7,4

De Incubación: UDP-glucosa 0,25 mM, Glucógeno 1%, Glicilglicina 60 mM, Na₂SO₄ 10 mM, EDTA 4,7 mM y UDP-¹⁴C-glucosa 1,25 µCi/ml (1,5 µM)

Procedimiento

Los miotúbulos células (20.000/pocillo) se incubaron durante 10 minutos a 37°C, en 1 ml de alfa-MEM en ausencia o presencia de los péptidos de estudio; tras ello, se retiró el medio, y las células se conservaron a –70°C hasta el momento de la determinación de sus actividades enzimáticas. Entonces, a cada pocillo se añadió 30-50 µl de medio de

homogeneización a 4°C, con intención añadida de ajustar la proporción de proteínas a 160 µg proteína/40 µl, para lo que éstas fueron previamente medidas [Bradford, 1976] en un par de muestras. Después, se recogió el homogeneizado, y se transfirió a un tubo de cristal en el que se terminó de disgregar por sonicación. A continuación, en un tubo de 10 ml de capacidad, que contenía 80 µl de medio de incubación, se añadieron 40 µl del homogeneizado celular, y la mezcla se incubó durante 15 minutos a 20°C. Pasado ese tiempo, se añadieron 200 µl de KOH 0,5 N para su disolución y, después 35 µl de glucógeno al 10,5% (final, 100 mg/ml) y 2 ml de etanol al 78%, (final, 66%) y a 4°C; tras unos segundos de agitación, se mantuvo en reposo durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 150 g durante 10 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió de nuevo en 5 ml de etanol al 66%, para su lavado; tras una nueva centrifugación a 1.740 g durante 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, y se añadieron 400 µl de agua para la disolución del glucógeno precipitado que, después, se transfirió a un vial que contenía 5 ml de líquido de centelleo, para la estimación de su contenido en ¹⁴C en un contador de radiación β.

10. PROTOCOLO de ESTUDIO de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN

En miocitos de obesos mórbidos, y de sujetos normales, se analizó el grado de actividad de enzimas intracelulares de distintas vías propuestas en la señalización del GLP-1, y el posible efecto de los péptidos de estudio, sobre las mismas enzimas, en membranas totales solubilizadas –PI3K, PKB, p70s6k y p44/42 MAPKs–, y en las plasmáticas, el citosol, en el caso de las PKCs (M&M, 13).

Material

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Reactivos

Sacarosa, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Tris-HCl, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl₂, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

2-mercaptoetanol, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

EGTA, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na₃VO₄, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Na₄P₂O₇, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

NaF, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Bacitracina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Leupeptina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Pepstatina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

PMSF, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Triton X-100, *E.Merck, Darmstadt, Alemania*

Medios

Alpha-MEM (que contiene 5,5 mM D-glucosa), *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

De Fusión: descrito en el punto 9 de este capítulo

PMSF 20 mM: PMSF 20 mM en 2-propanol

De solubilización: Sacarosa 250 mM, tris-base 20 mM, cloruro de magnesio 2,5 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, EGTA 1,2 mM, ortovanadato sódico 1 mM, pirofosfato sódico 5 mM, fluoruro sódico 50 mM, bacitracina 30 U/ml, leupeptina 2 μ M, pepstatina 2 μ M, PMSF 2 mM, pH 7,4, con 1% de triton X-100

Procedimiento

Los miotúbulos (20.000/pocillo) se preincubaron durante 30 minutos a 37°C en atmósfera de O₂/CO₂ (95%/5%), en 900 μ l de alpha-MEM; transcurrido este tiempo, se sometieron a 3 minutos de incubación, en ausencia (control) y presencia de los péptidos en estudio. Finalmente, y de forma rápida, se eliminó el medio y enfrió la placa a 4°C, se añadió a cada pocillo 100 μ l de medio de solubilización, y se separaron las células por raspado. Las células de pocillos de una misma condición se recogieron en un sólo tubo Eppendorf, donde permanecieron al menos media hora a 4°C, con agitación cada 10 minutos. Tras ello, la muestra se centrifugó a 15.000 g, durante 5 minutos a 4°C, y del sobrenadante, que contenía las membranas totales solubilizadas, se tomó un pequeño volumen para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford, 1976]; el resto se almacenó a -70°C hasta el estudio de la actividad de la PI3K por cromatografía en capa fina en, y la de PKB, p70s6k y MAPKs por Western blot.

11. ACTIVIDAD PI3K

Se estimó como la fosforilación de PIP₂ a PIP₃, en inmunoprecipitados p85 obtenidos por tratamiento de cada preparación de membranas con anti-PI₃-quinasa p85 y posterior acoplamiento a Proteína-A-agarosa, y en presencia de ATP y fosfatidilinositol/fosfatidilserina como sustrato. El procedimiento, aparte de la inicial inmunoprecipitación de la fracción p85 de la muestra, incluyó la reacción de ésta con [³²P] ATP en presencia del sustrato, la extracción de los lípidos formados, la separación de éstos por cromatografía, y la identificación y cuantificación del PIP₃.

11.1. Inmunoprecipitación

Se realizó en cada muestra de membranas de miocito ya preparada (M&M, 10.), por reacción con un anticuerpo contra la subunidad reguladora del enzima PI3K –la p85–, y aislamiento posterior del complejo formado, por acoplamiento a Proteína A-agarosa.

Material

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Reactivos

Triton X-100, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España.*

KCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Na₂HPO₄, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

KH₂PO₄, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Ácido etilén-diaminotetraacético (EDTA), *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

LiCl, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Anti-PI3-Kinase p85 (antisuero de conejo), *Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EE.UU.*

Proteína A-agarosa, *Boehringer Mannheim, Barcelona, España*

Medios

De solubilización: descrito en el punto 10 de este capítulo.

PBS 1X: (tampón fosfato salino): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 6,3 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM, pH 7,4

Disolución I: Triton X-100 1%, PBS 1x.

Disolución II: Tris-base 0,1 M, EDTA 1 mM, LiCl 0,5 mM.

Disolución III: Tris-base 5 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM.

Procedimiento

- 50-100 µg de proteína del preparado de las membranas (M&M, 11), ajustada su concentración a 100 µg/ml con medio de solubilización, en tubo Eppendorf.
- Adición de 10 µl de suero anti-p85, diluido 1:10, por cada ml de disolución de proteína, e incubación a 4°C durante 16 horas.
- Adición de 50 µl de Proteína A-agarosa por ml, e incubación a 4°C durante 2 horas.
- Centrifugación a 15.000xg, a 4°C, 10 segundos, y eliminación del sobrenadante.
- Lavado de los inmunoprecipitados, y en el siguiente orden, con:
 - 1 ml de disolución I. Centrifugación a 15.000xg, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.

1 ml de disolución II. Centrifugación a 15.000xg, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.

1 ml de disolución III. Centrifugación a 15.000xg, a 4°C, 10 segundos. Desechar el sobrenadante.

- Determinación de la actividad PI3K (formación de PIP₃).

11.2. Formación de PIP₃

Se induce en el inmunoprecipitado p85 de cada muestra (M&M, 11.1.), a partir del sustrato fosfatidilinositol/fosfatidilserina añadido, y en presencia de ATP.

Reactivos

HEPES, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Fosfatidilinositol, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Fosfatidilserina, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

MgCl₂•6H₂O, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

EGTA, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

ATP, *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

[γ³²P] ATP (10μCi/μl), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra*

Medios

Solvente del sustrato (SS): HEPES 25 mM, EDTA 1 mM, en agua.

Sustrato (preparación): 1 mg de fosfatidilinositol/1 ml SS y 1,2 mg fosfatidilserina/1,2 ml SS. Combinar ambas disoluciones a partes iguales (v/v), y sonicar la mezcla hasta que la disolución pase de turbia a translúcida. Proteger de la luz y conservar a 4°C.

Mezcla de reacción: HEPES 12,5 mM, MgCl₂•6H₂O 10 mM, EGTA 0,5 mM, ATP 40 μM, [γ³²P] ATP (5 μCi/nmol).

Procedimiento

A cada inmunoprecipitado (M&M, 11.1.), se añade 25 μl de sustrato y, tras incorporar un mismo volumen de mezcla de reacción, el conjunto se mantiene a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación periódica. A continuación, se procede a la extracción de los lípidos formados.

11.3. Extracción de lípidos

El fin último es el de la recuperación del PIP₃, que se consigue por tratamiento de la muestra con un medio orgánico.

Material

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Sistema evaporador-concentrador Speed Vac Concentrator, *Savant Instrument Inc., Hicksville, NY, EE.UU.*

Reactivos

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España*

Metanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

HCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España*

EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania*

Medios

Cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v).

100 mM HCl en metanol.

100 mM en metanol/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v)

Procedimiento

- Adición, por el siguiente orden, de:
 - 400 µl de cloroformo/metanol/HCl (1/2/1, v/v)
 - 150 µl de cloroformo
 - 150 µl de HCl 10mM
- Agitación en vórtex, y centrifugación a 15.000xg, 4°C, durante 30 segundos.
- Recogida de la fase inferior y transferencia a nuevo tubo Eppendorf.
- Adición de 500 µl de metanol-100 mM HCl/EDTA 2,5 mM (1/1, v/v)
- Mezcla y centrifugación a 15.000xg, 4°C, 30 segundos.
- Recogida de la fase inferior, distribución en dos porciones de igual volumen en sendos tubos Eppendorf, y evaporación durante 20 minutos, a temperatura ambiente o con Speed-Vac, hasta sequedad.

El extracto obtenido se somete a la separación de sus lípidos.

11.4. Separación de lípidos

Se realizó por cromatografía en capa fina en placa de silicagel, con el fin de aislar, del total de lípidos extraídos (M&M, 11.3.), el PIP₃ producido en cada muestra.

Material

Placa de TLC (20 x 20 cm²), *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Película fotográfica, Hyperfilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Estándar fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP₄), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

Cubeta de cromatografía (24 x 24 x 8 cm³), *Teknokroma S. Coop. C. Ltda., Barcelona, España.*

Escáner hp scanjet 7400, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para densitometría. *Software Image Quant® 3,3, Molecular Dynamics, EE.UU.*

Reactivos

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

1-Propanol, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Ácido acético, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Revelador y fijador fotográfico Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

Medio

De revelado: Lx24, al 20% en agua.

De fijación: AL4, al 20% en agua.

TLC: 1-propanol 66%, ácido acético glacial 2%, agua bidestilada 32% v/v.

Procedimiento

Se prepara el sistema para cromatografía, mediante la colocación, en la cubeta, de una tira de papel de filtro que forra el fondo y dos de las paredes, y su humidificación con 100 ml de medio TLC. A continuación, se aplican los extractos de lípidos (30 µl) disueltos en cloroformo, y el estándar PIP₄ de referencia de posición, a 3 cm del borde de la placa de silicagel, con una separación de 1,5-2 cm entre ellos. La placa se introduce con el extremo de las muestras hacia la base de la cubeta, y así se mantiene mientras que el frente avanza hasta, aproximadamente, 3 cm del extremo superior —4 horas—. Finalizado esto, la placa se deja secar al aire, y se autorradiografía a -70°C (Hyperfilm ECL, Amersham) durante el tiempo que se estime necesario (horas o días). Tras el revelado de la película, se cuantifica la densidad de las bandas mediante densitometría de transmisión, que se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica.

12. ACTIVIDAD PKB, p70s6k y p44/42 MAPKs

En miocitos, analizamos la posible estimulación de la actividad de enzimas de señalización intracelular por los agentes de estudio, para lo que se midió la forma activa del enzima (fosforilada) y también la total, mediante la técnica de Western blot.

12.1. Western blot

El estudio en cada muestra, ya preparada (M&M, 10), de las distintas enzimas de nuestro interés, pasó por una separación electroforética previa de proteínas, una posterior transferencia de éstas a membrana de nitrocelulosa, y por el tratamiento de la misma con un anticuerpo específico para cada enzima, seguido de un segundo, antiglobulina, con una enzima acoplada que posibilita la generación posterior de la quimioluminiscencia necesaria en el proceso de detección por autorradiografía.

a) Separación de proteínas

Se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida [Laemli, 1970], en un sistema compuesto por una fuente de alimentación eléctrica, una cubeta vertical, cristales, separadores y peine.

Material

Cubeta Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System, *Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.*

Fuente de alimentación Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.*

Spacer plates (0,75 mm) Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.*

Short plates, Mini PROTEAN 3 System, *Bio-Rad Laboratories, CA, EE.UU.*

Reactivos

Acrilamida (*Bio-Rad laboratories, CA, EE.UU*)

Bisacrilamida (*Bio-Rad laboratories, CA, EE.UU*)

TEMED (*Bio-Rad laboratories, CA, EE.UU*)

Persulfato de amonio (*Bio-Rad laboratories, CA, EE.UU*)

Tris(hidroximetil) aminometano (TRIS, *Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.*)

Acido etilen-diaminotetraacético (EDTA, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*)

Dodecil lauril sulfato (SDS, *Ferosa, Barcelona, España*)

Glicerol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.*)

2-mercaptoetanol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.*)

Glicina (*Bio-Rad laboratories, , EE.UU.*)

Azul de bromofenol (*Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.*)

Medios

De concentración: Tris-base 0,05 M, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 6,7.

De resolución: Tris-base 0,375 M, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,9.

Tampón de electroforesis: Tris-base 50 mM, glicina 375 mM, SDS 0,1%, EDTA 2 mM.

Tampón de muestra: Tris-base 125 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul bromofenol 0,005%, β -mercaptoetanol 10%.

Procedimiento

Se diluyeron entre 20-50 μ g de proteína de membrana solubilizada (M&M, 10.) en tampón de muestra (1/1), y la disolución se mantuvo a 65°C durante 3 min antes de ser aplicada al gel de electroforesis. Tras su aplicación, y durante los primeros 60 minutos, la electroforesis se desarrolló a 40 V, que correspondió al paso de la muestra a través del gel de concentración (4% de acrilamida en medio concentrante); después, la intensidad fue aumentada a 100 V, y así se sostuvo durante unas dos horas, que es normalmente el tiempo necesario para que la muestra haga el recorrido del gel de desarrollo (8% de acrilamida en medio de desarrollo). El proceso se interrumpió cuando el frente de azul de bromofenol, incluido como marcador de posición de la muestra, alcanzó el extremo opuesto del gel.

b) Transferencia

El paso de las proteínas, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida, a una membrana de nitrocelulosa –donde se procedería a la inmunodetección de los enzimas en estudio–, se realizó eléctricamente.

Materiales

Fuente de alimentación eléctrica (Mini-PROTEAN 3 Cell PowerPac 300 System, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*)

Sistema de transferencia (Trans-blot SD, *Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*)

Membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*)

Papel de filtro Extra Thick Filter Paper (*Bio-Rad laboratories, Hercules, EE.UU.*)

Reactivos

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma Chemical Co., MO, St. Louis, EE.UU.*

Glicina, *Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.*

Dodecil sulfato sódico (SDS), *Ferosa, Barcelona, España*

Metanol, *Scharlau, Barcelona, España*

Medio de transferencia: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0,0375%.

Procedimiento

Por un lado, el gel de poliacrilamida procedente de la separación de proteínas (M &M, 12.1.) se mantuvo durante 30 min en medio de transferencia; por otro, la membrana de nitrocelulosa, y dos papeles de filtro de igual tamaño que el gel, se empaparon en el

mismo medio. Después, sobre el electrodo positivo del sistema se situó uno de los papeles de filtro, encima, la membrana de nitrocelulosa, sobre ésta, el gel, y, por último, el segundo papel de filtro. La transferencia se desarrolló a 10 V durante 16 h a 4°C, o bien a 20 V durante 1 h a temperatura ambiente (la duración y el voltaje adecuados hubieron de ser determinados previamente). Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se sometió a inmunodetección y cuantificación de los enzimas a estudiar en cada caso.

c) Inmunodetección

Este proceso se realizó siguiendo las indicaciones de los reactivos para Western blot, proporcionados por Amersham Ibérica.

Material

Película fotográfica, Hyperfilm ECL, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra.*

Escáner hp scanjet 7400, *Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EE.UU.*

Programa para determinación de densidades ópticas, *Software Image Quant® 3,3, Molecular Dynamics, EE.UU.*

Reactivos

Tris(hidroximetil) aminometano (Tris-base), *Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.*

NaCl, *Panreac Química S.A., Barcelona, España*

Tween-20, *Bio Rad Laboratories, Ca, E.E.U.U.*

Leche desnatada en polvo, *Molico Sveltesse, Sociedad Nestlé, Barcelona, España*

Sueros anti-Akt/PKB total y fosforilada, anti-p42/44 MAPK total y fosforilada, anti-p70s6k total y fosforilada, *Cell Signalling Technology, New England Biolabs, EE.UU.*

Suero anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano picante, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra*

ECL Western Blotting Reagents, reactivos quimioluminiscentes, *Amersham Life Science, Buckinghamshire, Inglaterra*

Revelador y fijador fotográfico, Lx24 y AL4, *Kodak Eastman, Rochester, EE.UU.*

Medios

De revelado: Lx24, al 20% en agua.

De fijación: AL4, al 20% en agua.

T-TBS: Tween-20 0,1%, Tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5.

TBS-LD: Tris-base 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, 5% de leche desnatada.

