



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD DE ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Los isómeros del ácido linoleico conjugado inducen resistencia a la
insulina a través de la activación de PKC ϵ en células hepáticas”**

TESIS

que presenta

M. en C. ADRIANA ROURA GUIBERNA

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias

en la Especialidad en Bioquímica

DIRECTOR DE TESIS.

DR. JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES.

Ciudad de México.

Noviembre 2018

La presente tesis experimental se realizó en el laboratorio de transducción de señales del departamento de bioquímica del CINVESTAV IPN Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y el apoyo técnico de la Bióloga Judith Hernández Aranda y la Bióloga Esperanza Jiménez Barrón durante el desarrollo de este, la autora fue autora de CONACYT (No. 245147). Este trabajo fue apoyado parcialmente por el CONACYT (donativo 167673).

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, por su amor, apoyo, comprensión y paciencia en todo momento, por ser mi mayor fuerza y motivación para sobrevivir durante este tiempo y poder realizar este trabajo.

A mi mamá y a mi tío Arturo, por su apoyo incondicional, cariño y paciencia, porque son la luz que me ha guiado a lo largo de todos estos años.

A mi hermana, por acompañarme siempre, brindarme su cariño y apoyo incondicional a lo largo de este proceso.

Al resto de mi familia y amigos, les agradezco infinitamente sean parte de mi vida y me hayan acompañado este tiempo.

Al Dr. Olivares, por contribuir de forma tan importante en mi desarrollo profesional y brindarme los conocimientos necesarios para la realización de mi trabajo, por su paciencia y apoyo siempre.

A la doctora Gloria Queipo, por su contribución y apoyo cercano para la realización de este trabajo.

A los doctores Angélica Rueda, Víctor Calderón y Nayeli Garibay por sus importantes aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Gus, Luz, Huguet, Kari, Pao, Luisita, Liz, Citlaly, Fer, Wendy, Moni Vin y Moni Mon por brindarme su cariño, apoyo y comprensión, por ser mi segunda familia durante este proceso.

A mis amigos de generación Berta, Carmen, Laura, Pedro y Nohemí por su amistad y compañerismo durante todo este tiempo.

A Paty y a Robert por su amistad y ayuda técnica en el desarrollo de mi trabajo.

A Ju y Esperanza, por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

A Angie y a Pris por su amistad y apoyo incondicional en el desarrollo de mi trabajo.

A Rocío, Oscar y Lety por su amabilidad y ayuda durante mi permanencia en el posgrado.

A los profesores del departamento de bioquímica por compartir sus conocimientos en mi desarrollo académico.

Al CONACYT y al CINVESTAV por brindarme la oportunidad de realizar el posgrado y contribuir a mi desarrollo académico de forma tan importante.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
ABSTRACT	8
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
I.I MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA	10
I.I.a Receptor de Insulina.....	11
I.I.b Vía de señalización mediada por la PI3K.....	13
I.I.c Vía de las MAPKs/Ras.....	15
I.II REGULACIÓN DE LA SEÑAL INSULINA.....	17
I.II.a Receptor de Insulina.....	17
I.II.b Regulación de IRS.....	19
I.II.c Regulación por proteínas adaptadoras.....	20
I.II.d Fosfatasa de lípidos como reguladores negativos de las acciones de la insulina.....	21
I.III RESISTENCIA A INSULINA.....	22
I.IV PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA	25
I.V ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA).....	30
I.V.A Fuentes y distribución	31
I.V.B Biosíntesis.....	32
II. ANTECEDENTES	36
II. I ISÓMERO CIS-9, TRANS-11 DE CLA.....	38
II. II ISÓMERO TRANS-10, CIS-12 DE CLA.....	40
II. III EVIDENCIA DE LOS EFECTOS DE CLA EN TEJIDO HEPÁTICO	43
III. JUSTIFICACIÓN	49
IV. HIPÓTESIS	51
V. OBJETIVO GENERAL	51
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
VII. METODOLOGÍA	53
VII. I CULTIVO CELULAR.....	53
VII. II DISEÑO EXPERIMENTAL	53
VII. II.A Cursos temporales cortos	53
VII. II.B Ensayos de concentración-respuesta	54
VII. II.C Cursos temporales largos	54
VII. III ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN	54
VII. IV TINCIÓN DE LÍPIDOS INTRACELULARES CON ROJO OLEOSO	59
VII. V MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	60

VIII. RESULTADOS	62
VIII. I EVALUACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE AKT POR EFECTO DE CLA EN LAS ACCIONES DE LA INSULINA	62
VIII. II EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A INSULINA POR EFECTO DE LOS ISÓMEROS DE CLA A TRAVÉS DE ENSAYOS DE CONCENTRACIÓN- RESPUESTA	67
VIII. III EVALUACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA TYR ¹¹⁵⁸ POR EFECTO DE LOS ISÓMEROS DE CLA	69
VIII. IV PAPEL DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LA FOSFORILACIÓN DEL SUSTRATO DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA TYR ⁶³²	71
VIII. V DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE GSK-3 EN LA SER ^{9/21}	73
VIII. VI EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LA FOSFORILACIÓN DE AKT.....	75
VIII. VII EFECTO DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN SERINAS DE IRS	76
VIII. VIII IMPLICACIÓN DE PKCε EN LOS EFECTOS DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN CÉLULAS C9.....	81
VIII. IX EFECTO DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN DE AKT EN PRESENCIA DE LA SOBREEXPRESIÓN DE PKCε	83
VIII. X EFECTO DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS INTRACELULARES EN LAS CÉLULAS HEPÁTICAS C9	90
VIII. X EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS ISÓMEROS DE CLA EN LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS C9.....	93
VIII. XI PAPEL DE OTROS ÁCIDOS GRASOS EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A INSULINA EN CÉLULAS HEPÁTICAS C9.....	95
IX. DISCUSIÓN	98
X. CONCLUSIONES	109
XI. PERSPECTIVAS	111
XII. BIBLIOGRAFÍA	112

ABREVIATURAS

ACC. Acetyl CoA Carboxilasa.

AGS. Ácidos grasos saturados.

ALA. Ácido linolénico.

CLA. Ácido Linoleico Conjugado.

DAG. Diacilgliacerol.

DM2. Diabates mellitus tipo 2.

DHA ácido docosahexaenoico.

EPA. Ácido Eicosapentaenoico.

FFA. Ácidos grasos libres.

GPCR's. Receptores acoplados a proteínas G.

GS. Glucógeno sintasa.

GSK3. Cinasa de la glucógeno sintasa 3.

HSL. Lipasa sensible a hormona.

HSPs. Proteínas de choque térmico.

IκκB. Cinasa de IκB.

IL-6. Interleucina 6.

JNK. Cinasa del amino terminal de cJun.

IP3. Inositol trisfosfato.

IRS. Sustrato del receptor de insulina.

NFκB. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

PIP2. Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3. Fosfatidil inositol 3,4,5-trisfosfato.

PI3-K. Cinasa de fosfoinositidos 3.

PKB. Proteína cinasa B.

PKC. Proteína cinasa C.

PPAR. Receptor acoplado al proliferador de peroxisomas.

PTEN. Fosfatasa y homólogo de tensina deletado en el cromosoma 10.

PTP. Proteínas fosfatasa de tirosinas.

AGPIs. Ácidos grasos poliinsaturados.

Ser. Serina.

SHIP2. Fosfatasa de fosfotirosinas de homología a Src.

TAG. Triacilglicerol.

Thr. Treonina

TNF- α . Factor de necrosis tumoral α .

TLRs. Toll like receptors

Tyr. Tirosina.

TZD. Tiazolidinedionas.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) constitutes a group of isomers of linoleic acid, a polyunsaturated fatty acid. It has been proposed that anti-inflammatory and anti-diabetic effects of CLA are isomer specific. While the cis-9, trans-11 isomer is responsible for reducing levels of pro-inflammatory cytokines and insulin resistance in adipose tissue cells, the trans-10, cis-12 isomer promotes insulin resistance, reduction of body fat accumulation, hepatic steatosis, and increase in inflammatory interleukins. Hepatic insulin resistance could be attributed to the activation of PKC ϵ ; dietary CLA increases hepatic DAG, membrane-associated PKC ϵ . The molecular mechanisms of PKC ϵ activation in hepatic insulin resistance induced by CLA are still unknown, thus it is relevant to investigate the relationship between the effects of these fatty acids on insulin signaling pathway and the role of PKC ϵ in hepatic cells. Our results clearly show that the two isomers of CLA decrease insulin-stimulated phosphorylation of key proteins involve in insulin signaling such as Akt at Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸, the insulin receptor at Tyr¹¹⁵⁸, IRS-1 at Tyr⁶³² and GSK-3 at Ser^{9/21}. However, the protein expression was not affected. Interestingly, both isomers of CLA promote phosphorylation and activation of PKC ϵ . When a dominant negative of PKC ϵ was transfected in C9 cells, the negative effects of CLA on Akt phosphorylation were improved. Additionally, we also found that both isomers of CLA increase phosphorylation of IRS at Ser⁶¹² and Ser³⁰⁷, mechanism that probably underlies the inhibition of IRS signaling by PKC ϵ , also they induced intracellular lipid accumulation, which was shown by confocal microscopy and TEM. These findings suggest that the two

main isomers of CLA could have a significant role in the development of insulin resistance in hepatic cells through IRS serine phosphorylation and the PKC ϵ activation.