Procedimiento

La membrana de nitrocelulosa, con las proteínas transferidas, se mantiene en TBS-LD durante 1 hora a temperatura ambiente; tras lavado con T-TBS, la membrana se

incuba durante 2 horas con el primer anticuerpo específico, a la dilución de 1:500 en T-TBS en todos los casos. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-LD, y se procede a su tratamiento con anti-IgG de conejo, 1:500 en T-TBS, durante 1 hora. Una vez concluido el tiempo de incubación con el segundo anticuerpo, la membrana se lava de nuevo con T-TBS (no menos de 45 minutos) y, finalmente, se trata durante 1 minuto con los reactivos quimioluminiscentes, procediendo después a su autorradiografía, por exposición de entre 5 y 60 minutos a una película fotográfica. Tras el revelado de la película, se cuantifica la densidad de las bandas por densitometría de transmisión, que se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica.

13. TRANSLOCACIÓN de ISOFORMAS PKC

En miocitos en cultivo primario de sujeto normal, se estudiaron los posibles movimientos de translocación desde el citosol a la membrana de isoformas PKC θ , λ y ϵ , en respuesta al GLP-1, Ex-4 y Ex-9, con relación a la insulina.

Material

Ultracentrífuga BECKMAN TLC-100, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*
Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Reactivos

Anti-PKC θ , λ y ϵ , *BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, EE.UU.*

Medio de incubación para miocitos: Alpha-MEM (que contiene 5,5 mM D-glucosa), *Biochrom KG, Berlín, Alemania*

Medios

PMSF 20 mM: Descrito en el punto 10 de este capítulo

De Homogenización: Descrito en el punto 9 de este capítulo

De solubilización: Descrito en el punto 10 de este capítulo

Procedimiento

Las células (miotúbulos, 20.000/pocillo) se preincubaron a 37°C en 900 μ l de medio de incubación, y en atmosfera O₂/CO₂ (95%/5%). Transcurrido ese tiempo, se incubaron por distintos periodos (0, 2 y 15 minutos) en el mismo medio, en ausencia (control) y presencia de los agentes de estudio. La reacción se interrumpió por inmersión a 4°C.; finalmente, los miocitos se recogieron por raspado. Tras lo anterior, las células se sometieron al proceso de fraccionamiento de membranas –citosólicas y plasmáticas– [Arnold y col., 1993].

A cada muestra de miocitos, se añaden 800 µl de medio de homogenización; tras 30 minutos a 4°C con agitación continua, la mezcla, es transferida a un tubo Eppendorf, se somete a 10.0000 x g, durante 1 hora, a 4°C. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante, que contiene las membranas citosólicas, se conservan a -70°C hasta el estudio de expresión de la isoforma PKC correspondiente. El pellet, que contiene las membranas plasmáticas, se lava con 1 ml de medio de homogenización, se trata con 300 µl del medio de solubilización durante 1 hora, a 4°C, y se somete a 15.000 x g para la eliminación de partículas no solubles de desecho. De ambas fracciones, se separó una pequeña porción para la determinación de su contenido en proteínas [Bradford, 1976]. La presencia, tanto en el citosol como en la membrana, de cada una de las isoformas PKC, se analizó por Western-Blot (M&M, 12.1.), utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas.

14. DETERMINACIÓN de la EXPRESIÓN del GLUT-4

Se analizó Glut-4 (proteína y ARNm) en el tejido adiposo de la rata normal y DT2. El análisis de ARNm se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP-TR), y el de la proteína, por Western blot.

14.1. ARNm-Glut-4

El procedimiento incluyó, por este orden, el aislamiento del ARN total y su cuantificación, la síntesis de ADN complementario (ADNc), y la determinación, con sondas específicas marcadas con un fluorocromo, de la cantidad relativa de ARNm del glucotransportador.

Aislamiento de ARN

Se extrajo con TRI REAGENT™, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Material

Centrífuga BECKMAN GS-15R, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Centrífuga BECKMAN J-6B, *Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.*

Reactivos

TRI REAGENT™, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Cloroformo, *Scharlau S.A., Barcelona, España.*

Isopropanol, *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Etanol, *E. Merck, Darmstadt, Alemania.*

Dietil pirocarbonato (DEPC), *Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.*

Medios

Etanol al 75% en agua destilada.

Agua-DEPC, DEPC 0,1% en agua destilada. El DEPC se deja agitando durante toda la noche a temperatura ambiente.

Procedimiento

Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad, con el fin de evitar contaminaciones con ARNasas. El tejido de estudio 500 µg se homogeneizó en 5 ml de TRI REAGENT™, y a continuación se sedimentó el material extracelular a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C, para su deshecho. El sobrenadante, que se distribuyó en fracciones de 1 ml, y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, para asegurar la disociación de los complejos núcleo-proteicos. Tras ello, y a cada fracción, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se mezcló con ayuda de vórtex durante 15 segundos, y se dejó reposar a temperatura ambiente entre 2-15 minutos. A continuación, se centrifugó a 12.000 g, 15 minutos, con lo que se produce el fraccionamiento de la mezcla en tres fases, de las cuales, se recogió la acuosa (superior), que contiene el ARN. Ésta se pasó a otro tubo, en el que se añadió 0,5 ml de isopropanol; tras mezclar suavemente, se dejó reposar durante 5-10 minutos, y se sometió a 12.000 g, durante 10 minutos a 4°C. El sedimento (ARN), tras lavado con etanol al 75% y centrifugación (7.500 g, 5 minutos a 4°C), se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el ARN obtenido se disolvió en 50 µl de agua-DEPC. Una porción de 10 µl se utilizó para la valoración de la concentración en ARN, que se cuantificó espectrofotométricamente a 260/280 nm. El grado de pureza de la muestra se estimó por la relación de lecturas DO_{260}/DO_{280} , considerándose óptimo un resultado comprendido entre 1,7 y 2.

Síntesis de ADNc

A partir del ARN extraído (1µg), se sintetizó una copia de ADNc por transcripción reversa. Para ello, se utilizó un preparado comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit*), y se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Material

Termociclador, *PTC-100, MJ Research*

Reactivos

High-Capacity cDNA Archive Kit: 10X RT Buffer, 25X dNTPs, 10X RP, Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa, *Applied Biosystems 94404 EE.UU.*

Medios

RT: 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de 10X RP, 1 µl de Enzima Multiscribe™ Reverse Transcriptasa y 3,2 µl de agua-DEPC

Procedimiento

Se mezcla, suavemente, 1µg de ARN disuelto en 25 µl de agua-DEPC, con 25µl de medio RT, y se somete a tres incubaciones en el termociclador, en el siguiente orden: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 2 minutos a 95°C. El ADNc obtenido (1µg/50µl) se conserva a -20°C hasta continuar con el proceso de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

RT-PCR

Con esta técnica, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Además, la fluorescencia emitida durante la amplificación indica la cantidad de ADN sintetizado en cada momento e, indirectamente, la de ARNm de la muestra.

La sonda utilizada, específica del Glut 4, está marcada con un fluorocromo donador en el extremo 5' y con otro aceptor en el 3', de tal manera que, mientras permanezcan próximos, el fluorocromo en 3' absorbe la emisión del primero. Sin embargo, tras la hibridación de las sondas con la cadena de ADNc, durante la amplificación, la actividad 5' exonucleasa de Taq (polimerasa de *Thermus aquaticus*) hidroliza el extremo 5' de la sonda, y se produce la fluorescencia que es detectada por el lector.

Material

Micro Amp™, placa óptica 96 pocillos, *Applied Biosystems 94404 USA*

Sequence Detection System, Abi Prism 7000, *Applied Biosystems 94404 USA*

Reactivos

TaqMan Universal PCR Master Mix, *Applied Biosystems 94404 USA*

TaqMan® Gene Expression Assays: Sonda GLUT -4, de rata, marcados con fluorocromo FAM y 18s eucariota, marcado con fluorocromo VIC, *Applied Biosystems 94404 USA*

Procedimiento

La reacción de amplificación se realizó en 2 µl de ADNc (M&M, 11.1) y en un volumen final de 20 µl con los cebadores del sistema *Assays on Demand* y los reactivos *TaqMan Universal PCR Master Mix*, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Cada muestra fue analizada por triplicado, y el valor medio se utilizó para el cálculo de la expresión de ARNm. La cantidad de ARNm del gen de interés se normalizó con la de ARN ribosómico 18s (por el método de comparación del valor de $2^{-\Delta CT}$), que fue utilizado como control endógeno. Además, para evitar errores de manipulación, ambas sondas, la del glucotransportador y la del 18S, se hibridaron en el mismo pocillo.

14.2. Proteína-Glut-4

El procedimiento fue básicamente el descrito por nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001]. Aquí también, el análisis del contenido en proteína Glut-4 de las membranas celulares aisladas de tejido adiposo, se llevó a cabo por la técnica de Western blot, ya descrita en detalle en el apartado 12.1 de este capítulo. En este caso, se utilizó un anticuerpo específico para el transportador (*E. Merck, Alemania*); además, para la normalización los resultados, se midió, en paralelo, el contenido en tubulina por inmunodetección de los geles con un suero anti- α -tubulina, basándonos en la premisa de que su valor permanece constante en la membrana, en cualquier condición.

15. INFORMACIÓN de los RESULTADOS

Los valores obtenidos se han expresado como media \pm el error estándar de la media (EEM), junto con el número de observaciones (n). La significación estadística ($p < 0,05$) de los incrementos fue valorada por el test de la *t* de Student, o por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del *Least Significant Differences* (LSD) test para comparación múltiple *post-hoc*, mediante el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

RESULTADOS

1. CAPTACIÓN BASAL de GLUCOSA y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO respecto al SUJETO NORMAL

La **Tabla 1** recoge los valores de 2 deoxi-D-[1,2-³H] glucosa en miocitos en cultivo primario de pacientes afectados de obesidad mórbida, en relación al sujeto normal, y la acción a 10⁻⁸ M de GLP-1, Ex-4, Ex-9 e insulina.

Tabla 1. Transporte de glucosa (fmol glucosa/2x10⁴ células) en miocitos de pacientes obesos mórbidos respecto a células de sujeto normal.

	n	Basal	Ins	GLP-1	Ins+GLP-1	Ex-4	Ex-9
Obesos	6	7,0 ± 0,5 §	13,3 ± 0,6 *	14,0 ± 0,8 *§	13,4 ± 0,5 *	9,6 ± 0,4 *	13,8 ± 0,6 * §
Normales	4	14,6 ± 1,1	28,0 ± 1,3 *	20,6 ± 0,8 *	26,3 ± 1,6 *	21,3 ± 1,2 *	21,5 ± 0,8 *

Media ± EEM, n= número de sujetos. **p*<0,01 vs basal, § *p*<0,001 vs normales en la misma condición.

El valor de transporte de glucosa control –obtenido en ausencia de hormonas/péptidos– en la célula del obeso mórbido fue significativamente (*p*<0,001) menor (prácticamente la mitad) al previamente obtenido en nuestro laboratorio en células de sujeto normal [González y col., 2004]. Sin embargo, el miocito del obeso conservó su capacidad de respuesta al GLP-1 (**Tabla 1** y **Fig. 6**), y también a la Ex-4 y a la Ex-9 (**Tabla 1** y **Fig. 7**), alcanzando con cada una de ellas un valor próximo al basal del sujeto normal.

El estímulo inducido por GLP-1 sobre la captación del azúcar en el miocito del obeso mórbido resultó de la misma magnitud que el producido por insulina; sin embargo, cuando ambas hormonas estaban presentes en el medio de incubación, el incremento obtenido resultó no ser distinto al inducido por cada una de ellas estudiadas individualmente –al igual de lo previamente observado en células de sujeto normal [González y col. 2005a]–, sugiriendo, entre otras razones posibles, una desensibilización de la célula a esa concentración de ambas hormonas.

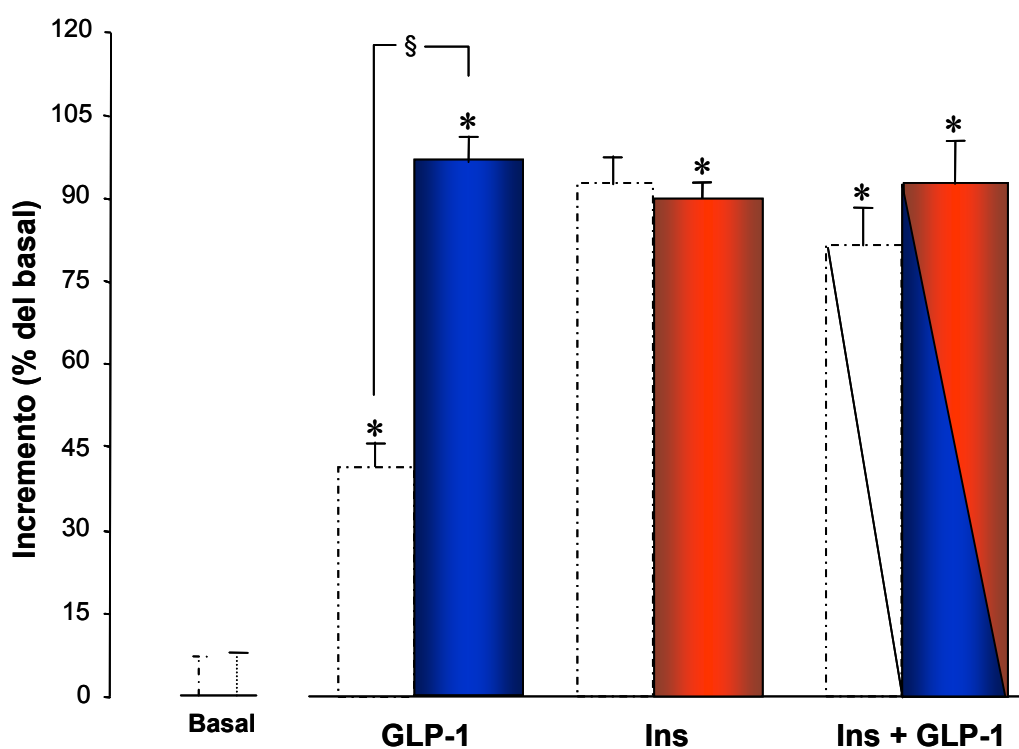


Figura 6. Efecto del GLP-1 e insulina, a 10^{-8} M, y de la combinación de ambos, sobre la captación de 2-deoxi-D-[1,2- 3 H]glucosa en miocitos de obeso mórbido con relación al sujeto normal (□), durante 35 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=4-6 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. * $p=0,001$ vs basal, y § $p=0,001$ vs control.

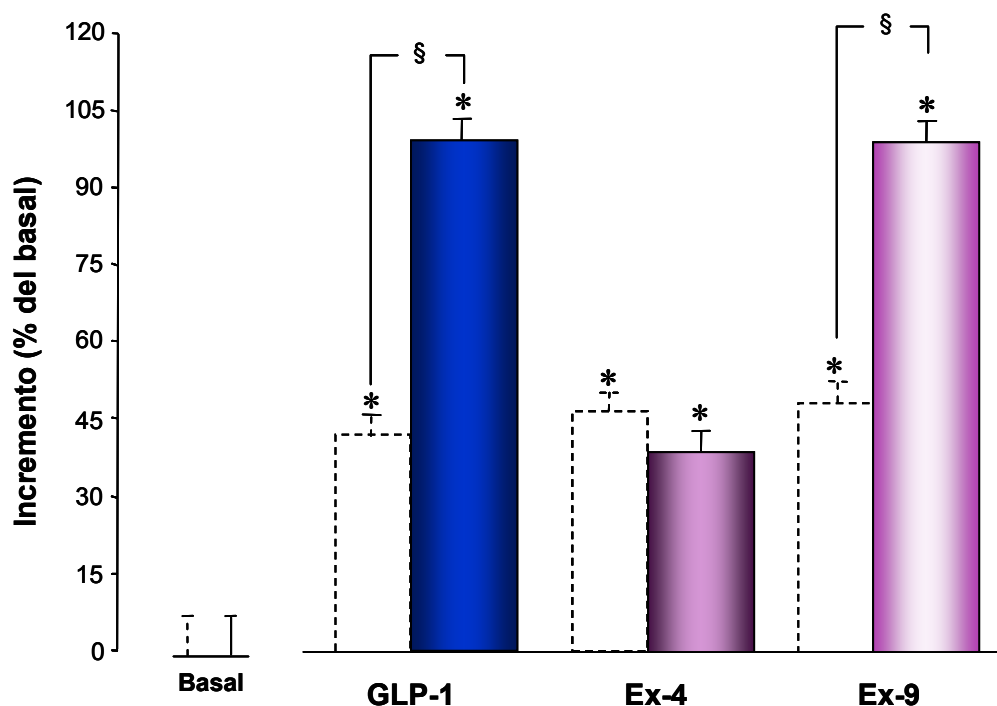


Figura 7. Efecto de la Ex-4, Ex-9 y GLP-1, todos a 10^{-8} M, sobre la captación de 2-deoxi-D-[1,2- 3 H]glucosa en miocitos de obeso mórbido con relación al sujeto normal (-----) durante 35 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=6-4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubada en ausencia de péptido.* $p=0,01$ vs basal, y § $p=0,001$ vs normal.

2. ACTIVIDAD GLUCÓGENO SINTASA α y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO RESPECTO al SUJETO NORMAL

La **Tabla 2** recoge los valores de actividad glucógeno sintasa α —medida como formación de glucógeno a partir de UDP-¹⁴C-glucosa— en miocitos en cultivo primario de cuatro pacientes afectados de obesidad mórbida, en relación a los obtenidos previamente en sujetos normales [González y col., 2005a], y el efecto a 10^{-10} M de GLP-1, Ex-4, Ex-9 e insulina.

Tabla 2. Actividad glucógeno sintasa α —medida como formación de glucógeno a partir de UDP-¹⁴C glucosa— en miocitos de pacientes obesos mórbidos respecto a células de sujeto normal.

	n	Basal	Ins	GLP-1	Ex-4	Ex-9
Obesos	4	0,53 ± 0,13	1,07 ± 0,15 *	1,02 ± 0,11 * §	0,93 ± 0,12 * §	0,78 ± 0,12
Normales	22	1,30 ± 0,30	1,92 ± 0,21 *	1,98 ± 0,10 *	1,69 ± 0,10 *	2,00 ± 0,25 *

Media ± EEM, n= número de sujetos. * $p < 0,01$ vs basal, § $p < 0,001$ vs normales en la misma condición.

En el miocito del obeso mórbido, el valor de actividad glucógeno sintasa α control, obtenido en ausencia de péptido, fue menor que el observado previamente en células de sujeto normal [Luque y col., 2002], si bien la diferencia no alcanzó significación estadística, quizás debido al número de pacientes incluidos. Sin embargo, la célula del obeso conservó su capacidad de respuesta a todos los péptidos/hormonas estudiados (**Tabla 2** y **Fig. 8**). De hecho, los incrementos inducidos respectivamente por GLP-1, Ex-4 e insulina no sólo fueron estadísticamente significativos respecto a su valor basal, y también similares entre sí (media conjunta: $80 \pm 7\%$ Δ , $n=4$ pacientes, $p < 0,01$), sino que resultaron todos ellos mayores ($p < 0,05$) respecto al estímulo inducido por éstos en células de sujeto normal (media conjunta: $46 \pm 3\%$ Δ , $n=22$ pacientes, $p < 0,001$).

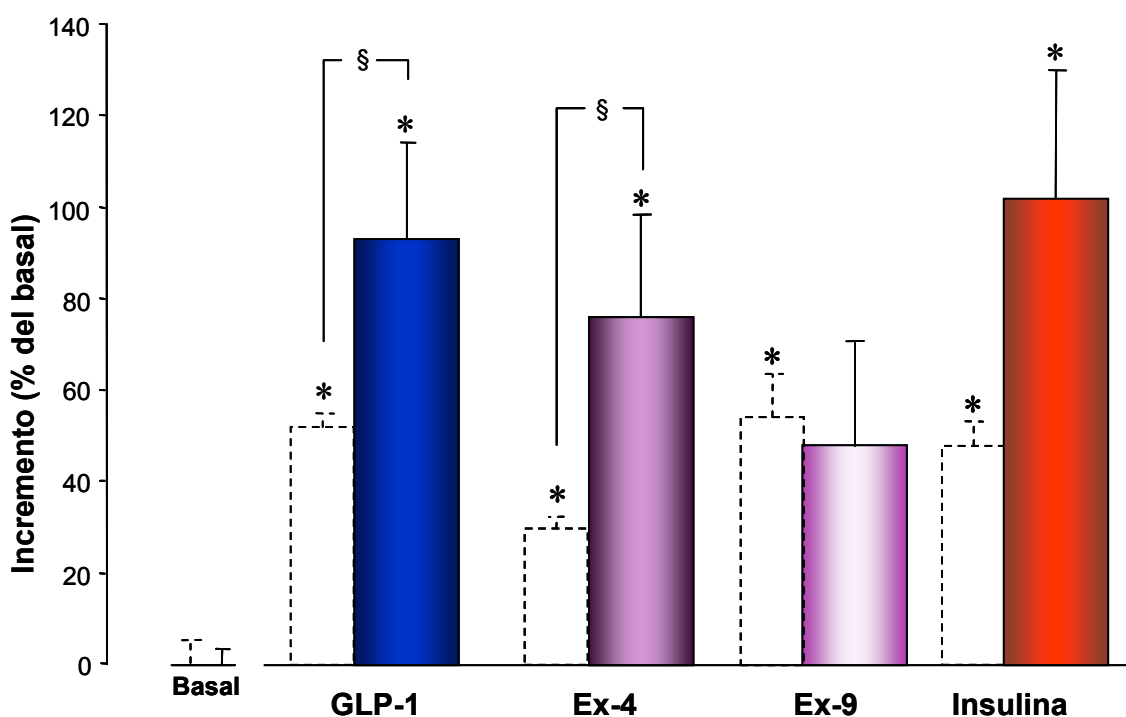


Figura 8. Efecto del GLP-1, Ex-4, Ex-9 e insulina, todos a 10^{-8} M, sobre la actividad glucogeno sintasa *a* en miocitos de obeso mórbido con relación al sujeto normal, (---), durante 10 minutos en presencia de D-glucosa 5,5mM. Los resultados (media±EEM, n=4-22 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. * $p=0,05$ vs basal, y § $p=0,001$ vs normal.

3. ACTIVIDAD BASAL de ENZIMAS de SEÑALIZACIÓN y EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS, en el MIOCITO del OBESO MÓRBIDO respecto al SUJETO NORMAL

Si bien el incremento sobre el transporte de glucosa inducido por GLP-1, Ex-4, Ex-9 fue similar, o mayor, en el miocito del obeso mórbido que en el sujeto normal, el valor neto de glucosa captada resultó, en todos los casos, incluida la insulina, ser menor. Por ello, quisimos examinar la actividad de distintas quinasas de conocida participación en el efecto del GLP-1, exendinas e insulina, sobre el transporte de glucosa al interior de la célula en otros sistemas celulares.

Los resultados (**Fig. 9**) están expresados en porcentaje de incremento del valor control del sujeto normal, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. La actividad de todos los enzimas estudiados —PI3K/PKB, p70s6K y MAPKs— fue menor en el grupo de pacientes obesos que en el de los normales, representando un $-44\pm 7\%$ Δ ($p < 0,05$) del normal en el caso de la PI3K, el $-36\pm 4\%$ Δ ($p < 0,05$) en el de la PKB, un $-43\pm 12\%$ Δ ($p < 0,05$) en el de la p70s6K, y $-33\pm 6\%$ Δ y $-19\pm 5\%$ Δ (ambas $p < 0,05$) en el caso de la p-44 y p-42 MAP quinasas, respectivamente.

Al incubar los miocitos del obeso mórbido en presencia de cada uno de los péptidos/hormonas de estudio, observamos que la célula del obeso mantiene su capacidad de respuesta en relación a todos estos enzimas, como se describe a continuación.

3.1. PI3K/PKB

La **figura 10** muestra, en miocitos obtenidos de siete obesos mórbidos, la acción del GLP-1, Ex-4 y Ex-9, todos a 10^{-9} M, y también la de la insulina, sobre la actividad PI3K (formación de PIP3), y sobre el grado de fosforilación de la PKB. Los resultados están expresados en porcentaje de incremento del valor control, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

Todos los péptidos/hormonas estudiados estimularon la actividad de la PI3K significativamente, excepto el GLP-1 (media conjunta: $100\pm 11\%$ Δ , $n=7$ pacientes, $p < 0,001$), proporcionando un incremento mayor incluso al previamente detectado [Gonzalez y col., 2005a] en miocitos de sujeto normal ($46\pm 3\%$ Δ , $n=4$ individuos, $p < 0,001$).

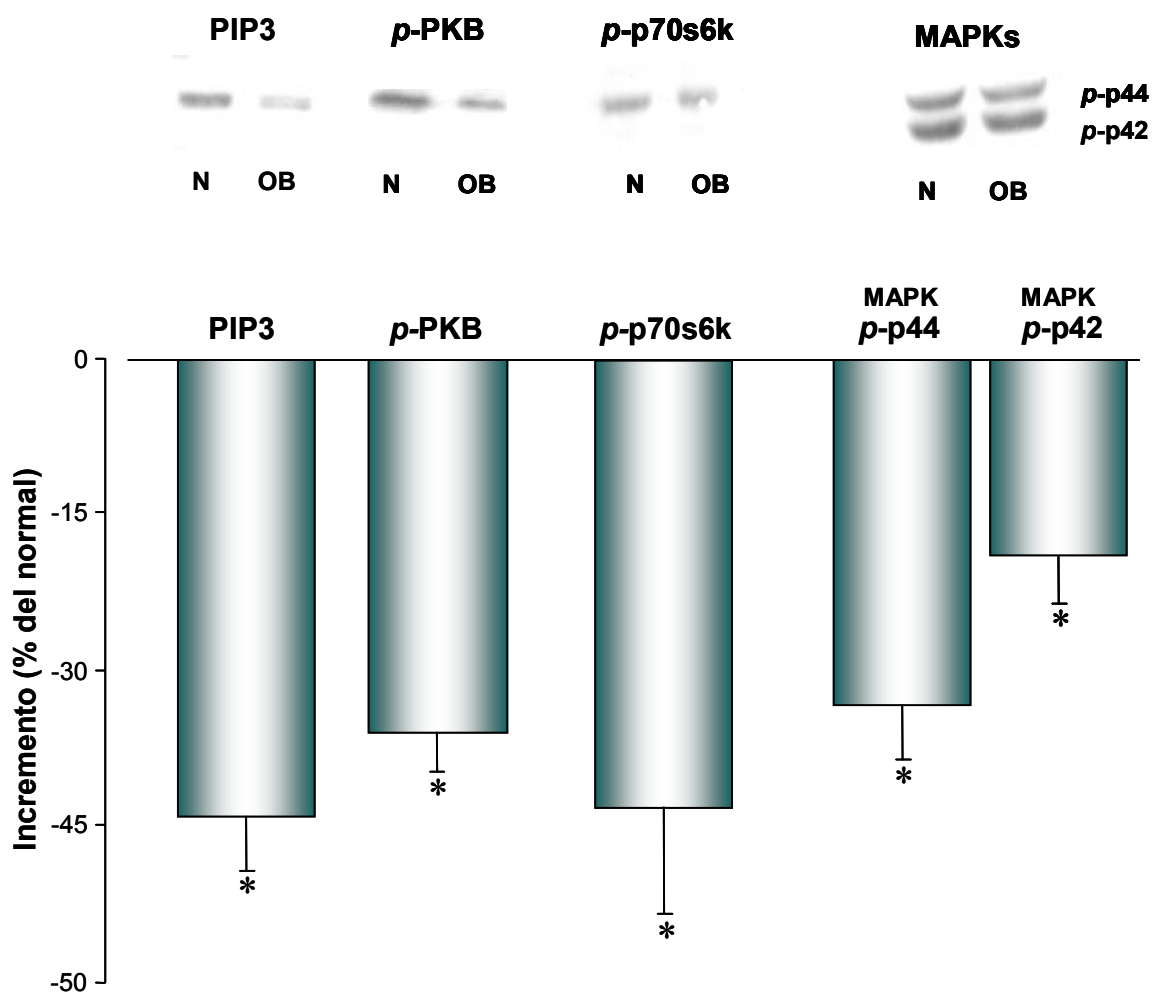


Figura 9 . Actividad PI3K (PIP3), MAPKs, PKB y p70s6K (forma fosforilada: *p*-) en el miocito del paciente obeso mórbido (OB) con relación al sujeto normal (N). Western-Blot representativo de la actividad de los enzimas en el grupo de obesos y normales, y porcentaje de incremento en el grupo obeso respecto al normal (media±EEM, n=4 ambos grupos). * $p=0,05$ vs normal.

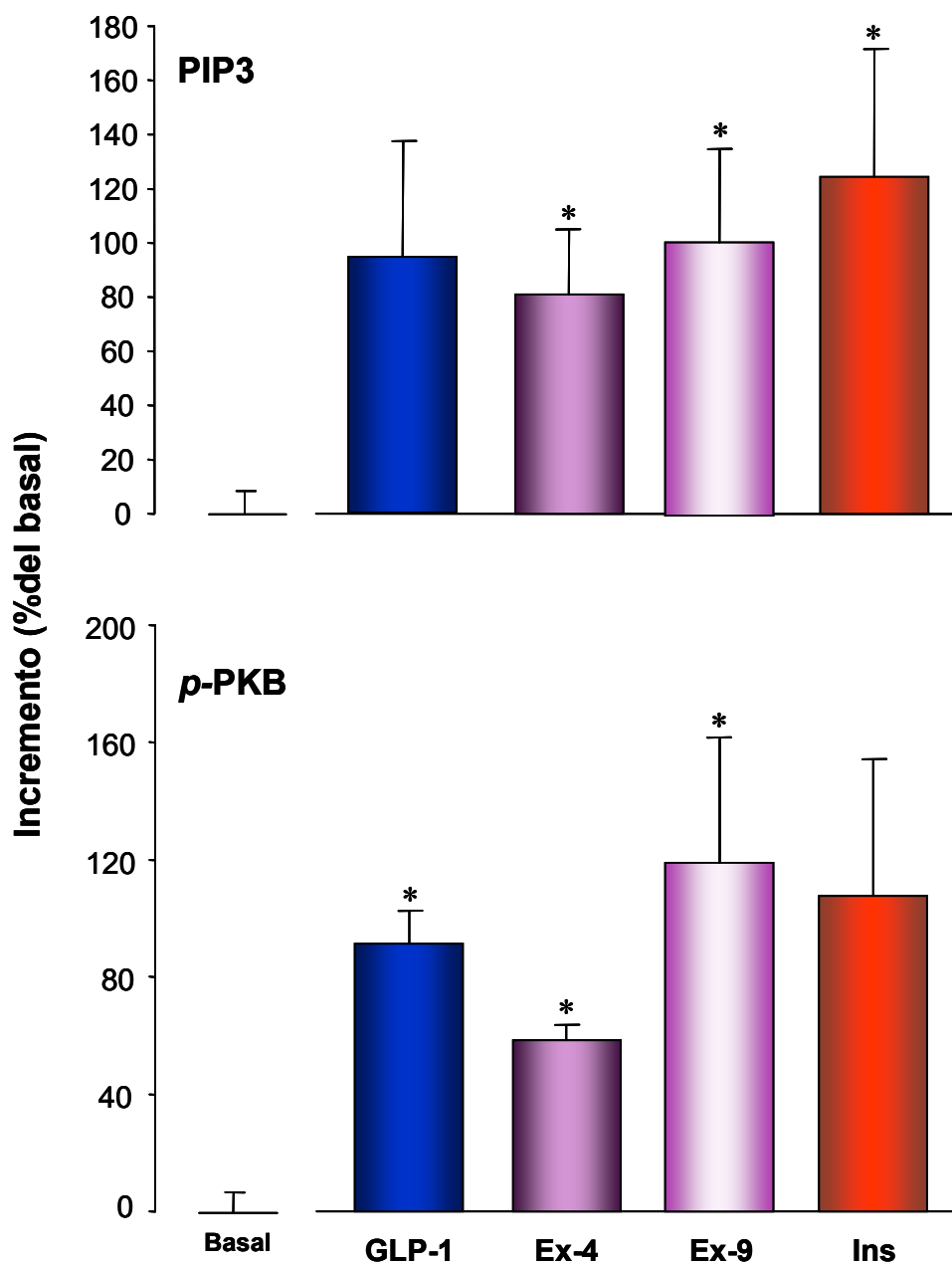


Figura 10. Efecto del GLP-1, exendinas e insulina, todos a 10^{-9} M, sobre la actividad PI3K (formación de PIP3) y PKB (*p*-PKB), en miocitos de obeso mórbido, durante 3 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=7 obesos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. * $p < 0,05$ vs basal.

Además, cualquiera de los péptidos/hormonas estudiados también estimuló, significativamente, la actividad PKB (**Fig. 10**), observándose un efecto conjunto de $94 \pm 11\% \Delta$, $n=4$ pacientes ($p < 0,01$), también mayor al obtenido previamente en células de sujeto normal ($40 \pm 5\% \Delta$, $n=4$ individuos, $p < 0,01$).

3.2. MAPKs

Las **figura 11** muestra, en miocitos obtenidos de seis obesos mórbidos, la acción del GLP-1 e insulina, ambos a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de p44/p42 MAP quininas. Los resultados están expresados en porcentaje de incremento del valor control de la fracción fosforilada respecto a la total, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido.

Los estímulos inducidos, respectivamente, por GLP-1 e insulina, sobre la p44 MAPK, fueron muy similares no sólo entre sí (media conjunta: $59 \pm 8\% \Delta$, $n=6$ pacientes, $p < 0,01$) sino también al efecto de ambos en el miocito del sujeto normal (media conjunta: $50 \pm 10\% \Delta$, $n=8$ individuos, $p < 0,01$); y lo mismo se detectó en relación a la p42-MAPK (media conjunta del obeso: $51 \pm 11\% \Delta$, $n=6$, $p < 0,001$; media conjunta del normal; $52 \pm 7\% \Delta$, $n=8$, $p < 0,001$), si bien el incremento inducido por insulina no alcanzó significación estadística.

La **figura 12** muestra el efecto estimulador de la Ex-4 y Ex-9 sobre las MAPKs en seis sujetos obesos mórbidos. La acción de la Ex-4 sobre la p44 MAPK (media conjunta: $75 \pm 18\% \Delta$ basal, $n=6$ pacientes $p < 0,01$) fue aparentemente mayor que el efecto inducido por Ex-9 (media conjunta: $54 \pm 10\% \Delta$ basal, $n=8$ sujetos, $p < 0,01$). En ambos casos, el efecto no fue distinto al detectado en células de sujeto normal.