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA por sus siglas en inglés), constituye un grupo de isómeros derivados del ácido linoleico, un ácido graso poliinsaturado. Se ha propuesto que los efectos observados para este ácido graso son isómero-específico, siendo el isómero *cis-9, trans-11-CLA* el responsable de disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias y de reducir la resistencia a la insulina en células de tejido adiposo, mientras que el isómero *trans-10, cis-12-CLA* promueve resistencia a insulina, reduce la acumulación de grasa corporal y aumenta la esteatosis hepática, así como el aumento de interleucinas inflamatorias en tejido adiposo. La activación de PKC ϵ se encuentra asociada a la resistencia a la insulina en el hígado. CLA induce el incremento en la concentración de DAG y la asociación de esta proteína a la membrana plasmática en células hepáticas. Debido a que los mecanismos moleculares de resistencia a la insulina hepática relacionados con la activación de PKC ϵ son aún desconocidos, resulta relevante conocer la asociación entre estos ácidos grasos en la vía de señalización de la insulina y el papel de PKC ϵ en células hepáticas. En nuestros resultados se observó claramente que ambos isómeros de CLA disminuyen la fosforilación de proteínas clave involucradas en la vía de señalización de insulina, tales como Akt en la Ser⁴⁷³ y en la Thr³⁰⁸, el receptor de insulina en la Tyr¹¹⁵⁸, IRS-1 en la Tyr⁶³² y de GSK-3 Ser^{9/21}, sin tener cambios en la expresión de éstas. De forma interesante, ambos isómeros de CLA promueven la activación y fosforilación de PKC ϵ ; al ser transfectada la dominante negativa de esta proteína, los efectos negativos inducidos por los isómeros de CLA en la fosforilación de Akt fueron revertidos. Adicionalmente, encontramos el incremento en la fosforilación de IRS en la Ser⁶¹² y la Ser³⁰⁷ mecanismo que podría conllevar a la inhibición en la señalización de IRS inducida por PKC ϵ , además encontramos que ambos inducen la acumulación intracelular de lípidos, efecto observado a través de microscopía confocal y electrónica de transmisión. Estos hallazgos, sugieren que los dos isómeros principales de CLA podrían tener un papel significativo en el desarrollo de resistencia a la insulina en células hepáticas, a través de la fosforilación en serinas de IRS, la activación de PKC ϵ y la acumulación de lípidos dentro de las células.

I. INTRODUCCIÓN

I.I Mecanismos de Señalización de la Insulina

La insulina es una hormona peptídica de tipo anabólico de 5.8 KDa, secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango entre 80-105 mg/dl, favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en el músculo y el tejido adiposo, en el hígado induce el proceso de glucogénesis e inhibe la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis (Saltiel, et al. 2001).

El almacenamiento y liberación de energía apropiados durante estados de gasto y consumo de glucosa son esenciales para la sobrevivencia, y son generalmente controlados por la insulina; esta hormona controla funciones metabólicas muy importantes, tales como la estimulación del transporte de nutrientes a las células, la regulación de la expresión génica, la modificación de la actividad enzimática y la regulación de la homeostasis energética. Estas funciones son llevadas a cabo en distintos tejidos blanco a través de diferentes cascadas de señalización.

Los principales tejidos en los que la insulina actúa regulando actividades metabólicas son los tejidos hepático, adiposo y muscular. De forma general, en el tejido muscular actúa estimulando la translocación de transportadores GLUT-4 a la membrana celular, en el tejido hepático favorece la síntesis de glucógeno e inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas clave, mientras que en el tejido adiposo su función radica principalmente en disminuir la actividad de la lipasa sensible a

hormona. Este efecto anti-lipolítico resulta en la inhibición del flujo de ácidos grasos libres (FFA) hacia el exterior de los adipocitos. Toda esta serie de actividades pertenecientes a la insulina, se efectúan debido a una combinación de efectos rápidos, como la estimulación del transporte de glucosa en las células adiposas y musculares y la regulación de la actividad de enzimas clave en el metabolismo, y de mecanismos a largo plazo que implican cambios en la expresión génica (Gribble, 2005).

I.1.a Receptor de Insulina

Las acciones de la insulina son mediadas por la unión a su receptor presente en la membrana plasmática de sus células blanco. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (Tyr) (RTK's), que al ser estimulados se autofosforilan en residuos de tirosina. La expresión celular de este tipo de receptores es variable, con el mayor nivel de expresión en tejidos que responden a las principales acciones de la insulina en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, tales como el tejido adiposo, muscular y hepático. Se ha encontrado también, que el IR puede ser expresado en otros órganos tales como el riñón, los alvéolos pulmonares, acinos pancreáticos, placenta, fibroblastos, granulocitos, eritrocitos, piel, entre otros (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3643) .

El IR es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades- α y dos subunidades- β . Las subunidades- α se encuentran localizadas en el dominio extracelular de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a insulina, mientras que las subunidades- β tienen una porción extracelular, una

transmembranal y una intracelular, en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de tirosina. En la región intracelular se han identificado tres regiones estructurales que incluyen: a) región yuxtamembranal, en donde se localizan las tirosinas Tyr⁹⁶⁵ y Tyr⁹⁷²; b) el dominio de cinasa de tirosina, en donde se encuentran las tirosinas Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³; la autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad de cinasa del receptor, y c) el extremo carboxilo-terminal en donde se localizan las Tyr¹³²⁸ y Tyr¹³³⁴ que al parecer pueden tener un papel importante de regulación sin formar parte de la señalización del receptor **(Figura 1)**.

En condiciones de no estímulo, las subunidades- α ejercen un papel regulador sobre las subunidades- β , inhibiendo la capacidad del IR para autofosforilarse. Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades- α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades- β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de tirosina³. Los residuos autofosforilados son entonces reconocidos por diferentes proteínas adaptadoras, entre las que se incluyen miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS), de los cuales IRS-1 e IRS-2 constituyen los dos principales sustratos e intermediarios más comunes en la etapa inicial de propagación de la señal de insulina. IRS actúa como una molécula adaptadora que organiza la formación de complejos moleculares y desencadena cascadas de señalización intracelular (Youngren, 2007).

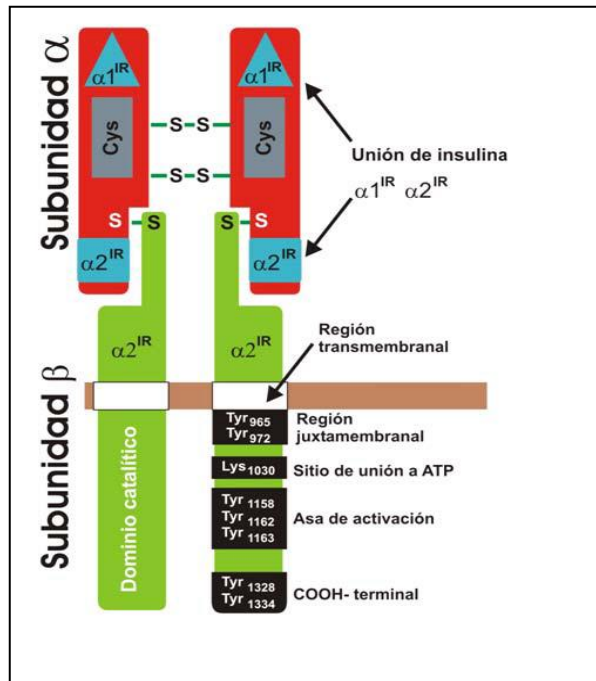


Figura 1. Estructura del receptor de insulina. El receptor de insulina es un heterotetrámero que consiste de dos subunidades- α extracelulares unidas a dos subunidades- β por puentes disulfuro (Olivares Reyes, et al. 2009).

La mayoría de las acciones de la insulina se llevan a cabo por la activación de dos principales vías de señalización: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt, la cual es responsable de la mayoría de sus acciones metabólicas, y la vía de las cinasas activadas por mitógeno/Ras (MAPKs/Ras), que regula la expresión genética y los efectos mitogénicos asociados a la insulina (Olivares Reyes, et al. 2009).

I.I.b Vía de señalización mediada por la PI3K

Esta vía se encuentra mayormente vinculada con los efectos de la insulina en el metabolismo de glucosa y lípidos. La vía inicia cuando el receptor activo y autofosforilado, interacciona con el sustrato del receptor de insulina (IRS) y lo

fosforila. Las proteínas IRS contienen un dominio amino-terminal de homología a pleckstrina (dominio PH) altamente conservado, seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB), que en conjunto permiten el acoplamiento de IRS al IR activo. IRS contiene entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación, en función del tipo de IRS, de los cuales se conocen 4 isoformas, IRS-1 a IRS-4, que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 (de homología al dominio 2 de la proteína Src), muchas de las cuales funcionan como proteínas adaptadoras (Olivares Reyes J A, Arellano Plancarte A, 2008).