El incremento inducido tanto por Ex-4 como por Ex-9, ambas a 10^{-9} M, sobre la p42 MAPK fue similar entre sí (media conjunta: $60 \pm 9\% \Delta$ basal, $n=6$ pacientes, $p < 0,001$), y también a sus respectivos efectos sobre la célula normal: (media conjunta: $44 \pm 7\% \Delta$ basal, $n=8$ sujetos, $p < 0,001$)

3.3. p70s6k

La **figura 13** muestra, en miocitos obtenidos de cuatro obesos mórbidos, que al igual a lo previamente detectado en el miocito del sujeto normal [Gonzalez y col., 2005a], el

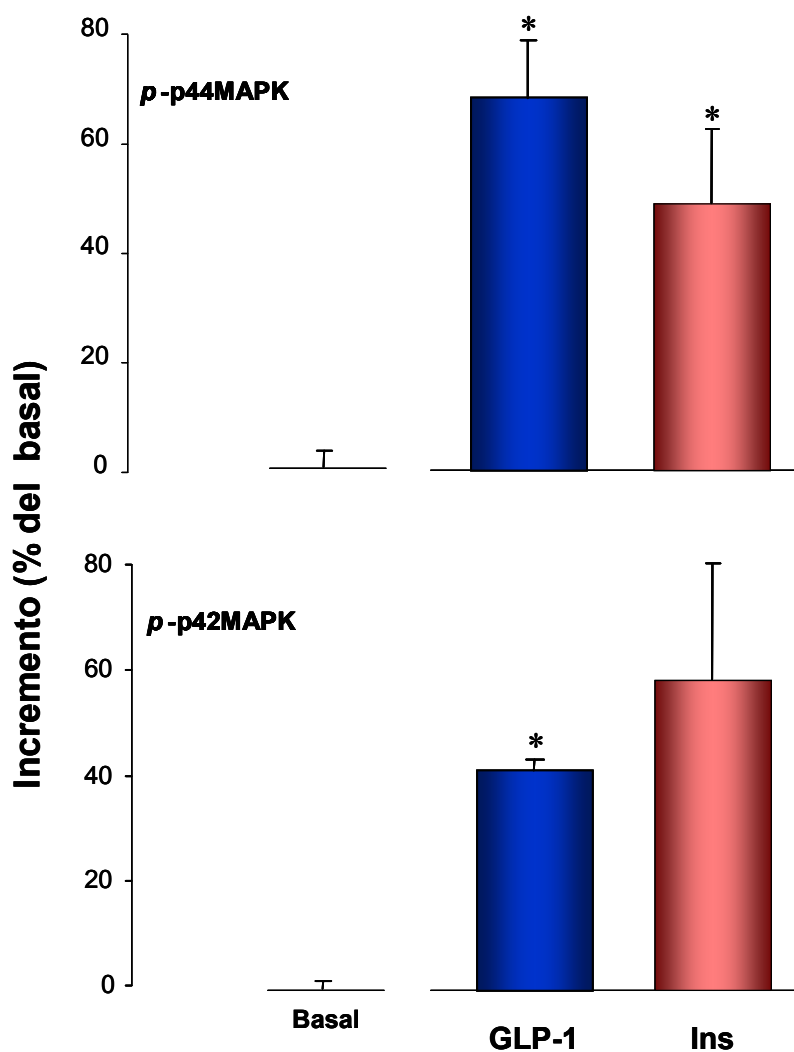


Figura 11. Efecto del GLP-1 e insulina, ambos a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de la p44 y p42 MAP quinasa, en miocitos de obeso mórbido, durante 3 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=6 obesos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. * $p < 0,02$ vs basal

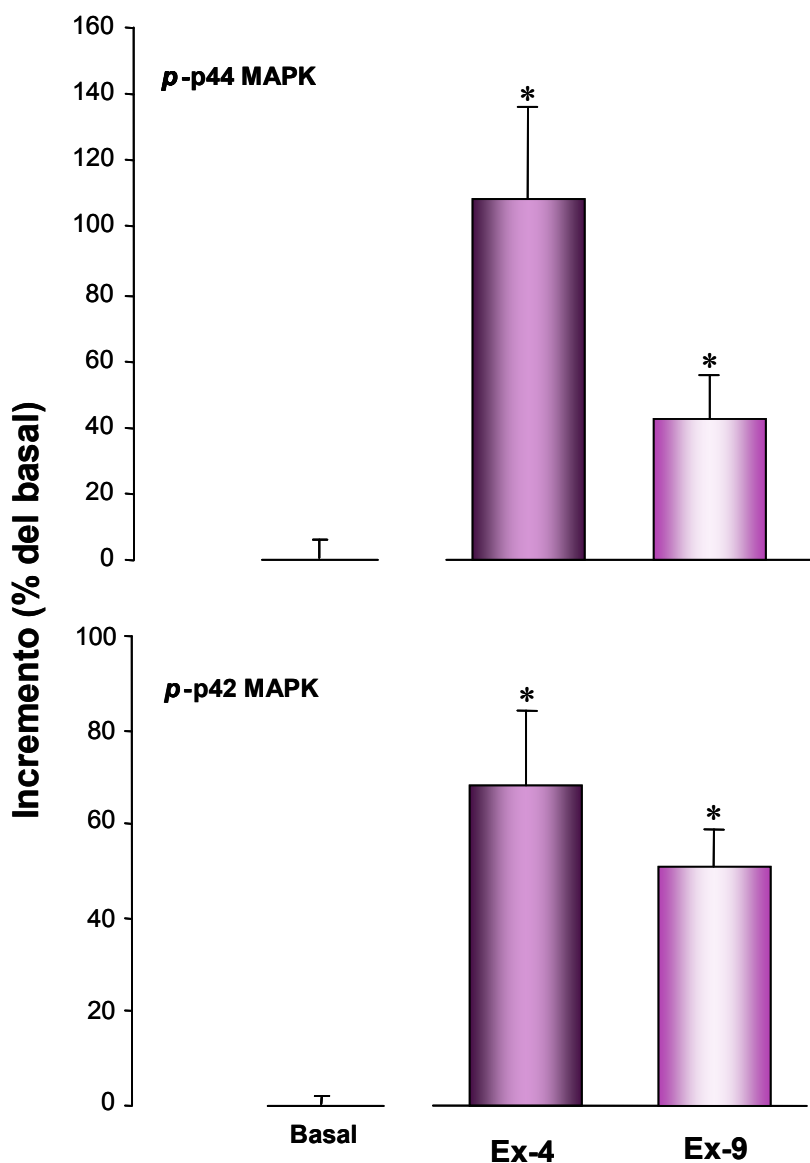


Figura 12. Efecto de la Ex-4 y Ex-9, ambas a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de la p44 y p42 MAPquinasa, en miocitos de obeso mórbido, durante 3 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=6 obesos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio de cada individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. * $p < 0,01$ vs basal.

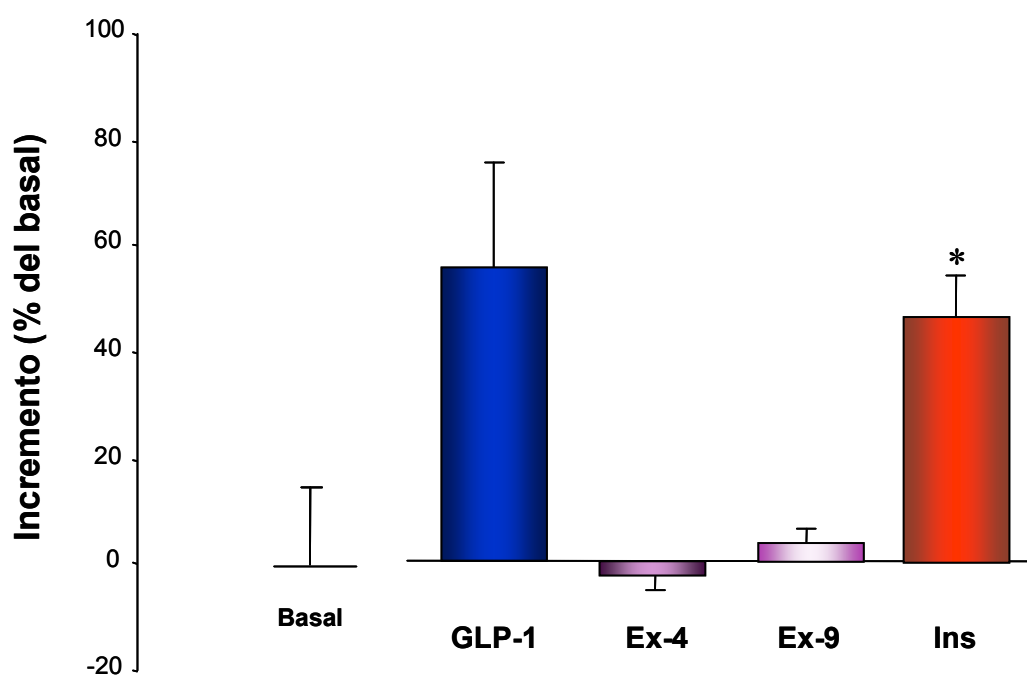


Figura 13. Efecto del GLP-1, exendinas, e insulina todos a 10^{-9} M, sobre el grado de fosforilación de la p70S6k, en miocitos de obeso mórbido, durante 3 minutos. Los resultados (media \pm EEM, n=4 obesos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio basal del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido. *p<0,05 vs basal.

GLP-1, y también la insulina ($p < 0,02$) incrementan, el grado de fosforilación de la p70s6K. Además, el efecto de ambos, GLP-1 e insulina, fue similar al detectado en el sujeto normal. Como en el miocito del sujeto normal, no se observó modificación alguna en la actividad del enzima por Ex-4, ni tampoco por Ex-9.

4. EFECTO del GLP-1 y EXENDINAS sobre la TRANSLOCACIÓN de ISOFORMAS PKC, en el MIOCITO del SUJETO NORMAL

Previamente, habíamos observado que la presencia de dos inhibidores propuestos de la PKC, el H7 y el Ro 31-8220 –un derivado de estaurosporina y potente inhibidor bisindolmaleimida de varias isoformas de PKC–, reducían, significativamente, el transporte de glucosa inducido por GLP-1 y exendinas en células musculares en cultivo primario procedente de sujetos normales [Gonzalez y col., 2005a]; sin embargo, el H7 y el Ro 31-8220 no son específicos para ninguna de las isoformas PKC en concreto [Davies y col., 2000]. En un intento por aproximar más esa posible participación de ciertas isoformas PKC, hemos medido la acción del GLP-1, y también de la Ex-4, Ex-9 e insulina, sobre la translocación de algunas consideradas mayoritarias –PKC- θ , PKC- ϵ , PKC- λ – en el músculo esquelético [Osada y col., 1992].

Los resultados están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante cada periodo de tiempo estudiado.

4.1. PKC- θ

La **figura 14** muestra la acción de GLP-1 e insulina, a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma θ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de cuatro sujetos normales, a 2 y 15 minutos de incubación.

El GLP-1 indujo, a los 2 minutos, una aparente reducción del contenido de la PKC- θ en el citosol ($-28 \pm 10\%$ Δ control), que fue acompañado de un incremento de su presencia en la membrana ($80 \pm 11\%$ Δ , $p < 0,02$). A los 15 minutos de incubación, no se detectó modificación en la cantidad de esta isoforma en el citosol, pero sí una reducción significativa en la membrana plasmática ($-41 \pm 2\%$ Δ , $p < 0,001$).

Con insulina, el patrón de respuesta de la PKC- θ fue similar al detectado con GLP-1. De hecho, a los 2 minutos de incubación, se produjo un descenso en el citosol ($-31 \pm 8\%$ Δ , $p < 0,05$), que coincidió con un incremento de su contenido en la membrana

($66\pm 23\%$ Δ); a los 15 minutos, y como en el caso del GLP-1, no se observó una modificación del contenido de esta isoforma en el citosol, pero sí una reducción importante de su presencia en la membrana ($-32\pm 7\%$ Δ , $p<0,05$).

Con Ex-4 y Ex-9 (**Fig. 15**), no pudimos detectar ningún cambio en la concentración de la PKC- θ en el citosol a los dos minutos de incubación; sin embargo, tanto con Ex-4 como con Ex-9, se detectó un incremento claro de esta isoforma en la membrana plasmática (Ex-4: $183\pm 26\%$ Δ , $p<0,05$; Ex-9: $228\pm 45\%$ Δ , $p<0,02$).

A los 15 minutos de incubación, pudimos observar no sólo un descenso de la concentración de la PKC- θ en el citosol por efecto de la Ex-4 ($-31\pm 2\%$ Δ , $p<0,001$), sino también en la membrana plasmática ($-34\pm 3\%$ Δ , $p<0,001$); en el caso de la Ex-9 no se produjo modificación aparente del contenido de esta isoforma en el citosol pero, al igual que con Ex-4, sí se redujo, aunque en menor grado, su concentración en la membrana ($-12\pm 2\%$ Δ , $p<0,01$).

4.2. PKC- λ

La **figura 16** muestra la acción de GLP-1 e insulina, a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma λ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de cuatro sujetos normales, a 2 y 15 minutos de incubación.

El GLP-1 indujo, a los 2 minutos, una aparente reducción del contenido de la PKC- λ ($-27\pm 16\%$ Δ control), que fue acompañado de un incremento de su concentración en la membrana plasmática ($70\pm 7\%$ Δ , $p<0,01$). A los 15 minutos de incubación, no se detectó modificación en la cantidad de esta isoforma en el citosol, pero sí una reducción significativa de su presencia en la membrana ($-15\pm 1\%$ Δ , $p<0,001$).

Con insulina, el patrón de respuesta de la PKC- λ fue similar al detectado con GLP-1. De hecho, a los 2 minutos de incubación se produjo un descenso en el citosol ($-30\pm 11\%$ Δ), que coincidió con un incremento de su contenido en la membrana ($29\pm 7\%$ Δ , $p<0,05$); a los 15 minutos, y como en el caso del GLP-1, no se detectó modificación alguna del contenido de esta isoforma en el citosol, ni tampoco en la membrana.

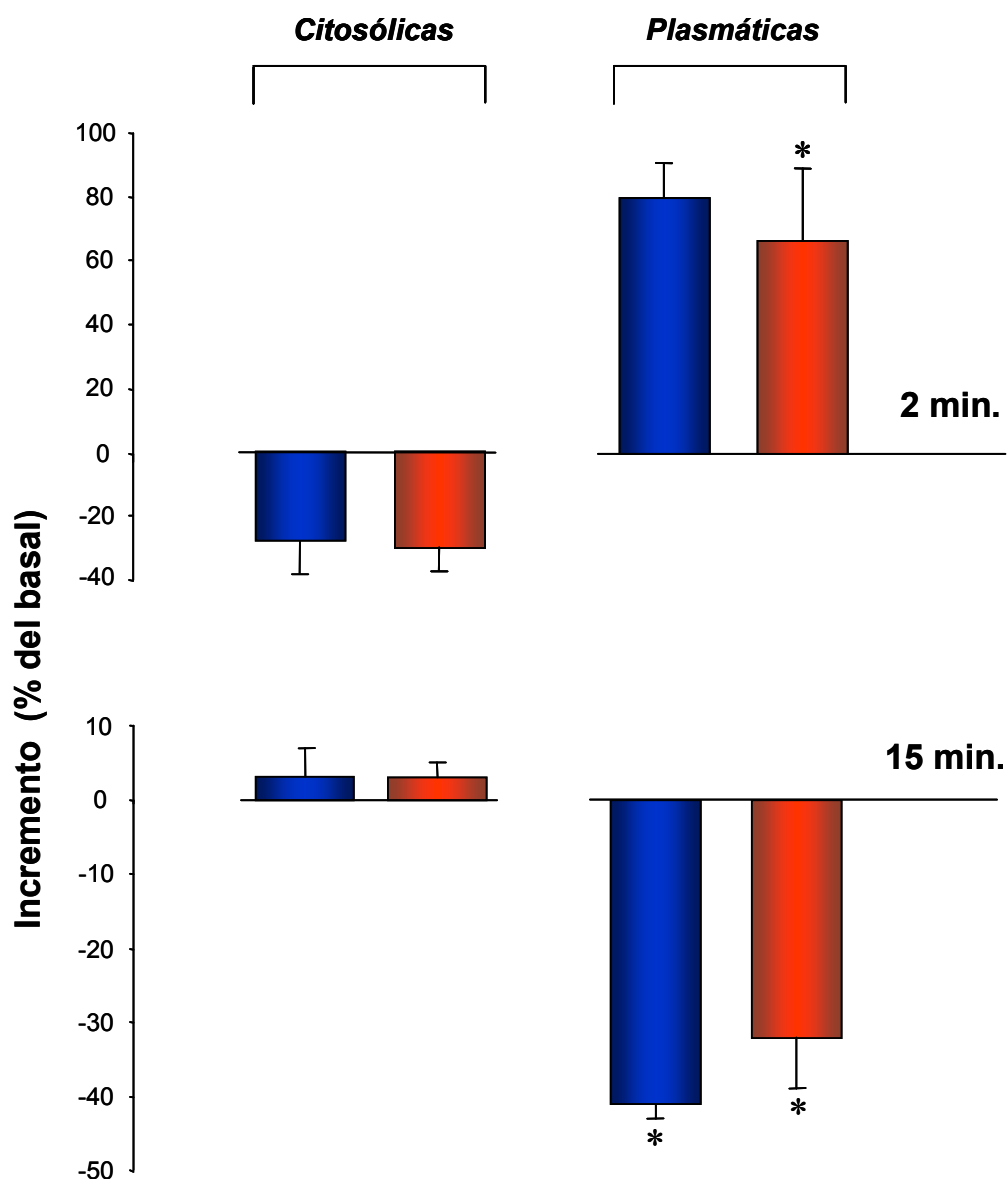


Figura 14. Efecto del GLP-1 (■) e insulina (■), ambos a 10^{-9} M, sobre la traslocación de la isoforma θ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