De las 4 isoformas de IRS, la que parece estar involucrada en el transporte de glucosa a las células es la isoforma 1 (IRS-1), la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de tirosina que al ser fosforilados por el IR, se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como la cinasa del fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3K). La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 da por resultado la activación de p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato, fosfatidil inositol 4,5-bis-fosfato (PI(4,5)P₂), el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando fosfatidil inositol tris-fosfato (PI(3,4,5)P₃), que sirve como sitio de unión para cinasas de Ser como PDK1 y Akt⁷. El complejo proteico mTor/Rictor, también conocido como PDK2, activa a Akt, induciendo una primera fosforilación en la Ser⁴⁷³ que es seguida por la fosforilación de la Thr³⁰⁸, esta última inducida por PDK1. Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales, la isoforma 2 juega un papel importante en la incorporación de glucosa inducida por la insulina, incluyendo la incorporación de

glucosa en músculo y tejido adiposo a través de la translocación de GLUT-4 de compartimentos intracelulares a la membrana celular. La cinasa Akt desempeña un papel central en la señalización de la insulina, ya que su activación lleva a la fosforilación de un importante número de sustratos, entre los que se incluyen enzimas, factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo celular y proteínas de apoptosis y supervivencia, con funciones clave en una amplia variedad de procesos biológicos. Además, Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una lista creciente de sustratos que propagan la respuesta de la insulina, incluyendo a la enzima glucógeno sintasa (GS), a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), a la fosfofructocinasa 2 (PFK2), a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), a la molécula blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), a la caspasa 9 y a la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD). Entre sus principales acciones metabólicas, destaca la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, una cinasa que en condiciones de no estímulo inhibe a la glucógeno sintasa; la inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno tal y como se muestra en la **figura 2** (Myers MG Jr, White MF. 2002, Jensen M, De Meyts P. 2009, Gual, et al. 2005).

I.I.c Vía de las MAPKs/Ras

La vía de las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPKs/Ras), es aquella en la cual, la insulina ejerce efectos que participan en la síntesis proteica y expresión génica. La activación de esta vía involucra la fosforilación en Tyr de las proteínas IRS

y/o Shc, las cuales, a su vez, interactúan con la proteína adaptadora Grb2, que recluta a SOS (un factor recambiador de nucleótidos de guanina) a la membrana plasmática para la activación de la proteína G pequeña Ras, catalizando el intercambio de GDP por GTP en Ras, lo que permite su activación. Ras-GTP opera como un switch molecular, estimulando la activación de la cascada de MAPKs, a través de la activación secuencial de Raf, MEK y ERK1/2 (Engelman et al, 2006).

Una vez activas, ERK1/2 se translocan al núcleo y catalizan la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica y promueven el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (**Figura 2**) (Taniguchi et al, 2006, Boulton et al, 1991).

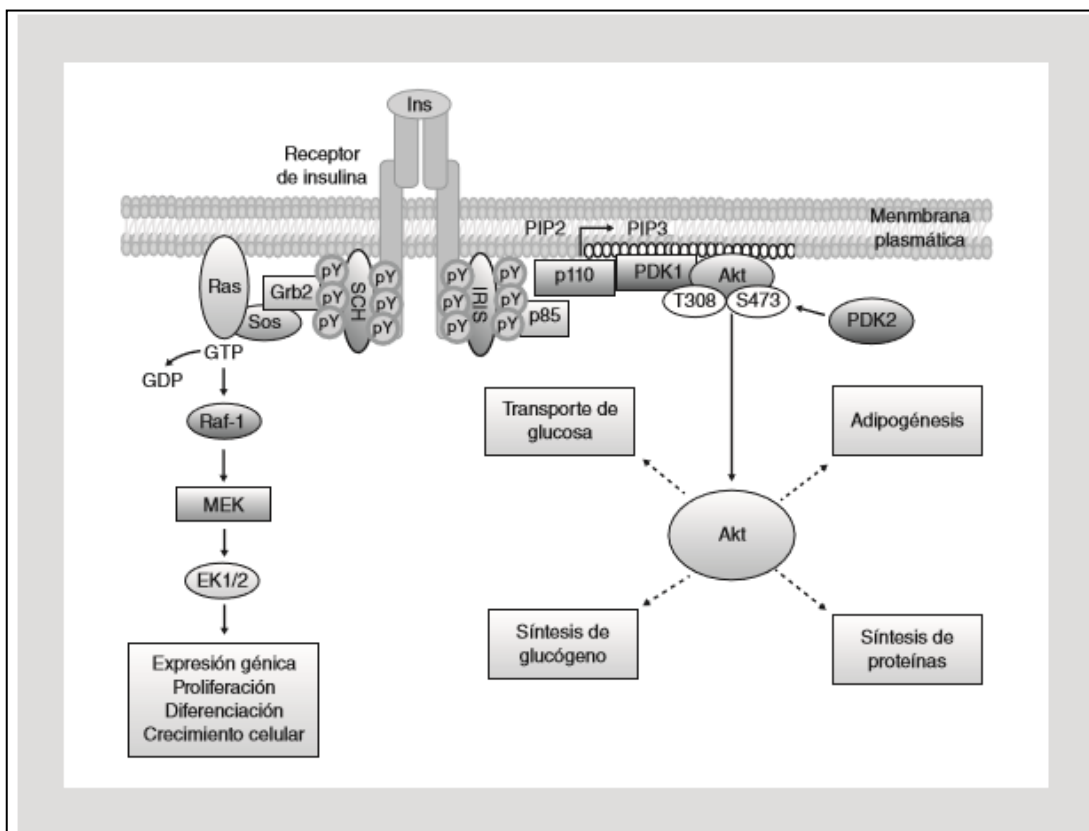


Figura 2. Vías de PI3K/Akt y MAPKs mediadas por insulina. Estas vías representan los principales mecanismos por los que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo, diferenciación, crecimiento y proliferación celular (Gutiérrez Rodelo et al; 2016).

I.II REGULACIÓN DE LA SEÑAL INSULINA

La insulina ejerce acciones metabólicas, de promoción del crecimiento y proliferación celular a través de mecanismos de autorregulación (regulación homóloga), por medio de la participación de diversas enzimas activadas por la misma vía, las cuáles poseen la capacidad de inhibir a proteínas clave que forman parte de la señalización de la insulina. También, existen mecanismos moleculares homeostáticos, independientes a los activados por la insulina, que pueden inhibir también la señalización de esta hormona, lo cual es denominado mecanismo de regulación heteróloga (Youngren J. F. 2007, Gutiérrez Rodelo et al; 2016). Ambos, mantienen la homeostasis celular, definiendo la duración, la señalización y las acciones de la insulina (Saltiel AR, Kahn CR, 2001).

Se han identificado diferentes mecanismos de regulación homeostática a nivel del IR, de IRS y de proteínas localizadas río abajo de ambas, entre las que se encuentran PI3K, Akt o GLUT4 (Boulton TG, 1991, Olivares-Reyes JA. 2012) **(Figura 3).**

I.II.a Receptor de Insulina.

Múltiples estudios han demostrado que la actividad del IR es regulada por la acción de fosfatasas de fosfotirosinas que desfosforilan residuos específicos de Tyr en el receptor activo, reduciendo de este modo su actividad. Existe evidencia con respecto a que la fosfatasa de fosfotirosinas-1B (PTP1B), es un componente esencial de los mecanismos reguladores de las acciones de la insulina (Boura Halfon S, Zick Y, 2009, Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR, 2014). Estudios realizados con el ratón knock-out de PTP1B muestran un aumento en la

sensibilidad a la insulina, mayor fosforilación en residuos de Tyr del receptor, además de no desarrollar obesidad y resistencia a la insulina cuando les administran una dieta alta en grasa (Elchebly M et al, 1999, Klaman LD, 2000).

Otro mecanismo molecular asociado a la regulación del IR es la fosforilación de las subunidades- β en residuos de Ser/Thr. Existe evidencia que indica que esta serie de fosforilaciones afecta la actividad de cinasa del receptor en respuesta a la unión de la insulina, alteración que se ha observado en estados de resistencia y obesidad, tanto en roedores como en humanos. La principal cinasa asociada a la fosforilación del receptor es la proteína cinasa C (PKC), la cual lo fosforila en diferentes regiones intracelulares de la subunidades- β del receptor (Boura Halfon S, Zick Y, 2009). Sin embargo, también se ha observado la participación de otras cinasas que fosforilan al receptor y disminuyen su actividad, como la proteína cinasa A (PKA), la cinasa de la región NH₂ terminal de c-Jun (JNK) y proteínas cinasas activadas por Mitógeno p38 (p38-MAPK) (Boura Halfon S, Zick Y, 2009, Youngren J. 2007). Varios de los posibles sitios de fosforilación en Ser se encuentran en proximidad cercana a los sitios de autofosforilación o se localizan dentro del dominio catalítico del receptor, lo cual podría afectar su conformación o el acceso a los residuos de tirosina (Youngren J. 2007).

La regulación a nivel de la expresión del IR, representa otro mecanismo regulador de las acciones de la insulina. En presencia de insulina, la cinasa Akt fosforila al factor transcripcional FoxO1 en al menos tres residuos, lo cual favorece su interacción con dicha proteína. La interacción entre ambos promueve la exclusión de FoxO1 del núcleo celular y su eventual degradación proteosomal

dependiente de ubiquitinación, impidiendo de esta forma la transcripción del gen del receptor de insulina, regulando así la expresión de este mismo. Por el contrario, en ausencia de insulina, como en los periodos de ayuno, el factor transcripcional FoxO1 se une a la región promotora del IR, estimulando su transcripción (Puig O, Tjian R. 2005).

I.II.b Regulación de IRS.

La fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IRS, se ha considerado como uno de los principales mecanismos de regulación tanto homóloga como heteróloga de la señal de insulina. De los 230 residuos de Ser/Thr localizados en IRS, se han identificado más de 70 sitios potenciales de fosforilación para diferentes cinasas, entre las que se encuentran JNK, mTOR, ERK1/2, SIK-2 y diferentes isoformas de PKC, se conoce que en su mayoría estas proteínas tienen efectos de inhibición en las acciones que ejerce la insulina (Ciaraldi TP, Poretsky L. 2010). Existe evidencia experimental de que la fosforilación de múltiples residuos de Ser/Thr de IRS, representa un mecanismo clave en la inhibición de la señalización de la insulina, tanto por su activación fisiológica como fisiopatológica (Copps KD, White MF, 2012). Diversos estudios han demostrado que la fosforilación de estos residuos está asociada con la atenuación de la señal de la insulina, ya que se altera la capacidad de IRS de ser fosforilado en residuos de Tyr, se promueve su degradación y disminuye la actividad de PI3K (Boulton TG, et al, 1991).

I.II.c Regulación por proteínas adaptadoras.

Se han identificado diversas proteínas adaptadoras que al interaccionar con el receptor de insulina o con IRS disminuyen su actividad. Por ejemplo, las proteínas supresoras de proteínas de señalización de citocinas (SOCS), específicamente SOCS-1 y SOCS-3, son potentes represores de la vía de señalización de la insulina, cuya expresión es inducida por acción de la insulina en diferentes tejidos y líneas celulares. Se ha propuesto que las proteínas SOCS regulan la señal de la insulina por su interacción directa tanto con el receptor de insulina como con IRS, cuando ambos se encuentran activos. La interacción IR-IRS/SOCS además de inhibir la fosforilación en Tyr de IRS, al competir por el mismo sitio de interacción en el IR, también promueve la degradación proteosomal de IRS e inhibe la actividad de cinasa del IR (Emanuelli B, et al. 2000, Lebrun P, Van Obberghen E. 2008). Por otra parte, las proteínas Grb10 y Grb14 son proteínas adaptadoras citoplásmicas que se unen directamente a las fosfotirosinas del IR (en el asa de activación) a través de dominios SH2; esta interacción disminuye la actividad catalítica del receptor e impide su interacción con IRS. Se ha demostrado que la expresión de ambas proteínas, en células adiposas o musculares bajo condiciones de obesidad disminuye la sensibilidad a la insulina (Cariou B, et al. 2004).

I.II.d Fosfatasas de lípidos como reguladores negativos de las acciones de la insulina.

Además de la regulación a nivel del IR y de IRS, existen puntos de regulación por debajo de ambas proteínas que también influyen en la modulación de la señal de insulina. En este contexto, las fosfatasas de lípidos pueden regular la señalización de insulina mediante la modulación de los niveles de fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato (PIP3), los cuales se generan por acción de la PI3K. La fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) desfosforila a PIP3, antagonizando así de manera específica la señalización de PI3K/Akt (Cantley LC, Neel BG. 1999, Carracedo A, Pandolfi. 2008). De forma interesante, un estudio reciente de Shi y colaboradores (Shi Y et al. 2014), demostró que además de disminuir los niveles de PIP3, PTEN también puede desfosforilar a IRS-1 alterando de esta forma la señalización de la insulina a través de la vía PI3K/Akt por medio de estos dos mecanismos. Por otra parte, las fosfatasa-2 del inositol en posición 5' que contienen un dominio SH2 (SHIP-2) también desfosforila a PIP3 y desempeña un papel importante en la regulación de la señal de insulina (Suwa A, et al. 2010, Dyson JM, et al. 2012).

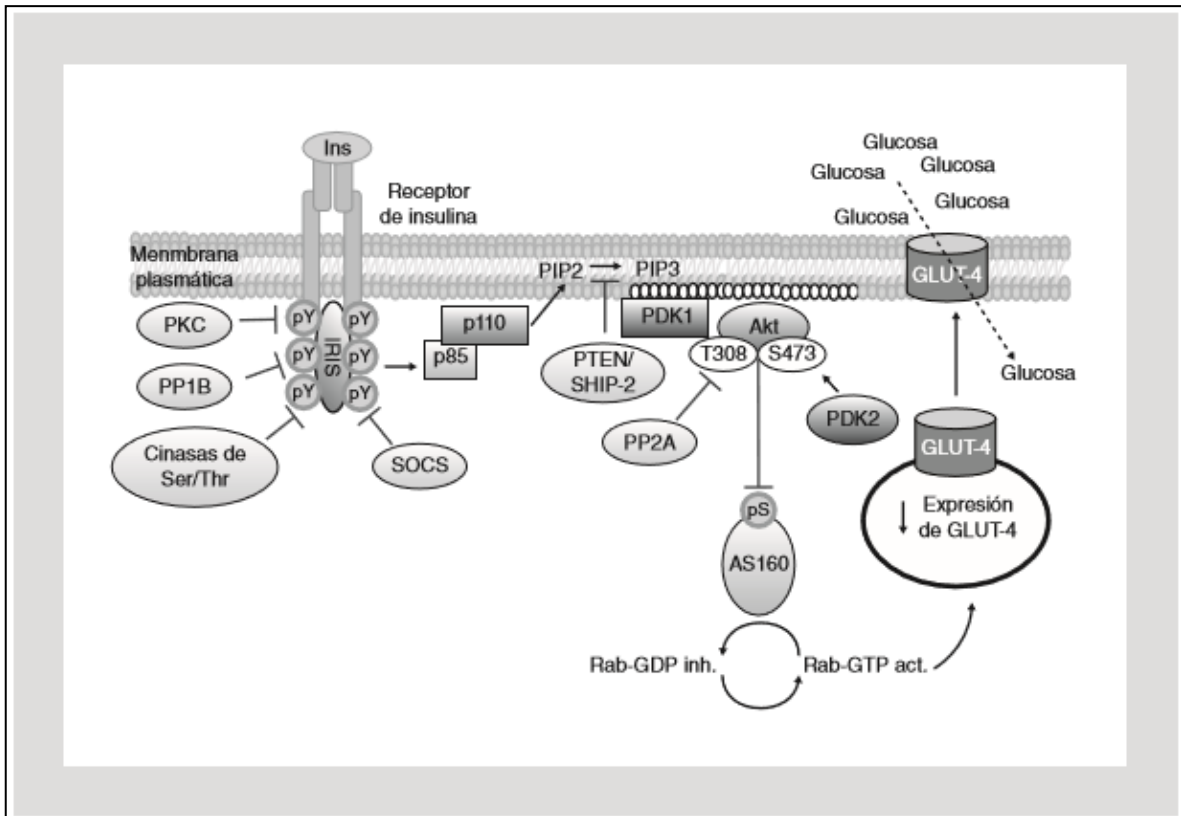


Figura 3. Regulación de las acciones de la insulina. Participación de cinasas y fosfatasa en la modulación de los efectos de la insulina, que pueden ejercer sus acciones a nivel del receptor de insulina, IRS, PIP3 o Akt(Gutierrez- Rodelo et al. 2016).

I.III Resistencia a Insulina

La resistencia a insulina es un estado patológico, en el cual las células que de forma normal responden a esta, dejan de hacerlo. En esta condición, existe una disminución en el transporte de glucosa inducido por insulina en el tejido adiposo y muscular, mientras que en el hígado provoca la alteración en la producción de glucosa, lo que conlleva a estados de hiperglicemia. Por otra parte, la acumulación de lípidos en este tejido parece ser suficiente para inducir resistencia a la insulina hepática (Saltiel Alan R., Kahn C. Ronald. 2001). A nivel molecular, la resistencia a la insulina es la consecuencia de las alteraciones en la señalización de esta

hormona, debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de proteínas efectoras localizadas río abajo del mismo (Dyson, et al.2012).

Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores y su actividad catalítica; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr en el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT-4 (Sesti et al. 2006) tal y como se ve en la **figura 3**. De estas alteraciones, el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IR y de IRS, ha sido considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. La hiperfosforilación de residuos de Ser/Thr de ambas proteínas puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en tirosina, disminuir su activación e inducir su degradación, así como reducir su interacción con PI3K, alterando de esta forma la fosforilación y activación de la cinasa Akt. Diversos agentes como las citocinas proinflamatorias, los ácidos grasos saturados (AGS), aminoácidos, endotelina-1, angiotensina II (Ang II) y estados de hiperinsulinemia (Zeng G, et al. 2000, Montagnani M, et al. 2002 Dimmeler S, et al. 1999), aumentan la actividad de cinasas que fosforilan a IRS, como varias isoformas de PKC, la cinasa de estrés JNK, mTor, p70-S6K1, PKA y las MAPKs. La hiperfosforilación de residuos de Ser/Thr a lo largo de la estructura de IRS-1 pueden reducir hasta en un 50% la fosforilación en tirosinas estimulada por la insulina (Zick Y, 2005). Este nivel de inhibición es suficiente para causar intolerancia a la glucosa que puede progresar a DM2 (Kido Y, et al. 1995). Por otro lado, estados de hiperinsulinemia pueden agravar por si mismos la fosforilación en Ser/Thr de IRS a través de la activación de las vías PI3K/Akt,

PKC- τ / λ , ó mTORC1/p70S6k, las cuales participan en la regulación de la señal de insulina (Olivares Reyes et al. 2009).