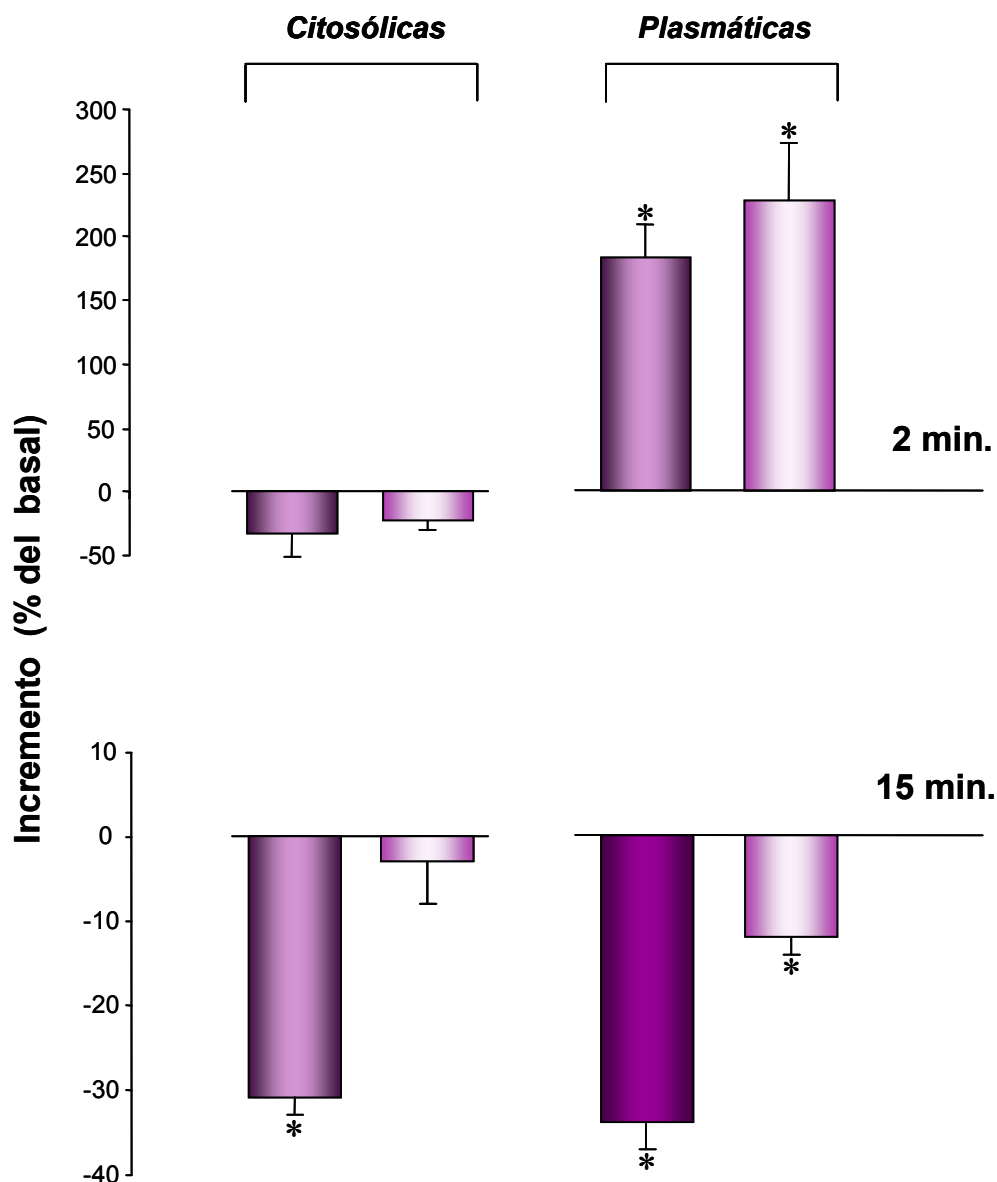


Figura 15. Efecto del Ex-4 (■) y Ex-9 (□), ambas a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma θ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

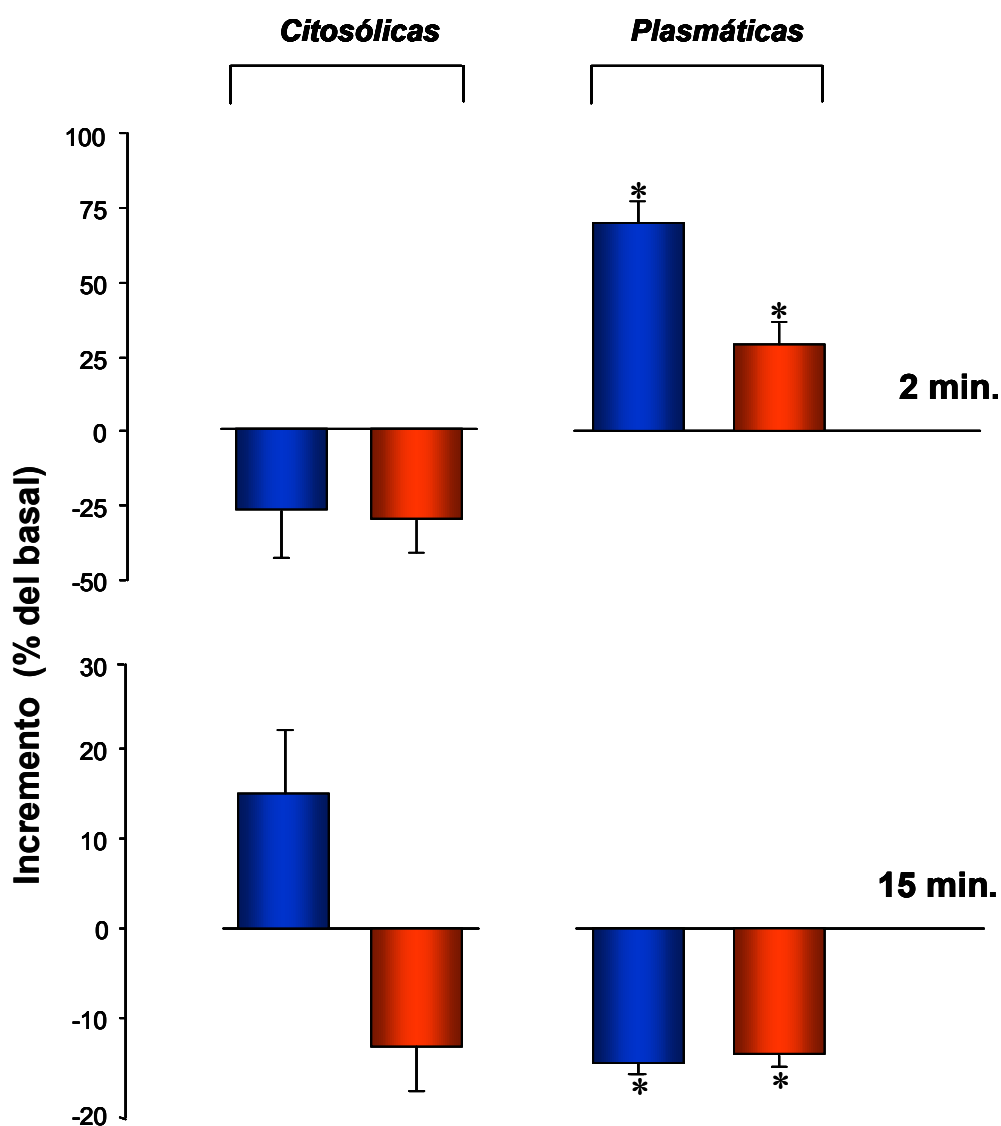


Figura 16. Efecto del GLP-1 (■) e insulina (■), ambos a 10^{-9} M, sobre la traslocación de la isoforma λ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

Con Ex-4 (**Fig. 17**), se produjo un descenso de la PKC- λ en el citosol ($-80\pm 4\%$ Δ , $p<0,05$) a los dos minutos de incubación, que coincidió con un claro aumento de su presencia en la membrana ($94\pm 20\%$ Δ , $p<0,02$); a los 15 minutos, sin embargo, no se pudo detectar modificación alguna del contenido de esta isoforma en ninguna de las dos fracciones.

Con Ex-9, el patrón de respuesta de la PKC- λ fue similar al producido por Ex-4, tanto a los 2 como a los 15 minutos. De hecho, a los 2 minutos de incubación, se observó una reducción del contenido de esta isoforma en el citosol ($-43\pm 12\%$ Δ , $p<0,05$), acompañado por un claro aumento de su presencia en la membrana plasmática ($57\pm 8\%$ Δ , $p<0,05$).

4.3. PKC- ϵ

El GLP-1 y la insulina, y a diferencia de lo observado a los 2 minutos de incubación para las dos isoformas anteriormente mostradas, no modificaron, significativamente, la concentración de la PKC- ϵ (**Fig. 18**) en el citosol ni en la membrana plasmática, si bien en el citosol ambas hormonas parecieron inducir un ligero descenso. Sin embargo, a los 15 minutos, tanto con GLP-1 como con insulina se detectó un descenso de esta isoforma en el citosol, ligero en ambos casos, pero, además, un decremento significativo en la membrana, tanto en el caso del GLP-1 ($-26\pm 6\%$ Δ , $p<0,05$) como en el de la insulina ($-45\pm 6\%$ Δ , $p<0,01$).

Al igual que el GLP-1 y la insulina, la Ex-4 (**Fig. 19**) tampoco modificó, a los 2 minutos de incubación, la expresión de la PKC- ϵ en el citosol ni en la membrana plasmática; pero con Ex-9 sí se detectó una disminución importante en el citosol ($-51\pm 5\%$ Δ , $p<0,01$), que no fue acompañada, en este caso, por una alteración de su concentración en la membrana. A los 15 minutos, sin embargo, sí se observó, con Ex-9, un aumento en el citosol ($43\pm 12\%$ Δ , $p<0,05$) y, curiosamente, también en la membrana plasmática ($42\pm 11\%$ Δ , $p<0,05$), efecto distinto al de la Ex-4, con la cual no se produjo modificación alguna de la concentración de esta isoforma en ninguna de las dos fracciones.

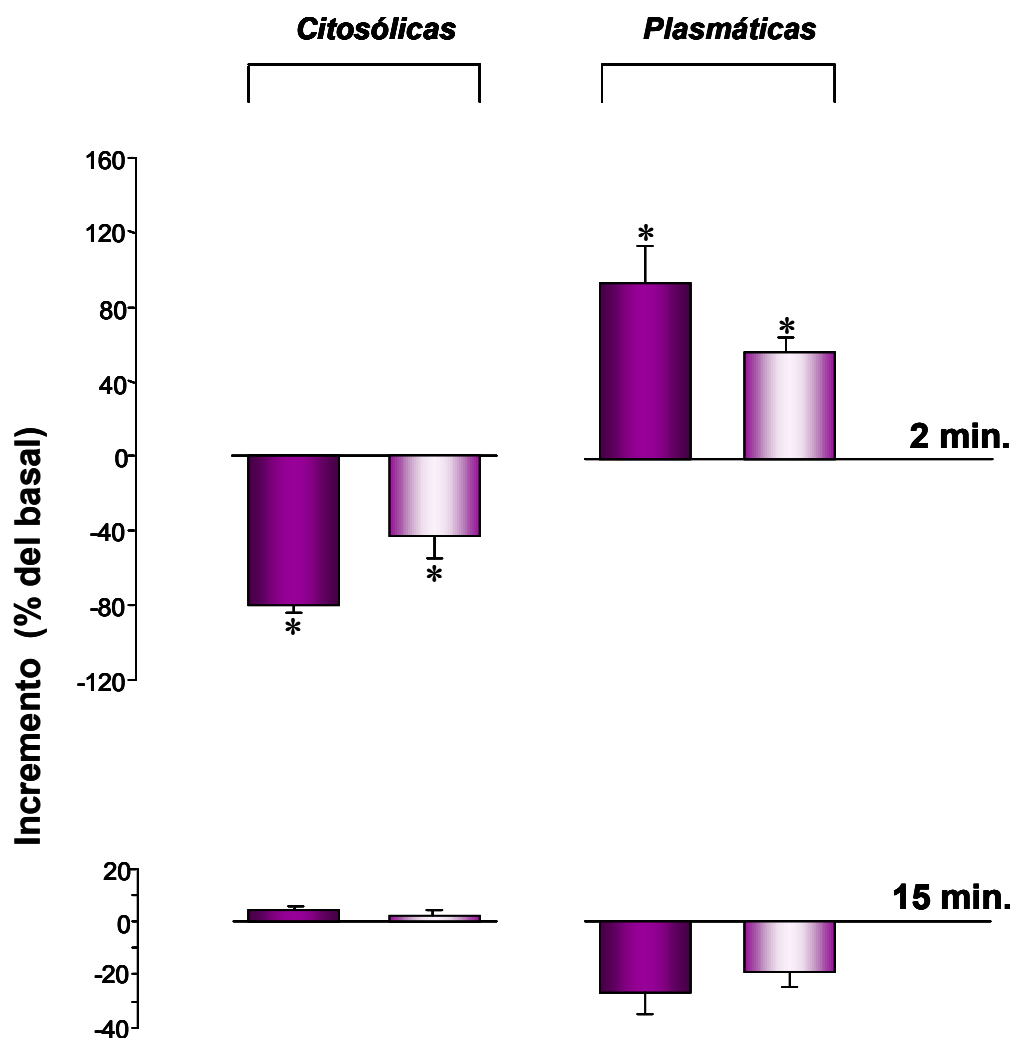


Figura 17. Efecto del Ex-4 (■) y Ex-9 (□), ambas a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma λ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

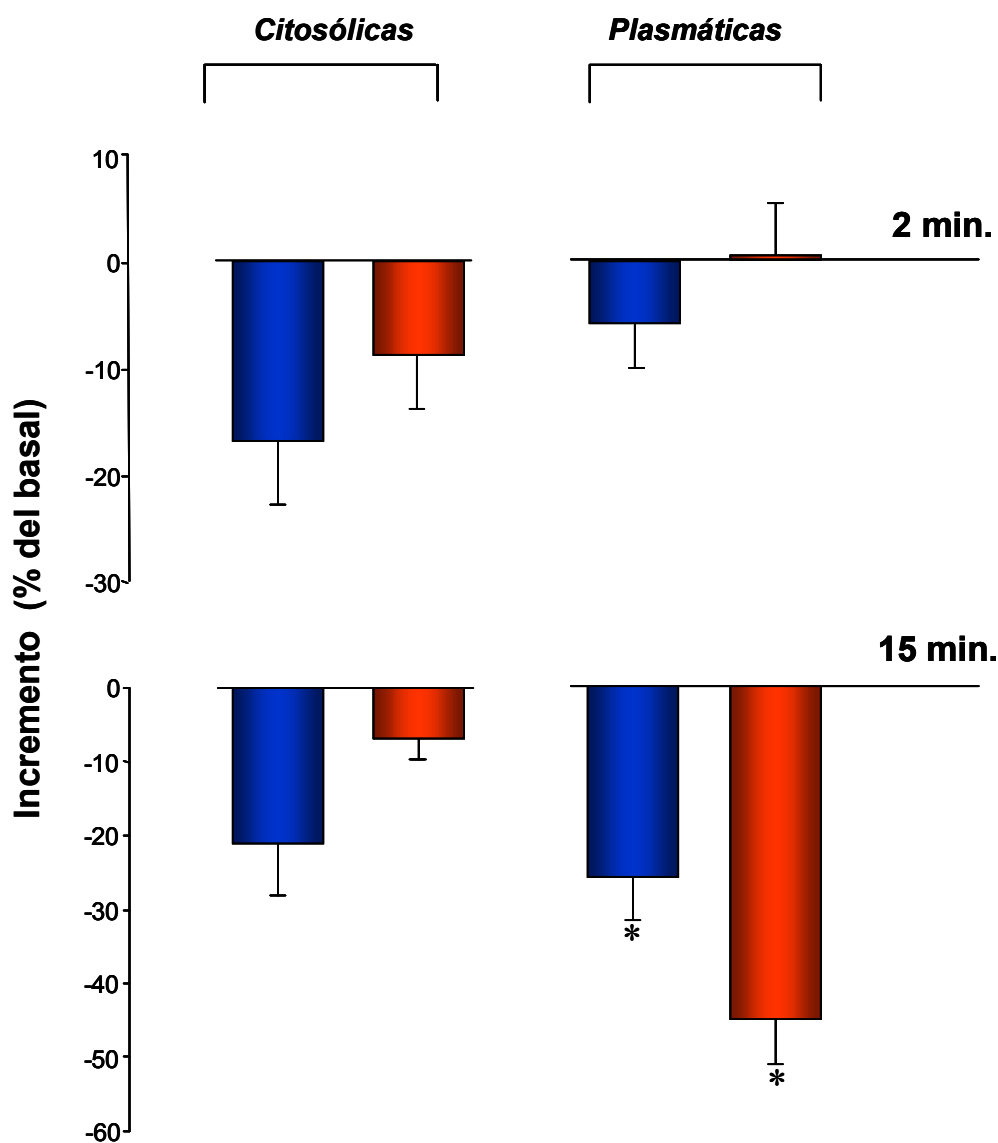


Figura 18. Efecto del GLP-1 (■) e insulina (■), ambos a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma ϵ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