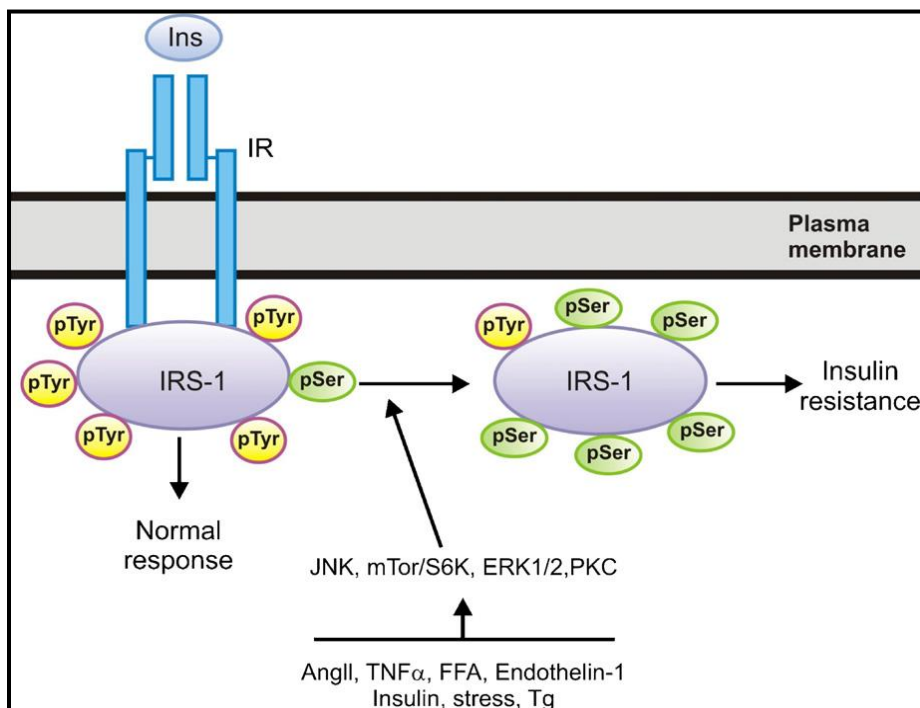


Figura 4. Mecanismo de fosforilación en Ser del sustrato del receptor de insulina. De forma normal en respuesta a insulina IRS-1 es fosforilado, ejerciendo así su función de anclaje para proteínas como PI3K. Si la fosforilación en serinas de IRS-1 se encuentra incrementada, la interacción entre IRS-1 e IR disminuye y la actividad de PI3K y AKT se ve afectada, lo cual resulta ser un efecto asociado a estados de resistencia a insulina (Olivares Reyes et al. 2009).

I.IV Papel de los ácidos grasos en la resistencia a la insulina

El descubrimiento de que algunos ácidos grasos puedan actuar como ligandos de factores de transcripción indica que estos, no son meramente moléculas pasivas que aportan energía, sino que también son reguladores metabólicos.

Los ácidos grasos son usados como la principal fuente energética del organismo durante periodos de ayuno. Sin embargo, cuando los niveles de ácidos grasos libres son anormalmente altos, distintas respuestas celulares pueden ser activadas, entre las que se encuentran: el estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, apoptosis e inflamación (Legrand et al. 2014). Dentro de los principales lípidos responsables de éstas, se encuentran los ácidos grasos saturados. Múltiples estudios en roedores, han demostrado que una dieta alta en grasas saturadas, resulta en un incremento en la acumulación de lípidos intracelulares, causando resistencia a la insulina (Jucker BM et al. 1999); también fue identificado un mecanismo mediado por este tipo de ácidos grasos que involucra la activación de la fosfatasa PP2A, la cual regula negativamente la fosforilación de Akt.

Aunque los mecanismos moleculares por los que los ácidos grasos libres inducen resistencia a la insulina han sido parcialmente identificados, evidencia con respecto a esto, sugiere la participación de distintos mecanismos de señalización asociados a estas acciones. Estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres, puede llevar a cambios en la expresión del IR y su actividad de cinasa (Samuel VT et. al 2004).

Por otra parte, se ha identificado que los ácidos grasos libres también son inductores de la respuesta inflamatoria, lo cual ha sido reportado a través de

mecanismos relacionados con la activación de receptores denominados Toll like receptors (TLR). De forma específica el TLR4, el cual forma parte del sistema inmune innato, es activado por los lipopolisacáridos de bacterias gram (-), lo cual promueve la activación de las vías de señalización de I κ b/NF κ B y JNK/AP1 culminando en la secreción de citocinas proinflamatorias (Bayascas J.R, et al. 2008).

El aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres, induce que por sí mismos o por medio de intermediarios de su metabolismo (como el ácido linoleico, el diacilglicerol (DAG), el ácido fosfatídico, el ácido lisofosfatídico y las ceramidas), los cuales actúan como importantes inductores de resistencia a la insulina y promueven la activación de diversas proteínas como PKC (Farese RV. 2000). La PKC, ha sido clasificada en tres subfamilias, de acuerdo al tipo de ligando requerido para su activación: clásicas, nuevas y atípicas. De forma específica, el DAG es un potente activador de isoformas clásicas (PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ) y nuevas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η y PKC θ) de PKC (Schmitz-Peiffer, 2013). Estas cinasas participan en la regulación negativa de la señal de insulina, especialmente por fosforilar a IRS-1 en residuos de serina (Farese RV, 2000). Se ha demostrado que el aumento en los niveles de DAG, por un incremento en plasma de ácidos grasos libres, promueve la activación de las PKC β II y PKC δ en músculo esquelético de humanos (Capurso C, Capurso A. 2012). La activación de ambas isoformas se ha asociado a la fosforilación del receptor de insulina y de IRS en residuos de Ser, lo que conlleva a una disminución en la fosforilación en

Tyr en ambas proteínas, afectando su señalización (Le Marchand-Brustel Y, 2003) **(Figura 3)**.

Por otra parte, en el tejido hepático de animales sometidos a una dieta alta en grasa, la presencia de resistencia a la insulina se ha asociado al incremento en los niveles de DAG, lo que promueve la translocación de PKC ϵ a la membrana plasmática, en donde interacciona con el dominio catalítico del IR. Esta interacción promueve la disminución de la actividad del receptor, afectando la fosforilación en Tyr de IRS-2 y la actividad de Akt2. Consecuentemente, la capacidad de la insulina de activar la síntesis de glucógeno y de inhibir la gluconeogénesis se ve alterada (Samuel VT et al, 2007). Interesantemente, el incremento en los niveles de DAG y su asociación con la activación de la PKC ϵ , han sido importantes marcadores de resistencia a la insulina en el tejido hepático de humanos obesos (Samuel VT et al, 2004, Kumashiro N et al. 2011). En un trabajo reciente de Shulman et al., se identificó que la PKC ϵ en el hígado, posee la capacidad de fosforilar al IR en el residuo de Thr¹¹⁶⁰, efecto que disminuye su actividad de cinasa, afectando entre otras funciones, la síntesis de glucógeno en este órgano (Petersen, M. C et al. 2016) **(Figura 5)**.

La activación de macrófagos en el tejido adiposo blanco y la consecuente respuesta inflamatoria, causan un aumento en el proceso de lipólisis y resistencia a la insulina en este tejido, efecto que promueve la continua liberación de ácidos grasos y glicerol hacia el hígado. La acumulación de lípidos hepáticos y la activación de PKC ϵ causan el incremento de la gluconeogénesis y

consecuentemente el incremento en la producción hepática de glucosa, produciendo hiperglucemia (Perry RJ et al, 2014).

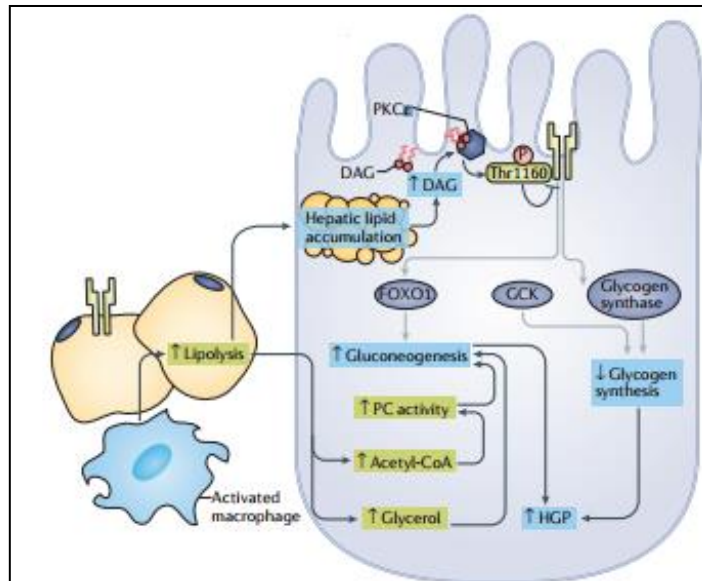


Figura 5. Acciones de la insulina en el hígado en presencia de diabetes mellitus. La resistencia a la insulina en el hígado inducida por lípidos, mecanismo que incrementa los niveles de DAG en este tejido, lo cual resulta en la activación de PKC ϵ , la cual altera la señalización de la insulina a través de la fosforilación de Thr¹¹⁶⁰ en el receptor de insulina (Petersen, M. C et al. 2016).

De forma opuesta, se ha propuesto que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) pueden tener un efecto benéfico en el desarrollo o control de la diabetes y resistencia a la insulina, a través de diferentes mecanismos moleculares asociados con sus efectos antiinflamatorios y de sensibilidad a la insulina. Existen dos familias principales de AGPI y se clasifican como omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), basado en la posición del primer doble enlace, contado a partir del metilo terminal de la molécula. Los AGPI no pueden ser sintetizados *de novo* por las células de mamíferos por lo que se les denomina "esenciales", debido a que

deben de ser obtenidos de la dieta. Estos ácidos grasos regulan una amplia variedad de funciones biológicas, dependiendo de la localización del último doble enlace, que van desde la presión arterial y coagulación sanguínea, hasta el correcto desarrollo y funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso (Cruz Rodríguez et al, 2005).

Los ácidos grasos insaturados omega-3 (AG- ω 3), son AGPI esenciales de cadena larga que presentan el primer doble enlace en la posición 3 de la cadena hidrocarbonada, que se obtienen a través de la dieta. Estos incluyen al ácido α -linolénico (ALA); una molécula de 18 átomos de carbono con tres dobles enlaces en su estructura, la primera se encuentra en el tercer carbono a partir del metilo terminal, su nomenclatura es 18:3 n3 Δ 9, 12,15 al ácido docosahexaenoico (DHA) y al ácido eicosapentaenoico (EPA). Se han propuesto como sensibilizadores de las acciones de la insulina y con efectos antiinflamatorios, lo cual se refleja en su consumo suplementario en la dieta (Jucker BM et al. 1999, Winzell MS, et al. 2006, Simopoulos, AP.1991). Los principales AG- ω 6 son el ácido linoleico (18:2) (AL), el más corto de los ω -6, y el ácido araquidónico (20:4) (AA), principal precursor de prostaglandinas (Patterson, E et al. 2012). El ácido linoleico posee 18 átomos de carbono con dos dobles ligaduras, la primera localizada en el sexto carbono a partir del metilo terminal; su nomenclatura es 18:2 n6 Δ 9, 12. A partir de este ácido graso es posible que se formen otros, tal como el ácido linoleico conjugado (Khanal R.C. Dhiman T.R, 2004).

I.V Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término genérico asignado a un grupo de AGPI, isómeros geométricos derivados del AL (C18:2, *c9*, *c12*), que contienen un sistema de dobles enlaces conjugados en configuración *cis* o *trans*, o combinaciones entre ellos, estos isómeros poseen dobles enlaces conjugados los cuales se caracterizan por no estar separados por un grupo metilo y por localizarse en diferentes posiciones a lo largo de la cadena de 18 carbonos (Reynolds CM, Roche HM. 2010) **(Figura 6)**. Esto permite la existencia de 28 posibles isómeros, entre los que se encuentran el isómero *cis-9, trans-11*-CLA, el cual constituye más del 90% del total de CLA y el isómero *trans-10, cis-12*-CLA con un porcentaje que varía del 1 al 10% del total de CLA proveniente de fuentes dietéticas, asociados a un sin número de efectos biológicos (Roche et al. 2001, Shen Wan, McIntosh Michael, 2016).

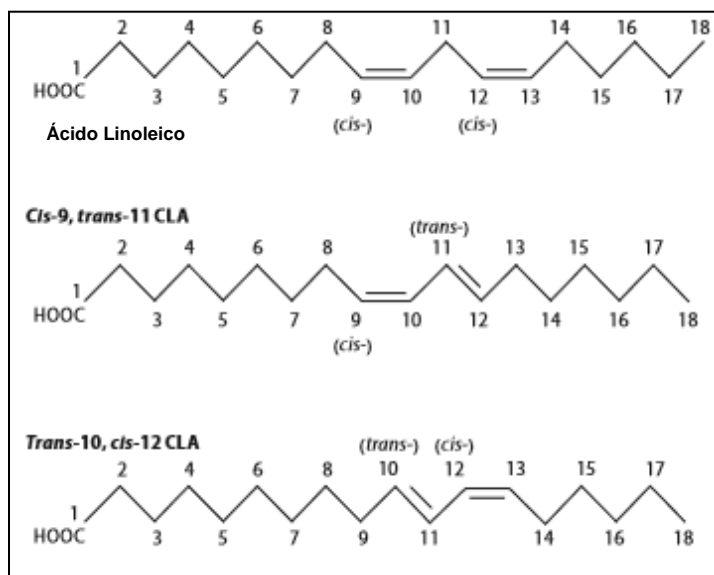


Figura 6. Estructura del ácido linoleico y de los isómeros *cis-9, trans-11* y *trans-10, cis-12*-CLA. Representación esquemática del ácido linoleico y dos de los principales isómeros del ácido linoleico conjugado, el cual es un derivado de este, el isómeros *cis-9, trans-11*-CLA y el isómero *trans-10, cis-12*-CLA (Shen Wan, McIntosh Michael, 2016).

I.V.A Fuentes y distribución

La proporción de CLA en productos lácteos varía de 0.34% a 1.07% de la grasa total y de 0.12% a 0.68% en productos crudos o procesados de res. Esta variación se debe a factores como temporada, raza, estatus nutricional y edad del animal del que fue extraído. Existen preparaciones comerciales de CLA, que provienen de aceite de cártamo o de girasol extraído en condiciones alcalinas. Esto produce una mezcla de CLA con 40% del isómero *cis-9, trans-11-CLA*, 44%, del isómero *trans-10, cis-12-CLA* y el resto lo forman trazas de otros isómeros (Khanal R.C. Dhiman T.R. 2004).

Fuente dietética	Cantidad de CLA (g/100 g de grasa)
Leche entera	0.55
Leche baja en grasa (2%)	0.41
Leche condensada	0.70
Mantequilla	0.47
Yogurt natural	0.48
Yogurt bajo en grasa	0.44
Yogurt congelado	0.28
Queso cheddar	0.41
Queso procesado	0.50
Carne de res	0.43
Cordero	0.58
Ternera	0.27

Tabla 1. Principales fuentes dietéticas del ácido linoleico conjugado. Tabla sintética en donde son mostradas de forma general las fuentes alimenticias principales, a partir de las cuales es posible obtener el ácido linoleico conjugado, en este caso el origen de estas es animal, cuyos derivados resultan ser fuentes muy importantes del ácido, tal y como se ve en el caso de los lácteos (Chin S.F. et al. 1992).

Suplementos comerciales de la mezcla de CLA contienen 1000 mg por cada píldora, en el 2008 fue reconocido oficialmente por la FDA (Food and Drug Administration) como un producto alimenticio seguro (Shen Wan, McIntosh Michael, 2016). Las principales fuentes dietéticas de CLA se muestran en la tabla 1 (Chin S.F. et al.1992).

I.V.B Biosíntesis

La síntesis natural de los isómeros del CLA ocurre por la fermentación del ácido linoleico en el rumen de algunos animales. Por ejemplo, *Butyrivibrio fibrisolvens* es una bacteria gram negativa que isomeriza el enlace *cis-12 a trans-11* y *Megasphaera elsdenii* isomeriza el enlace *cis-9 a trans-10*, durante el proceso de fermentación ruminal (Chin S.F. et al. 1992, Kim YJ et al. 2002, Shen Wan, McIntosh Michael, 2016).

De forma alternativa estos ácidos grasos pueden ser sintetizados de forma endógena en las glándulas mamarias de los animales rumiantes, lo cual se lleva a cabo mediante la desaturación δ -9 de los enlaces *trans-11* de los ácidos grasos 18:1, lo que da origen a la síntesis principalmente del isómero *cis-9, trans-11-CLA* ver **figuras 7 y 8** (Khanal R.C. Dhiman T.R, 2004).