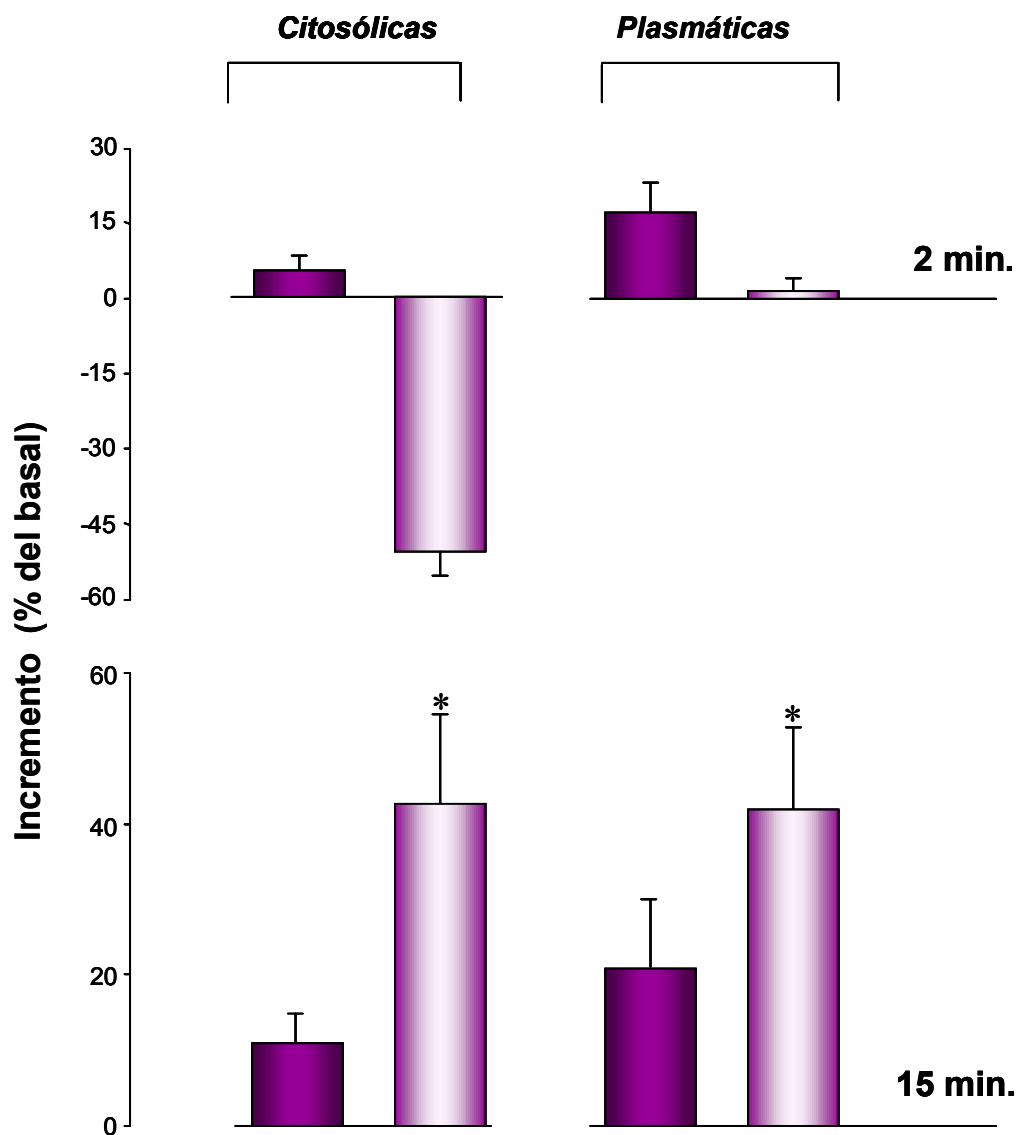


Figura 19. Efecto del Ex-4 (■) y Ex-9 (□), ambas a 10^{-9} M, sobre la translocación de la isoforma ϵ de la PKC, del citosol a la membrana plasmática, en miocitos de sujeto normal. Los resultados (Media \pm EEM, n=4 sujetos) están expresados en porcentaje de incremento del valor medio control del mismo individuo, obtenido en células incubadas en ausencia de péptido durante el periodo señalado. * $p < 0,05$, o menor, vs basal.

5. TRATAMIENTO PROLONGADO con Ex-4 sobre la EXPRESIÓN del GLUT-4, en el TEJIDO ADIPOSO de la RATA NORMAL y DIABÉTICA TIPO 2

Resultados previos de nuestro laboratorio documentaron que el GLP-1, en tratamiento sostenido, modula la expresión de los glucotransportadores mayoritarios en tejidos extrapancreáticos participantes en el metabolismo de la glucosa y/o lípidos, tanto en la rata normal como en dos modelos de diabetes experimental, tipo 1 y tipo 2, inducidos en la rata con estreptozotocina [Villanueva y col., 2001]. Por otro lado, también hemos informado de que el tratamiento sostenido con Ex-4 de la rata modelo experimental de diabetes experimental tipo 2, incrementa el transporte de glucosa en el músculo esquelético, inicialmente disminuido respecto al del usado de la rata normal; sin embargo, no provoca, en apariencia, modificación de los valores de ARNm y proteína Glut-4, en un principio, iguales y menores, respectivamente, a los de la rata normal; además, la Ex-4 induce un incremento en la acumulación de glucógeno hepático, tendente hacia la normalización del valor, inicialmente más bajo que el de la rata normal y ejerce un efecto estimulador sobre la expresión, previamente alterada, del glucotransportador Glut-4 [Arnés y col, 2008b].

Por lo anterior, quisimos conocer el efecto de la administración continua de Ex-4 –tres días– sobre el transporte de glucosa en el adipocito de la diabética tipo 2 respecto a la normal –basal y estimulado por insulina–, y también su acción sobre la expresión del Glut-4 en el tejido adiposo en ambos grupos, diabética tipo 2 (DT2) y normal (N).

5.1. Transporte de glucosa

Sabíamos que la captación basal de glucosa en el adipocito del modelo de diabetes tipo 2 aquí utilizado (DT2) es significativamente más alta que la de células de rata normal [Sancho y col., 2005]. Cuando un grupo de cuatro ratas normales y cuatro diabéticas fueron sometidas en este trabajo a tratamiento de tres días con Ex-4, el transporte basal de glucosa en el adipocito de la diabética ($20,9 \pm 1,7$ fmol/ 10^5 células) –obtenido en células incubadas en ausencia de péptido–, si bien menor ($p < 0,001$) que el previamente detectado de la DT2-control no tratada, de nuevo resultó ser mayor ($p < 0,05$) que el de la normal tras Ex-4 ($16,6 \pm 1,3$ fmol/ 10^5 células), y el de ésta, a su vez, menor ($p < 0,001$) que el de la normal no tratada. No obstante lo anterior, tras tratamiento con Ex-4, la presencia de insulina 10^{-9} M en el medio de incubación indujo un incremento significativo de la captación del azúcar, tanto en la rata normal ($136 \pm 7\%$ basal obtenido en ausencia de insulina, $p < 0,01$) como en la DT2 ($169 \pm 13\%$

basal, $p < 0,02$); además, el incremento inducido por insulina sobre el transporte de glucosa en el adipocito de la rata DT2 tratada con Ex-4, resultó ser incluso mayor ($p < 0,05$) que el obtenido en la normal en la misma condición, con lo que el valor neto de azúcar captada fue, en apariencia, sensiblemente superior.

Tabla 3. Transporte de glucosa en el adipocito de la rata tratada con Ex-4 (fmol/10⁵ células).

	n	Basal		10 ⁻⁹ M Insulina	
		Salino	Ex-4	Salino	Ex-4
DT2	4	45,0 ± 2,7 §	20,9 ± 1,7 * §	68,4 ± 1,7 *	35,3 ± 13 ‡ §
Normal	4	27,2 ± 0,8	16,6 ± 1,3 *	51,9 ± 12 *	22,6 ± 7 ‡

Media ± EEM, n= número de ratas. * $p < 0,05$ vs basal-salino, § $p < 0,05$ vs normal, ‡ $p < 0,05$ vs tratada Ex-4-basal en la misma condición.

5.2. Expresión génica del Glut-4 (Fig. 20)

A pesar de que el adipocito de la rata DT2 tiene un transporte basal de glucosa mayor que el de la rata normal, el ARNm del glucotransportador mayoritario en el tejido adiposo resultó ser significativamente menor ($0,84 \pm 0,09$ veces N, $p < 0,01$), y también lo fue la cantidad de proteína Glut-4 ($-28 \pm 2\%$ Δ , $p < 0,001$), confirmándose con ello observaciones previas de nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo, 2008].

El tratamiento con Ex-4 no modificó el valor inicial de expresión del mRNA del Glut-4 en la rata normal, si bien se detectó un ligero aumento en la diabética. Sin embargo, en la rata DT2, la Ex-4, que no modificó los valores de proteína en la normal, sí produjo una estimulación del proceso de traducción génica del glucotransportador en la DT2, proporcionando un claro incremento, hacia la normalización, en el valor inicialmente reducido de la proteína Glut-4 ($51 \pm 13\%$ Δ de DT2-control no tratada, $p < 0,05$).

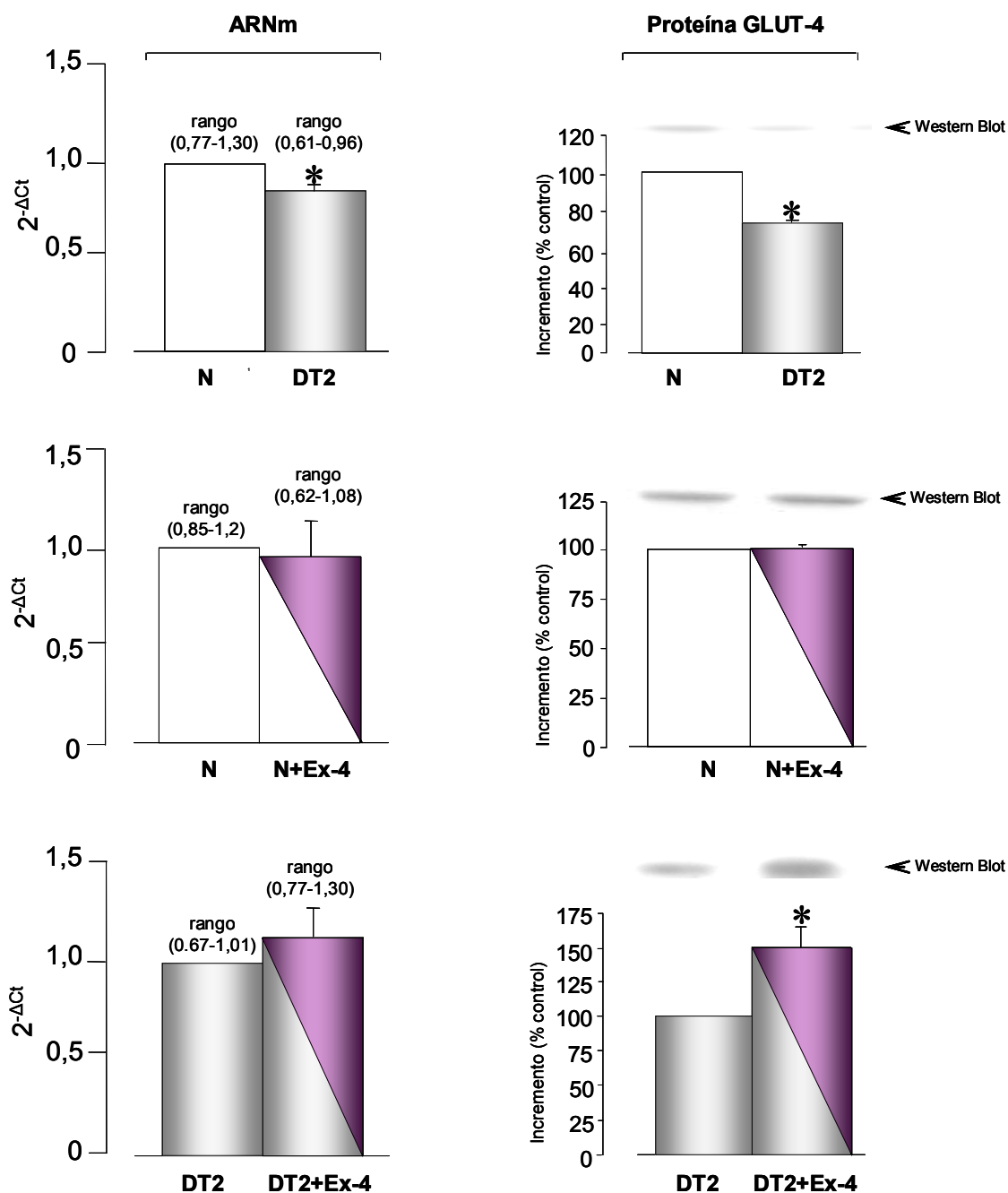


Figura 20. Efecto del tratamiento prolongado con Ex-4 (■) sobre la expresión de Glut-4 —ARNm y proteína—, en el tejido adiposo de la rata normal (N:□) y diabética tipo 2 (DT2:■). Los resultados (media±EEM), correspondientes a 5-8 ratas, están expresados, respectivamente, en cantidad relativa y porcentaje del grupo N o DT2 tratado con salino (control). * $p < 0,05$ vs control.

DISCUSIÓN

La Ex-4, que es estructuralmente homóloga al GLP-1 y, también agonista de su acción en muchos sistemas celulares, tiene sin embargo un efecto antidiabético mucho más prolongado y potente, posiblemente debido a que carece de puntos sensibles a degradación por DPP-IV. Si bien procede de un reptil saurio, se ha buscado sin éxito su homólogo en mamíferos [Pohl y Wank, 1998]; de hecho, tampoco se tiene conocimiento de la existencia de un receptor específico para Ex-4 en tejidos del hombre u otros mamíferos; no obstante, el carácter agonista y antagonista, respectivamente, de la Ex-4 y su forma truncada, Ex-9, sobre el receptor del GLP-1 en distintos sistemas celulares [Doyle y Egan, 2001], y también de su acción insulínica [Cancelas y col., 2001a y 2001b], está bien documentado. En el músculo esquelético de la rata, en concreto, se ha observado que la unión específica máxima del GLP-1 a su receptor de membrana, no sólo es desplazable por el propio GLP-1 [Delgado y col., 1995] sino también por Ex-4, con una afinidad, sin embargo, ligeramente menor. Ello hace pensar que las acciones ya descritas de la Ex-4 sobre el metabolismo de la glucosa en el músculo [Alcántara y col., 1997] ocurren, al menos en parte, a través del propio receptor del GLP-1, tal y como se ha propuesto en otros tejidos [Raufman y col., 1992]

Se ha demostrado que el obeso mórbido cursa con una secreción del GLP-1 deficitaria, y esta incretina podría intervenir en la recuperación de sus condiciones metabólicas del obeso, manifestada tras cirugía bariátrica [Valverde y col., 2005].

Para este estudio, hemos utilizado células musculares aisladas y diferenciadas de músculo esquelético humano, dado que los miotúbulos en cultivo primario mantienen un estrecho paralelismo de características metabólicas con las del propio tejido intacto [Ciaraldi y col., 1995; Henry y col., 1995], erigiéndose así un modelo idóneo para el análisis del metabolismo de la glucosa en el hombre. De hecho, se ha documentado que la exposición de estas células a altas concentraciones de insulina durante el periodo de fusión/diferenciación, produce en ellas una resistencia severa a la hormona, a través de múltiples defectos post-traduccionales, que afectan tanto a la cinética como a la actividad absoluta de la glucógeno sintasa [Henry y col., 1996].

En el miocito en cultivo primario del obeso mórbido, hemos observado, en este trabajo, que la Ex-4 induce *in vitro* una estimulación del transporte de glucosa, inicialmente reducido respecto al de la célula del sujeto normal, y que el

incremento obtenido, si bien es similar en magnitud al observado en el individuo normal, su valor neto de captación del azúcar, es sin embargo, menor.

A diferencia de la Ex-4, el GLP-1 y también la Ex-9, producen en el miocito del obeso un aumento en la captación del azúcar, que aproxima los valores a los iniciales en el sujeto normal; además, mientras que el GLP-1 también estimula la actividad glucógeno sintasa *a* en el miocito del obeso, igualando el valor neto con el producido en la célula del sujeto normal, el estímulo inducido por Ex-4, si bien en incremento fue aparentemente similar al del GLP-1, el valor alcanzado, también en este caso, fue menor. En este grupo de pacientes obesos mórbidos, el efecto de la insulina fue similar en magnitud al del GLP-1, tanto en lo relativo a la captación del azúcar como a su metabolización.

El efecto estimulador sobre ambos parámetros de la Ex-9, péptido agonista de la acción del GLP-1 y Ex-4 en el miocito humano, [Luque y col., 2002] ha sido también detectado en el adipocito de rata [Sancho y col., 2005], en el que la Ex-9 no sólo estimula el transporte de glucosa sino que su efecto es aditivo al de la Ex-4. Hay que tomar en consideración, sin embargo, que en el miocito humano, si bien la Ex-4, como el GLP-1, no modifica el contenido celular de AMPc –indicativo de que el receptor utilizado no está asociado al sistema adenilato ciclasa-AMPc, a diferencia del pancreático [Thorens y col., 1992]–, la Ex-9 lo incrementa significativamente [Luque y col., 2002], lo que sugiere una utilización, por su parte, de un mecanismo/receptor distinto al del GLP-1 o Ex4. Por otro lado, la observada falta de acción de la Ex-9 sobre la captación del azúcar por el músculo esquelético de la rata, podría también ser debida, aunque es poco probable, a que su afinidad por el receptor del GLP-1 sea cien veces inferior [Arnés y col., 2008a]. Esta diversidad en las características de acción de ambas exendinas en relación a la del GLP-1, podrían justificarse en base a especificidades de tejido y/o también de especie.

No obstante lo anterior, la Ex-9 parece ser también un péptido prometedor a considerar en la terapia de ciertas patologías en el hombre, que cursen o puedan cursar con un metabolismo de la glucosa alterado.

El miocito del obeso mórbido incluido en este trabajo presentó una actividad quinasas –PI3K, PKB, p70s6K y MAPKs– sensiblemente menor que la del sujeto normal. Este mismo fenómeno había sido previamente observado en el adipocito de estos

pacientes [Sancho y col., 2007], en los que, sin embargo, la célula adiposa no responde a la Ex-4 y Ex-9 ni tampoco al GLP-1, pero sí lo hace a la insulina en relación al transporte de glucosa [Sancho y col., 2007].

Al margen de que los miocitos de los obesos estudiados tengan una actividad quinasa basal, en general menor que la del sujeto normal, todos los enzimas analizados responden con normalidad a cualquiera de los péptidos/hormonas incluidos en el estudio, excepto la p70s6K, que no sufre modificación frente a ninguna de las dos exendinas. No obstante, si bien la célula del obeso conserva su capacidad de respuesta a ambas exendinas en relación al transporte de glucosa, cabría pensar que este enzima, la p70s6K, no tiene, en realidad, una función esencial en el proceso. De hecho, ello está de acuerdo con observaciones previas en miocitos de sujetos normales, en los cuales, ninguna de las dos exendinas modifica la actividad de este enzima [Gonzalez y col., 2005a] aunque, sin embargo, ambas ejercen un efecto estimulador, como el del GLP-1 e insulina, sobre el metabolismo lipídico del adipocito de estos pacientes [Sancho y col., 2007]. Estas actividades quinasa alteradas en el músculo del grupo de pacientes obesos de este trabajo que, por otro lado, no presentaban aparentemente resistencia a la insulina, podría ser un reflejo de lo ya propuesto sobre que el tejido adiposo sería el lugar donde se inicia la resistencia a insulina, actuando después como señero en el desarrollo del problema en otros tejidos –hígado y músculo– [Smith, 2002].

De hecho, en un estudio previo de nuestro laboratorio, adipocitos de obesos mórbido, que tampoco cursaban con resistencia a insulina o diabetes tipo 2, tenían una actividad reducida de estas quinasa [Sancho y col., 2007]; y además, también observamos una disminución en la actividad de las mismas en miocitos de pacientes diabéticos tipo 2 [Gonzalez y col., 2005b].

Por otro lado, la participación de estas quinasa en la estimulación por GLP-1 y exendinas de parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa en el músculo, ya había sido documentada en células musculares de sujetos sanos [Gonzalez y col., 2005a]. Sin embargo, los inhibidores utilizados, y únicos disponibles [Davies y col., 2000], con el fin de definir la implicación de la PKC, si bien sugerían una función este enzima, no permitían en modo alguno ajustar la información sobre qué isoformas serían las más importantes. Por ello, en un intento por resolver el problema, estudiamos en este trabajo la translocación de isoformas mayoritarias en el músculo

[Osada y col., 1992]. Los resultados del estudio muestran que tanto la PKC- θ como la - λ sufren una translocación rápida del citosol a la membrana, tanto por efecto del GLP-1 e insulina como de ambas exendinas, lo cual no ocurre con la PKC- ϵ . Si bien este hallazgo no permite definir cual de estas isoforma, θ o λ , es la esencial en el efecto de cada uno de estos péptidos sobre el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético —al carecer de inhibidores específicos para cada una de ellas—, sí permiten presuponer que al menos una de las dos tiene una participación esencial. De hecho, hace ya tiempo se propuso la participación de la PKC- θ en el transporte de glucosa inducido por insulina [Farese y col., 1992; Farese y col., 2005].

A la vista de los resultados obtenidos en el músculo esquelético del obeso mórbido quisimos ampliar el conocimiento del efecto de la Ex-4 sobre el transporte de glucosa y expresión del Glut-4 en el tejido adiposo en situación diabética, para lo que hemos utilizado un modelo de diabetes tipo 2 inducido en la rata por tratamiento con estreptozotocina al nacer. En este modelo de rata diabética, sabíamos que la administración continua de Ex-4 incrementa el transporte de glucosa en el músculo esquelético, inicialmente disminuido respecto al de la rata normal; sin embargo, no provoca, en apariencia, modificación de los valores de ARNm y proteína Glut-4, en un principio iguales y menores, respectivamente, que los de la rata normal [Arnés y col., 2008b]. También, la Ex-4, en tratamiento sostenido, induce un incremento en la acumulación de glucógeno hepático, tendente hacia la normalización del valor inicialmente más bajo que el de la rata normal; y además, ejerce un efecto estimulador sobre la expresión del glucotransportador Glut-2, tanto proteína como ARNm, cuyo nivel inicial es, respectivamente, mayor y menor, de lo normal. Por otro lado, este efecto de la Ex-4 en la rata diabética, iguala los niveles de expresión génica del glucotransportador con los de la rata normal tratada con Ex-4 [Arnés y col., 2008b].

En el tejido adiposo del modelo de la rata diabética tipo 2, el transporte de glucosa es mayor que el de la rata normal [Sancho y col., 2005], y permanece alto, aunque en menor medida, tras tratamiento con Ex-4 —presente estudio—. No obstante, la capacidad de la célula diabética para incorporar glucosa en presencia de insulina, no sólo se mantiene tras tratamiento con Ex-4, sino que el incremento es, aparentemente, incluso mayor que el inducido por insulina en el adipocito de la rata normal tratada con Ex-4. La expresión del glucotransportador Glut-4 —tanto proteína como ARNm—, en el tejido adiposo de la rata diabética de este trabajo, es menor que la de la rata normal —de

nuevo igual a resultados previos—, sufre una estimulación del proceso de traducción génica del glucotransportador tras tratamiento sostenido con Ex-4, que da como resultado un incremento en la proteína Glut-4.

Unos valores alterados de expresión de glucotransportadores en este mismo modelo de diabetes experimental, tanto Glut-2 como Glut-4, ya habían sido informados por nuestro laboratorio [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001], que en el caso del Glut-2 podría ser quizás debido a una más alta concentración de glucosa circulante [Burcelin y col., 2000]; además, el GLP-1, en administración exógena sostenida, se vio que ejerce un control sobre la expresión del Glut-2 y Glut-4 tanto en la rata normal como en el mismo modelo de diabetes experimental tipo 2 aquí utilizado [Villanueva-Peñacarrillo y col., 2001].

En concreto, ambas exendinas pueden tener una acción reguladora del transporte y metabolismo de glucosa en el músculo esquelético en el hombre afecto de obesidad mórbida, propiedad que podría ser ejercida, entre otros mecanismos, a través de su acción normalizadora sobre la actividad de quinasas de señalización celular; además, la exendina-4 podría tener un efecto, también tendente hacia la normalidad, sobre la expresión del glucotransportador mayoritario en el tejido adiposo, inicialmente alterada en situación diabética. Lo anterior añade información sobre el modo de acción de estos péptidos, de los cuales, la exendina-4 ya se está utilizando con fines terapéuticos en pacientes afectados de un metabolismo de la glucosa alterado.

CONCLUSIONES

En el músculo esquelético del hombre normal...

El GLP-1, como la insulina, estimula, en el miocito, la actividad de las isoformas θ y λ de la PKC, que se manifiesta en un rápido descenso de su concentración en el citosol, acompañado de un incremento de su presencia en la membrana plasmática.

La Ex-4, y también la Ex-9, inducen un aumento rápido y claro en la concentración de la PKC- θ y PKC- λ en la membrana plasmática, que va acompañado de un ligero descenso de su presencia en el citosol.

En el músculo esquelético del paciente obeso mórbido...

La captación de glucosa es menor que en el sujeto normal, y también lo es la actividad glucógeno sintasa α . Sin embargo, y en relación a ambos parámetros, la célula conserva su capacidad de respuesta al GLP-1, Ex-4 e insulina, y también a la Ex-9, si bien, en este último caso, no se detecta incremento en la actividad de la glucógeno sintasa α .

La actividad de todas las quinasas estudiadas –PI3K, PKB, p70s6k y MAPKs– es sensiblemente menor que la correspondiente en el sujeto normal. Aun así, tanto el GLP-1 como la Ex-4, Ex-9 e insulina, inducen, respectivamente, un incremento en la de PI3K y PKB, que es incluso mayor que el producido en el sujeto normal, mientras que su efecto sobre la p44-MAP quinasa resultó ser similar. Ninguna de las dos exendinas, al igual que lo previamente observado en el sujeto normal, modifica la actividad p70s6k, lo que es indicativo de la falta de participación de este enzima en la acción de ambos péptidos.

En el adipocito del modelo de rata diabética tipo 2...

El transporte de glucosa es mayor que en el de la rata normal; sin embargo, la expresión del glucotransportador Glut-4, mayoritario en el tejido adiposo, es menor –tanto proteína como ARNm–.

El tratamiento prolongado con Ex-4 del modelo de rata diabética tipo 2...

Reduce ligeramente el transporte de glucosa basal, e induce una respuesta a insulina, mayor que la del adipocito no sólo de la rata diabética no tratada, sino también de la normal. No modifica la expresión inicial del ARNm del Glut-4 en el tejido adiposo; sin embargo, la acción sostenida de la Ex-4 ejerce una estimulación del proceso de traducción génica del glucotrasportador, que da como resultado un incremento en la proteína Glut-4.

En concreto, ambas exendinas parecen tener una acción reguladora del transporte y metabolismo de glucosa en el músculo esquelético del hombre afecto de obesidad mórbida, propiedad que puede ser ejercida, entre otros

mecanismos, a través de su efecto normalizador sobre la actividad de quinasas de señalización celular; además, la exendina-4 podría también ser un agente normalizador de la expresión del glucotransportador mayoritario en el tejido adiposo, inicialmente alterada en situación diabética. Lo anterior añade información sobre el modo de acción de estos péptidos, de los cuales, la exendina-4 ya se está utilizando con fines terapéuticos en pacientes con un metabolismo de la glucosa alterado.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF (2002) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143: 3152-3161

Acitores A, González N, Sancho V, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Participation of protein kinases in the stimulant action of GLP-1 upon 2-deoxy-D-glucose uptake by normal rat skeletal muscle. *Horm Metab Res* 37: 275-280

Alcántara AI, Morales M, Delgado E, López-Delgado MI, Clemente F, Luque MA, Malaisse WJ, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1997) Exendin-4 agonist and exendine(9-39)amide antagonist of the GLP-1(7-36)amide effects in liver and muscle. *Arch Biochem Biophys* 341: 1-7

Álvarez E, Roncero I, Chowen JA, Thorens B, Blázquez E (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* 66: 920-927

Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN (1987) Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and type 2 (noninsulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30: 437-440

Arnés L, González N, Tornero-Esteban P, Sancho V, Acitores A, Valverde I, Delgado E, Villanueva-Peñacarrillo M (2008a) Characteristics of GLP-1 and exendins upon glucose transport and metabolism in type 2 diabetic rat skeletal muscle. *Int J Mol Med* 22: 127-132

Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2009) Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parameters in liver and muscle, in normal and type 2 diabetic state. *Regul Pept* 25;153(1-3):88-92.

Arnold TP, Standaert ML, Hernández H, Watson J, Mischak H, Kazanietz MG, Zhao L, Cooper DR, Tarese RV (1993) Effects of insulin and phorbol esters on MARKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) phosphorylation (and other parameters of protein kinase C activation) in rat adipocytes, rat soleus muscle and BC3H-1 myocytes. *Biochem J* 295: 155-164

Beck-Nielsen H (1978) The pathogenetic role of an insulin receptor defect in diabetes mellitus of obese. *Diabetes* 27: 1175-1181

Beck-Nielsen H, Groop LC (1994) Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 94: 1714-1721

Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawat T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi K (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 54: 1640-1648

Bhavsar S, Watkins J, Young A (1998) Synergy between amylin and cholecystokinin for inhibition of food intake in mice. *Physiol Behav* 64: 557-561

Blau HM, Webster C (1981) Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, L5623-L5627

- Bogardus C, Lillioja S, Ravussin E (1986) Familial dependence of the resting metabolic rate. *N Engl J Med* 315: 96-100
- Bouchard C, Perusse L (1993) Genetics of obesity. *Ann Rev Nutr* 13: 337-354
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brown GK (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23: 237-246
- Brubaker PL, Drucker DJ (2004) Minireview: glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 145: 2653-2659
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49:1643-1648
- Calvo JC, Yusta B, Mora F, Blázquez E (1995) Structural characterization by affinity cross-linking of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptor in rat brain. *J Neurochem* 64: 299-306
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549
- Campillo JE (2004) El mono obeso. *Editorial Crítica*. Barcelona
- Campos RV, Lee YC, Drucker DJ (1994) Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-2164
- Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2006) Effects of an olive oil-enriched diet on glucagon-like peptide 1 release and intestinal content, plasma insulin concentration, glucose tolerance and pancreatic insulin content in an animal model of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 38: 98-105.
- Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2001a) Suppression by exendin(9-39)amide of glucagon-like peptide 1 insulinotropic action in rats infused with the dimethyl ester of succinic acid. *Endocrine* 15: 283-285
- Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ (2001b) Synergistic insulinotropic effects of succinic acid dimethyl ester and exendin-4 in anaesthetized rats. *Int J Mol Med* 8: 269-271
- Caro JF, Sinha MK, Raju SM (1987) Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 79: 1330-1337
- Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, Kraemer GR, Gimpel T (1998) Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity and estrogen administration. *Fertil Steril* 70: 472-477
- Chen YE, Drucker DJ (1997) Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem* 272: 4108-4115

- Christel CM, DeNardo DF, Secor SM (2007) Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). *J Exp Biol* 210: 3430-3439
- Ciaraldi TP, Abrams L, Nikoulina S, Mudaliar S, Henry RR (1995) Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells: regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 96, 2820-2827
- Clowes JA, Khosla S, Eastell R (2005) Perspective potential role of pancreatic and enteric hormones in regulating bone turnover. *J Bone Miner Res* 9: 1497-1506
- Coleman DL (1978) Diabetes and obesity: thrifty mutants? *Nutr Rev* 36:129-132
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW (1996) Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295
- Creutzfeldt W (1979) The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85
- Cushman SW, Warzala LJ (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell: aparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255: 4758-4762
- Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD (2004) Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E75-E81
- Davidson MB (1985) Pathogenesis of impaired glucose tolerance and type II diabetes mellitus. *Western J Med* 142: 173-194
- Davidson MB (1995) Clinical implications of insulin resistance syndromes. *Am J Med* 99: 420-426
- Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ (1995) Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 952-957
- De Fronzo RA (1977) Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetic genes. *Diabetes Rev* 5: 177-269
- Delgado E, Luque MA, Alcántara A, Trapote MA, Clemente F, Galera C, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16: 225-229
- Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien PJ (1996) Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 334: 952-957.
- Doyle ME, Egan JM (2001) Glucagon-Like Peptide-1. *Recent Prog Horm Res* 56: 377-399
- Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF (1987) Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3434-3438
- During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173-1179

- Edwards CM, Todd JF, Mahmoudi M, Wang Z, Wang RM, Ghattei MA, Bloom SR (1999) Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* 48: 86-93
- Egan JM, Clacquet AR, Elahi D (2002) The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1282-1290
- Egan JM, Montrose-Rafizadeh CH, Wang Y, Bernier M, Roth J (1994) Glucagon-like peptide-1(7-36)amide (GLP-1) enhances insulin-stimulated glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes: One of several potential extrapancreatic sites of GLP-1 action. *Endocrinology* 135: 2070-2075
- Elahi D, McAlbon-Dike M, Fukagawa NK, Meneilly GS, Sclater AL, Minaker KL, Habener JF, Andersen DK (1994) The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regul Pept* 51: 63-74
- Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267: 7402-7405
- Escobar L, Freire JM, Girón JA, Vázquez, JM, Pajares M, Ortego J, Gavilán I, Chover AJ, Carrasco M, Espinosa R, Marín F, Aguilar M (2000) Plasma levels of insulin and leptin in patients with morbid obesity and anorexia nervosa after weight loss or gain, respectively. *Rev Esp Med Nucl* 19: 199-206
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52:1-8
- Farese RV, Standaert ML, Cooper DR. Protein kinase C downregulation? (1992) *Nature* 360: 305
- Farese RV, Sajan MP, Standaert ML (2005) Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 593-605
- Fehse F, Trautmann M, Holst JJ, Halseth AE, Nanayakkara N, Nielsen LL, Fineman MS, Kim DD, Nauck MA. (2005) Exenatide augments first- and second-phase insulin secretion in response to intravenous glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5991-5997
- Figlewicz DP, Benoit SC (2008) Insulin, leptin, and food reward. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* Oct 22. [Epub ahead of print]
- Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ (1998) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101: 515-520
- Frevert EU, Kahn BB (1997) Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17: 190-198
- Friedman JM, Halaas J (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770

- Fukumoto H, Kayano T, Buse JB, Edwards Y, Pilch PF, Bell GI, Seino S (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transport expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* 264: 7776-7779
- Galera C, Clemente F, Alcántara A, Trapote MA, Perea A, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 myocytes. *Cell Biochem Funct* 14: 43-48
- Gerhardt W (1983) Creatine kinase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer HU (ed.). Academic Press, New York, pág. 508-518
- Göke R, Conlon JM (1988) Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol* 116: 357-362
- Göke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Göke B (1993a) Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268:19650-19655
- Göke R, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Sheikh SP (1995) Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites. *Eur J Neurosci* 7: 2294-300
- Göke R, Wagner B, Fehmann HC, Göke B (1993b) Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on the rat pancreas. *Res Exp Med (Berl)* 193: 97-103
- Goldstein BJ (2003) Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev. Cardiovasc Med* 4: S3-S10
- Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD (1996) Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971-3974
- González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005a) Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept* 126: 203-211
- González N, Sancho V, Martín-Duce A, Tornero-Esteban P, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005b) GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients. *Int J Mol Med* 16: 747-752
- Goodge KA, Hutton JC. (2000) Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11: 235-242
- Goodyear LJ, Chang Py, Sherwood DJ, Dufresne SD, Moller DE (1996) Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signalling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 271: E403-E408
- Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM (1999) Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42: 45-50
- Guma A, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H, Klip A (1991) Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268: E613-E622