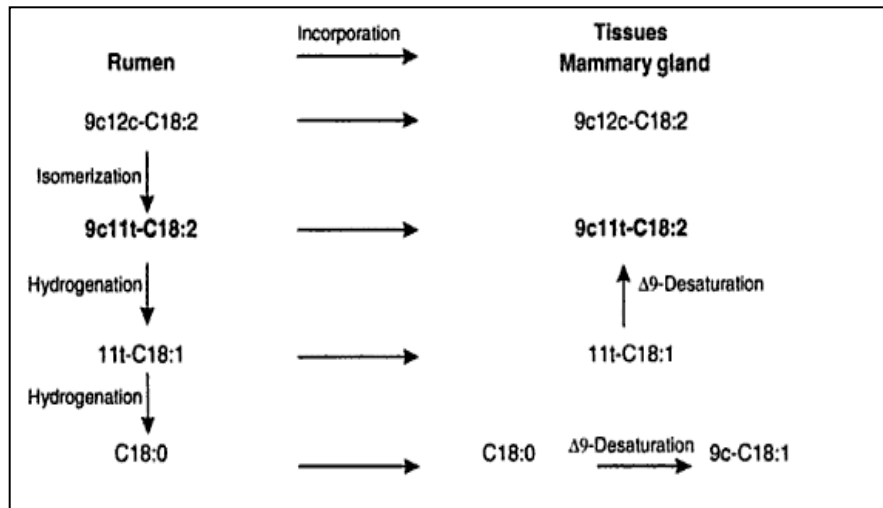
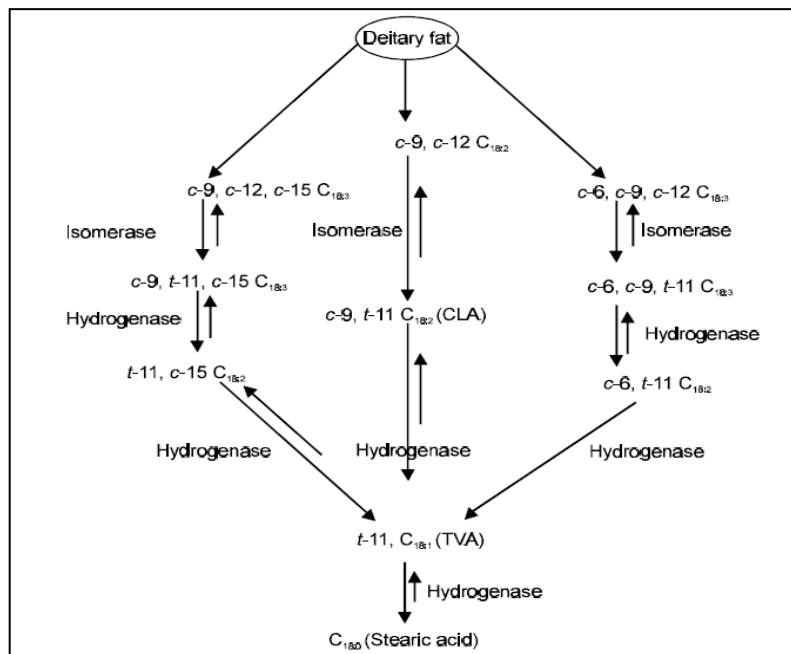


Figura 7. Vías de la biosíntesis de CLA (*cis-9, trans-11-CLA*). De forma sintética se muestran las reacciones de isomerización, hidrogenación y desaturación, ocurridas en el rumen y tejidos de animales, que se llevan a cabo para la generación, en este caso del isómero *cis-9, trans-11-CLA*, el cual es el principal isómero obtenido a partir del ácido linoleico (Khanal R.C. Dhiman T.R, 2004).



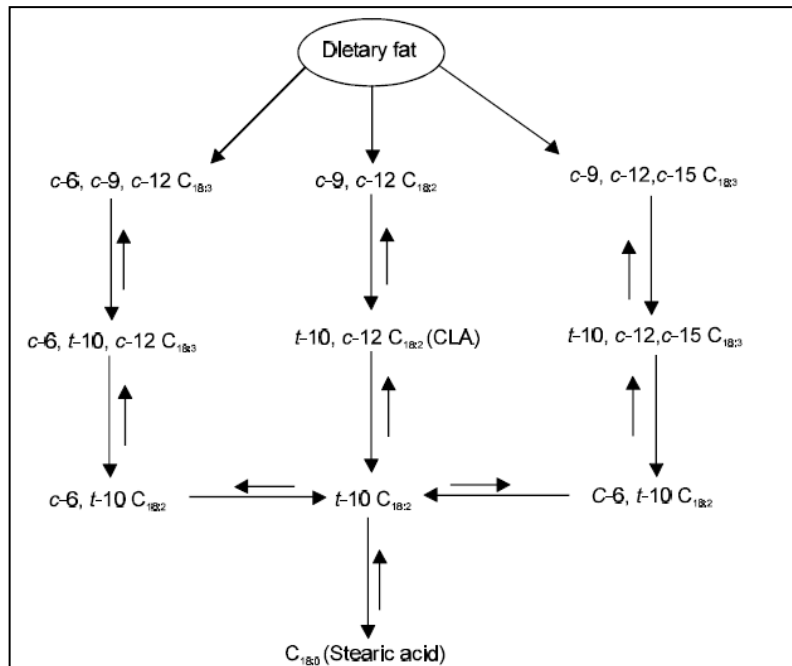


Figura 8. Vías de biohidrogenación del ácido linoleico conjugado llevadas a cabo en el rumen animal. De forma más específica, se muestran parte de las vías predominantes de biohidrogenación del ácido linoleico conjugado en el rumen animal, llevado a cabo mediante una serie de reacciones para la conversión de los isómeros de CLA (Khanal R.C. Dhiman T.R, 2004).

Incorporación de CLA hacia células y tejidos

En diversos tipos celulares, la incorporación de los diferentes isómeros de CLA es variable. Existen reportes de que más del 50% de estos grasos pueden ser encontrados en los fosfolípidos de las membranas biológicas. Hallazgos en adipocitos humanos tratados con los isómeros de CLA radiomarcados y algunos de los sustratos que participan en el proceso de oxidación y síntesis de lípidos, han reportado que los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* son tomados y convertidos en acilgliceroles y fosfolípidos de membrana. En líneas celulares de leucemia tratadas con ambos isómeros de CLA, también han sido

encontrados incorporados de esta misma forma. Estudios *in vivo* han demostrado que CLA puede incorporarse en el cerebro, riñón, bazo, hígado, corazón, músculo, tejido adiposo subcutáneo y visceral blanco. De forma consistente con estos datos, ha sido también demostrado que en ratones tratados con los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* fueron incorporados en el hígado y en el tejido adiposo epididimal de estos (Seale P. et al. 2009, Sebedio JL et al. 2001, YuanG-F et al. 2009).

II. ANTECEDENTES

El CLA fue descubierto en el año de 1987 por Pariza y colaboradores en la Universidad de Wisconsin. Se le atribuyeron propiedades anticarcinogénicas, antiescleróticas y antiobesigénicas en modelos de ratones y en algunos estudios clínicos (Ha YL, et al. 1987). En años recientes, CLA ha recibido atención debido a que un número importante de estudios, ha demostrado que tanto de fuentes sintéticas como naturales, estos ácidos grasos tienen efectos biológicos benéficos, revirtiendo y protegiendo contra toda una gama de condiciones, entre las que se incluyen aterosclerosis, cáncer, síndrome metabólico, obesidad, diabetes e inflamación (Reynolds C.M, 2010, Dilzer, A, Park, Y. 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que el CLA es capaz de promover la homeostasis de glucosa, potenciando la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β -pancreáticas (Schmidt, J, et al. 2011).

Por otra parte, se ha propuesto que los efectos anti-inflamatorios y antidiabéticos son mediados por el isómero *cis-9, trans-11-CLA*, que es el responsable de disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias y reducir la resistencia a la insulina en células adiposas (Moloney, F, et al. 2007) La mayoría de estas investigaciones se han realizado en modelos animales, empleando principalmente una mezcla de isómeros, que consiste de cantidades similares de *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*, con una proporción mucho menor de otros isómeros.

A la fecha, se han sugerido diversos mecanismos moleculares por los que CLA podría actuar, lo cual se debe entre muchas razones, a los efectos

diferenciales que poseen sus dos isómeros predominantes. Existen reportes de que CLA podría mediar sus efectos vía la producción de citocinas, el metabolismo de eicosanoides o un efecto directo en la expresión de genes. Además de los efectos benéficos de CLA, se ha reportado que la ingesta de este también da lugar a efectos adversos como resistencia a la insulina, esteatosis hepática e inflamación, efectos contradictorios a lo observado en muchos estudios. Se ha evidenciado que el isómero *trans-10,cis-12*-CLA además de reducir la acumulación de grasa corporal, es el responsable de los efectos adversos de CLA (Reynolds CM, Roche HM. 2010) **(Figura 9)**.

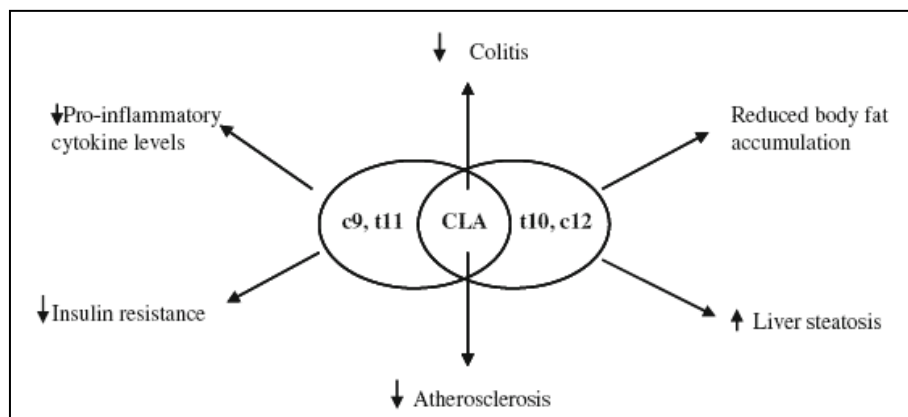


Figura 9. Efectos biológicos de los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*. Representación esquemática de las principales acciones de los isómeros de CLA. Se ha visto que el mecanismo de acción de los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*, son isómero específico, siendo el isómero *cis-9, trans-11-CLA* el relacionado con efectos positivos en estados de resistencia a insulina, mientras que el isómero *trans-10, cis-12-CLA* ha sido el vinculado con estados de esteatosis hepática (Reynolds CM, Roche HM. 2010).