- Gutniak M, Larsson H, Sanders SW, Juneskans O, Holst JJ, Ahren B (1997) GLP-1 tablet in type 2 diabetes in fasting and postprandial conditions. *Diabetes Care* 20: 1874-1879
- Gutniak M, Linde B, Holst JJ, Effendic S (1994) Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 abolishes postprandial glycemia in NIDDM. *Diabetes Care* 17: 1039-1044
- Gutniak MK, Holst JJ, arskov C, Ahren B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7–36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 326: 1316-1322
- Gutzwiller JP, Drewe J, Gfke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R1541-R1544
- Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen S, Chait B (1995) Weight-reducing effect of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546
- Halaas, J., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A., Friedman, J.M. (1998): Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 8878-8883
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Dietel M (1995) Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1: 950-953
- Hellman BJ, Sehlin J, Täljedal IB (1971) Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic B-cells. *Biochim Biophys Acta* 241: 147-154
- Henry RR, Abrams L, Nikoulina S Ciaraldi TP (1995) Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures. *Diabetes* 44, 936-946
- Henry RR, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Abrams L, Nikoulina SE (1996) Acquired defects of glycogen synthase activity in cultured skeletal muscle cells: influence of high glucose and insulin levels. *Diabetes* 45, 400-406
- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol* 25: 1375-1384
- Hidaka H, Howard BV, Ishibashi F, Kosmakos FC, Craig JW, Bennett PH, Larner J (1981) Effect of pH and 3-hydroxybutyrate on insulin binding and action in cultured human fibroblast. *Diabetes* 30, 402-406
- Holst JJ, Deacon CF (1998) Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-1670
- Hue L, Bontemps F, Hers HG (1975) The effect of glucose and of potassium ions on the interconversion of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparation. *Biochem J* 152: 105-114
- Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R (2003) Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5V-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-1455
- Hui H, Wright C, Perfetti R (2001) Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50: 785-796

- Iltz JL, Baker DE, Setter SM, Keith Campbell R (2006) Exenatide: an incretin mimetic for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 28: 652-665
- Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM (2003) Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol Cell Biol* 23: 4892-4900
- Inoue S (1990) Metabolic effect of autonomic nervous activity in development of obesity (ventromedial obesity). En: Progress in Obesity Research. Oomura Y (ed.) *John Libbey*, London, pág. 95-101
- Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcosohn J, Klip A, Skolnik EY (1995) The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10247-10251
- James WPT, Thrayhurn P. (1976). An integrated view of the metabolic and genetic basis for obesity. *Lancet* 2: 770-773
- James WPT, Thrayhurn P. (1981) Thermogenesis and obesity. *Br Med Bull* 37:43-48
- Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME (2005) Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens* 23: 463-473
- Janik JE, Curtis ED, Considine RV, Prager HC, Powers GC (1997) Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3084-3086
- Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerstrom C, Andersson A (1995) Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 96: 721-726
- Kahn BB (1996) Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45: 1644-1654
- Kahn CR (1980) Role of insulin receptors in insulin-resistant states. *Metabolism* 29: 455-466
- Kahn SE (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3-19
- Kandror KV, Pilch PF (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am J Physiol* 271: 21703-21708
- Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556
- Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA (1995) Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 136: 3585-3596
- Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S (2003) The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 52: 380-386
- Kolligs F, Fehmman HC, Göke R, Göke B (1995) Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin (9-39)amide. *Diabetes* 44: 16-19

- Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD (2003) Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3082-3089
- Krarup T, Saurbrey N, Moody AJ, Kqhl C (1987) Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on beta-cell function in type 1 and type II diabetes mellitus. *Metabolism* 36: 677-682
- Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR (1987) Glucagon-like peptide-1 (7-36): a physiological incretin in man. *Lancet* 2: 1300-1304
- Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lankat-Buttgereit B, Göke R, Fehmann HC, Richter G, Göke B (1994) Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. *Exp Clin Endocrinol* 4: 341-347
- Larsen PJ, Holst JJ (2005) Glucagon-related peptide 1 (GLP-1): hormone and neurotransmitter. *Regul Pept* 15: 97-107
- Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J (1995) Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 232: 621-628
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 1988-1992
- Lippmann CF (1890) Geschichte des sucres. Abhandlungern und Vortrage (eds.), Leipzig
- Litherland GJ, Hajduch E, Hundal HS (2001) Intracellular signalling mechanism regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues. *Mol Membr Biol* 18: 195-204
- Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Nat Acad Sci USA* 92: 5817-5821
- Luque MA, González N, Márquez L, Acitores A, Redondo A, Morales M, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2002) GLP-1 and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol* 173, 183-189
- Maffei MJ, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GM (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161
- Malaisse WJ, Sener A, Levy J (1976) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Fasting-induced adaptation of key glycolytic enzymes in isolated islets. *J Bio Chem* 251: 1731-1737
- Marger MD, Saier MH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20
- Márquez L, Trapote MA, Luque MA, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (1998) Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochem Funct* 16: 51-56

- Matschisky FM, Elerman JE (1968) Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 234: 2730-2736
- Mayor P, Maianu L, Garvey WT (1992) Glucose and insulin chronically regulate insulin action via different mechanisms in BC3H1 myocytes. Effects on glucose transporter gene expression. *Diabetes* 41, 274-285
- Mérida E, Delgado E, Molina LM, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1993) Presence of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide receptors in solubilized membranes of human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1654-1657
- Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Beck-Nielsen H, Klein HH (2002) Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without Type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia* 45: 813-822
- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF (1986) Preproglucagon gene expression in páncreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261: 11880-11889
- Montrose-Rafizadeh C, Yang H, Wang Y, Roth J, Montrose MH, Adams LG (1997) Novel signal transduction and peptide specificity of glucagon-like peptide receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* 172: 275-283
- Morales M, López-Delgado MI, Alcántara A, Luque MA, Clemente F, Márquez L, Puente J, Viñambres C, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) Preserved GLP-1 effects upon glycogen synthase a activity and glucose metabolism in isolated hepatocytes and skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes* 46: 1264-1269
- Nauck M, Stfckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W (1986) Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46-54
- Nauck MA, Bartels E, arskov C, Ebert R, Creutzfeldt W (1993a) Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7–36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 912-917
- Nauck MA, Heimesaat MM, Arskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W (1993b) Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7–36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91: 301- 307
- Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, arskov C, Ritzel R (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E981-E988
- Navarro M, Rodríguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gómez R, Eng J, Blázquez E (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 67: 1982-1991
- Nuche-Berenguer B, Moreno P, Arnés L, Dapía S, Esbrit P, Villanueva-Peñacarrillo ML (2008) Osteogenic action of Exendin-4 in normal and insulin –resistant state. Abstract Book 30th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Montreal, Quebec, Canada, 12-16 September.

- Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapía S, Caeiro JR, Cancelas J, Haro-Mora JJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2009) Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic and insulin-resistant states. *Calcified Tissue Int.* 2009 Feb 15. [Epub ahead of print]
- Opie LH (2007) Metabolic Syndrome. *Circulation* 15: 32-35
- Orskov C, Holst JJ, Nielsen OV (1988) Effect of truncated glucagon-like peptide-1 (proglucagon-(78–107) amide) on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach. *Endocrinology* 123: 2009-2013
- Osada S, Mizuno K, Saido TC, Suzuki T, Kuroki T, Ohno S (1992) A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 12: 3930-3938
- Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A (2001) Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism* 50: 583-589
- Pedersen O (1984) Studies of insulin receptor binding and insulin action in humans. *Dan Med Bull* 31: 1-31
- Pelleymounter M, Cullen M, Baker M, Hecht R, Winters D (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543
- Perea A, Viñambres C, Clemente F, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1997) GLP-1(7-36)amide effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 29: 417-421
- Perfetti R, Merkel P (2000) Glucagon-like peptide-1: a mayor regulator of pancreatic beta-cell function. *Eur J Endocrinol* 143: 717-725
- Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2002) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 881-888
- Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH (2003) Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res* 72: 603-612
- Pohl M, Wank SA (1998) Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J Biol Chem* 273: 9778-9784
- Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371-377
- Prieto PG, Cancelas J, Moreno P, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I (2007) Effects of diet supplementation with olive oil and guar upon fructose-induced insulin resistance in normal rats. *Endocrine* 31: 294-299
- Pulido N, Romero R, Suárez AI, Rodríguez E, Casanova B, Rovira A (1996) Sulfonylureas stimulate glucose uptake through GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 499-504
- Quian H, Azani MJ, Compton MM, Hartzell D, Hausman GH, Baile CA (1997) Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology* 139: 791-794

- Rau H, Reaves BJ, O'Rahilly S, Whitehead JP (1999) Truncated human leptin associated with extreme obesity undergoes proteosomal degradation after defective intracellular transport. *Endocrinology* 140: 1718-1723.
- Raufman JP, Singh L, Singh G, Eng J (1992) Truncated glucagon-like peptide-1 interacts with exendin receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. Identification of a mammalian analogue of the reptilian peptide exendin-4. *J Biol Chem* 267: 21432-21437
- Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M (2001) Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 24: 371-381
- Reaven GM (1994) Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med* 736: 13-22
- Rodbell M (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239, 375-380
- Rolla A (1994) Resistencia insulínica y desórdenes asociados. *Av Diabetol* 8: 13-36
- Roy D, Johannsson E, Bonen A, Marette A (1997) Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273: E688-E694
- Ruíz-Grande C, Alarcón C, Mérida E, Valverde I (1992) Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13: 13-16
- Saladin R, Devos P, Guerre-Millo M, Leturge A, Girard J (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529
- Sancho V, Nuche B, Arnés L, Cancelas J, González N, Díaz-Miguel M, Martín-Duce A, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML (2007) The action of GLP-1 and exendins upon glucose transport in normal human adipocytes, and on kinase activity as compared to morbidly obese patients. *Int J Mol Med* 19: 961-966
- Sancho V, Trigo ML, Martín-Duce A, González N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2006) Effect of GLP-1 on D-glucose, lipolysis and lipogenesis, in adipocytes of obese subjects. *Int J Mol Med* 17: 1133-1137
- Sancho V, Trigo MV, González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 35: 27-38
- Sanz C, Vázquez P, Navas MA, Alvarez E, Blázquez E (2008) Leptin but not neuropeptide Y up-regulated glucagon-like peptide 1 receptor expression in GT1-7 cells and rat hypothalamic slices. *Metabolism* 57: 40-48
- Sener A, Malaisse-Lagae F, Giroix MH, Malaisse WJ (1986) Hexose metabolism in pancreatic islets: compartmentation of hexokinase in islet cells. *Arch Biochem Biophys* 251: 61-67
- Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Trieu F (1997) Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4637-4641

- Shipp J, Opie LH, Challoner DR (1961) Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. *Nature* 189: 1018-1019
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolacynski JW, Hale L (1996) Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-1282
- Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F (1996) Regulation of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271: 5301-5304
- Smith U (2002) Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue?. *Int. J. Obes Relat Metab Disord* 26, 897-904
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49: 741-748
- Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213-215
- Syvanne M, Taskinen MR (1997) Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 (suppl 1): S120-S123
- Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM (2000) Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141: 1936-1941
- Thorens B (1992) Expression cloning of the pancreatic beta-cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8641-8645
- Thorens B, Sarkar MK, Kaback HR, Lodish HF (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and pancreatic islets. *Cell* 55: 281-290
- Thurlby PL, Trayhurn P (1979) The role of thermoregulatory thermogenesis in the development of obesity in genetically-obese (ob/ob) mice pair-fed with lean siblings. *Br J Nutr* 42: 377-385
- Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK (2001) Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717-3723
- Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero de Tejada A, Campillo JE (2006) White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. *Br J Nutr* 96: 539-544
- Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51: 1443-1452
- Tourrel C, Bailbé D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B (2001) Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 50: 1562-1570

- Trapote MA, Clemente F, Galera C, Morales M, Alcántara AI, López-Delgado MI, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I (1996) Inositol-phosphoglycans are possible mediators of the glucagon-like peptide-1(7-36)amide action in the liver. *J Endocrinol Invest* 19: 114-118
- Trayhurn P, James WP, Gurr MI. (1979) Studies on the body composition, fat distribution and fat cell size and number of 'Ad', a new obese mutant mouse. *Br J Nutr* 41: 211-221
- Turner NC, Clapham JC (1998) Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Prog Drug Res* 51: 33-94
- Uttenthal LO, Blázquez E. (1990) Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett* 262: 139-141
- Uttenthal LO, Toledano A, Blázquez E. (1992) Autoradiographic localization of receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in rat brain. *Neuropeptides* 21: 143-146
- Valverde I, Mérida E, Delgado E, Trapote MA, Villanueva-Peñacarrillo ML (1993) Presence and characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue. *Endocrinology* 132: 75-79
- Valverde I, Morales M, Clemente F, López-Delgado MI, Delgado E, Perea A, Villanueva-Peñacarrillo ML (1994) Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Lett* 349: 313-316
- Valverde I, Puente J, Martín-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML (2005) Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg* 15: 387-397
- Van Epps-Fung M, Gupta K, Hardy RW, Wells A (1997) A role of phospholipase C activity in GLUT4-mediated glucose transport. *Endocrinology* 138: 5170-5177
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Alcántara AI, Clemente F, Delgado E, Valverde I (1994a) Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 37: 1163-1166
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Delgado E, Trapote MA, Alcántara A, Clemente F, Luque MA, Perea A, Valverde I (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat hepatic membranes. *J Endocrinol* 146: 183-189
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Mérida E, Delgado E, Molina LM, Arrieta F, Rovira A, Valverde I (1994b) Increased glucagon-like peptide 1 (7-36) amide binding in adipose tissue from non-insulin dependent and insulin-dependent diabetic patients. *Diab Nutr Metab* 7: 143-148
- Villanueva-Peñacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I (2001) Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine* 15: 241-248
- Viltsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagonlike peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50: 609-613

- Wang Y, Egan JM, Raygada M, Nadiv O, Roth J, Montrose-Rafizadeh C (1995) Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-1038 cells. *Endocrinology* 136: 4910-4917
- Wang Y, Kole HK, Montrose-Rafizadeh C, Perfetti R, Bernier M, Egan JM (1997) Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol* 19: 241-248
- Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, Myhre J, Christiansen J, Holst JJ (1993) Truncated GLP-1 (proglucagon 78–107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci* 38: 665–667
- Wheeler MB, Lu M, Dillon JS, Leng WH, Chen CH, Boyd AE (1993) Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology* 133: 57-62
- Willms B, Werner J, Holst JJ, Arskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA (1996) Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7–36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 327–332
- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-2276
- Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Drucker DJ, Seino Y, Inagaki N (2008) The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology* 149: 574-579
- Yang H, Egan JM, Wang Y, Moyes CD, Roth J, Montrose MH, Montrose-Rafizadeh C (1998) GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Am J Physiol* 275: 675-683
- Young AA (2002) Glucagon-like peptide-1, exendin and insulin sensitivity. En, *Insulin Resistance and Insulin Resistance Syndrome*. Hansen B, Shafirir E (eds.). *Harwood Academic*, New York. pág. 235-262.
- Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M (1999) Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48: 1026-1034
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ (2002) Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359: 824-830
- Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, Pilch PF (1989) Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* 264: 12358-12363
- Zubiri J (1995) *Del sentido a la realidad*. Editorial Trotta y Fundación Zubiri, Madrid

ABREVIATURAS

AGNE	ácido graso no esterificado
Akt	proteína quinasa B
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina de suero bovina
Ci	curio
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPP-IV	dipeptidil peptidasa
DT2	modelo diabetes tipo 2 generado con streptozotocina al nacer
EDTA	ácido etilén-diaminotetraacético
EEM	error estándar de la media
Ex-4	exendina 4
Ex-9	exendina 9
FBS	suero fetal bovino
GIP.....	péptido secretor de insulina dependiente de glucosa
GLP.....	glucagon-like peptide
GLUT	transportador de glucosa
GSa.....	glucógeno sintasa <i>a</i>
HbH.....	hemoglobina glicosilada
HDL	lipoproteína de alta densidad
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico
IMC	índice de masa corporal
Ins	insulina
IPG	inositolfosfoglicano
K.....	coeficiente de utilización de glucosa
kDa	kilodalton
KRB	tampón Krebs Ringer bicarbonato
LDL	lipoproteína de baja densidad
LSD.....	Least Significant Differences
MAPK	proteínas quinasas mitogénicamente activas
MPGF.....	fragmento mayor del proglucagón
N	normal
P.....	probabilidad
p70s6k	proteína quinasa ribosomal de 70 kDa
PI3K.....	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP ₂	fosfatidilinositol 2-fosfato
PIP ₃	fosfatidilinositol 3-fosfato
PKB	proteína quinasa B
PKC	proteína quinasa C
PMSF	fluoruro de fenilsulfonilmetano
Rab4	proteína 4 vinculada con Ras
SDS	dodecil sulfato sódico
SPSS	Statistical Package for the Social Science
STZ	estreptozotocina
TBS.....	tampón tris-salino
TBS-LD	tampón tris-salino con leche desnatada
TBS-T	tampón tris-salino con Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetra metil-etilendiamida
TLC	cromatografía en capa fina
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
Δ	incremento