II. I Isómero *cis-9, trans-11* de CLA

La mayor parte de los reportes existentes con respecto a los mecanismos moleculares relacionados con los efectos antidiabéticos del isómero *cis-9, trans-11-CLA* se encuentran en tejido adiposo. Moloney y colaboradores reportaron que ratones *ob/ob* sometidos a una dieta suplementada con este isómero durante 4 semanas, mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y una menor concentración sérica de triglicéridos, además de tener una reducción del 50% en los niveles de expresión del mRNA de TNF α , en el tejido adiposo. Encontraron además, una mayor expresión proteica del receptor de insulina y del transportador de glucosa GLUT-4, menor infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo y niveles disminuidos de mRNA de moléculas proinflamatorias como MCP-1, CD-68, IL-6 y TNF- α . En este mismo estudio, en adipocitos 3T3-L1 tratados con el isómero *cis-9, trans-11-CLA*, se observaron niveles de expresión disminuidos de TNF- α y una mayor expresión del mRNA de GLUT-4. En este contexto, los autores proponen a este ácido graso como un candidato importante para el tratamiento dietético en estados de resistencia a la insulina, debido a sus efectos anti-inflamatorios y su capacidad de modificar la grasa corporal (Moloney, F. et al. 2007) **(Figura 10)**.

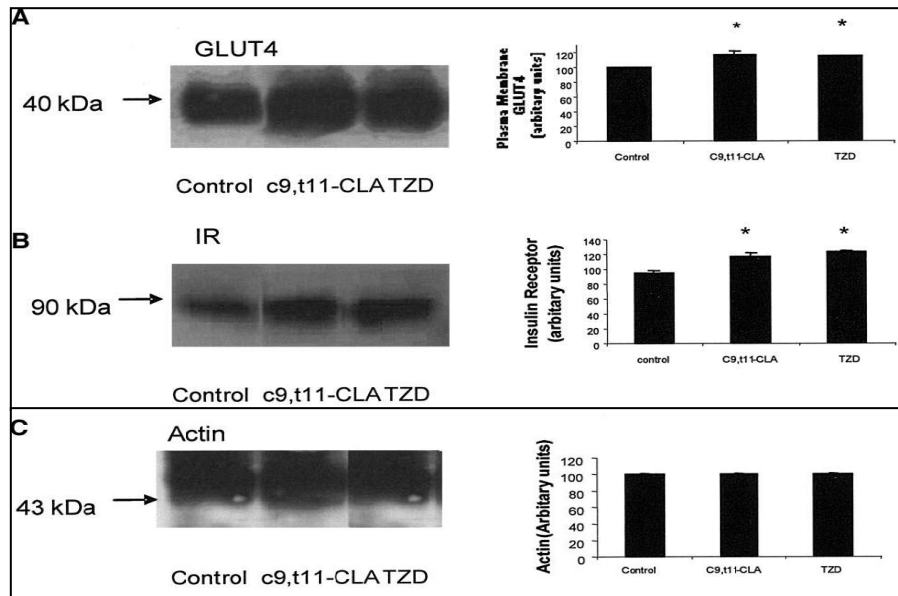


Figura 10. Efecto antidiabético del isómero *cis-9, trans-11-CLA* en el tejido adiposo de ratón. En un modelo de tejido adiposo de ratón, (A) se observó que la expresión de GLUT-4 en la membrana plasmática, se incrementa en un 17%, en el caso de los ratones que recibieron una dieta alta en el isómero *cis-9, trans-11-CLA*; así mismo un incremento equivalente fue mostrado en los ratones tratados con glitazonas TDZ, tiazolidinedionas; un fármaco que mejora la sensibilidad a insulina; (B) en cuanto la expresión del receptor de insulina se encontró un incremento del 23% en comparación con el control; estos resultados son similares a los obtenidos con glitazonas en donde se observó un incremento en la expresión del GLUT-4 del 20% y de IR del 29.5% con respecto al control (Moloney, F. et al. 2007).

En otro estudio reciente, Malinska et al., demostraron que la suplementación con CLA disminuye los efectos negativos del síndrome metabólico, como la acumulación ectópica y visceral de lípidos y la resistencia a la insulina, en un modelo de síndrome metabólico de ratas no obesas con hipertrigliceridemia genética (HHTg) (Malinska, H et al. 2015).

Por otra parte, se ha sugerido que algunos de los efectos del CLA son mediados a través del receptor de AGL-1 (FFAR1) o GPR40, el cual pertenece a la familia de los GPCRs (Schmidt, J, et al. 2011, Sartorius, T et al. 2015). Este receptor es el encargado de mediar las acciones de CLA en la potenciación de la

secreción de insulina estimulada por glucosa en células β -pancreáticas. Un estudio reciente de Sartorius et al, mostró que la ingesta crónica de CLA lleva a su acumulación en el cerebro de ratones e induce inflamación y resistencia a la insulina sistémica, adicionalmente demostraron que la deficiencia del GPR40 en ratones KO (*Ffar1*^{-/-}) exacerba ese estado, sugiriendo un papel protector del GPR40. Este estudio sugiere la necesidad de más investigaciones sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales CLA y sus isómeros, se encuentran implicados en procesos asociados a la sensibilidad y resistencia a la insulina en distintos tipos celulares, ya que sus acciones parecen ser tejido específico. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios con humanos han sido inconsistentes, ya que la evidencia existente hasta el momento, ha resultado ser controversial con respecto a estos hallazgos.

II.II Isómero *trans*-10, *cis*-12 de CLA

Existe evidencia de que el isómero *trans*-10, *cis*-12-CLA induce inflamación en el tejido adiposo, lo cual se ha asociado con resistencia a la insulina y apoptosis. Entre los mecanismos descritos por diversos grupos de estudio, se sugiere que CLA disminuye de forma dramática la expresión de los PPARs (peroxisome activator receptor), en particular de PPAR γ 1 y PPAR γ 2, lo cual se asocia a la disminución de la expresión de proteínas involucradas en la homeostasis de lípidos y de GLUT-4, además de promover la expresión de genes inflamatorios como TNF- α e IL-6 a través de un mecanismo dependiente de NF κ B en células adiposas (Brown, JM, McIntosh, MK. 2003).

Hallazgos encontrados en cultivos de células aisladas de tejido adiposo blanco de ratones C57Bl/6J y cultivos de 3T3-L1 bajo el tratamiento con el isómero *trans-10, cis-12-CLA*, mostraron tener un proceso inflamatorio localizado, caracterizado por una mayor infiltración de macrófagos y niveles elevados de TNF- α , IL -6 y MCP-1. Además, observaron una menor captación de glucosa inducida por insulina; los niveles de fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y su sustrato también disminuyeron, efecto acompañado por niveles de expresión disminuidos de cada una de estas proteínas. Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la fosforilación de la Ser³⁰⁷ de IRS, mecanismo relacionado con estados de resistencia a la insulina. Por su parte, el isómero *cis-9, trans-11-CLA* no mostró tener ningún efecto (Poirier et al. 2006) (**Figura 11**).

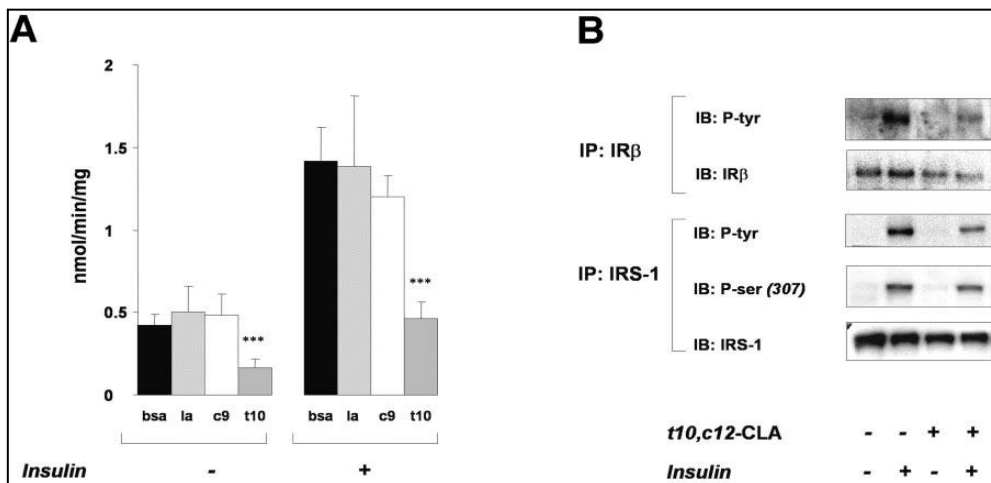


Figura 11. La suplementación nutricional con el isómero *trans-10, cis-12-CLA* induce inflamación en tejido adiposo blanco. La estimulación con el isómero *trans-10, cis-12-CLA* disminuye la captación de glucosa inducida por insulina y disminuye la fosforilación en residuos de tirosina en el receptor de insulina y su sustrato en células 3T3-L1 (Poirier et al. 2006).

Una de las principales atribuciones al isómero *trans-10, cis-12-CLA* es su papel antiobesigénico, distintos trabajos describieron que sus efectos son llevados a

cabo a través de la activación de un GPR, acoplado a una proteína Gq, y la participación de una PLC que hidroliza PIP2 para dar origen a DAG e IP3, e inducir la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico. Los niveles elevados de calcio intracelulares activan otras vías de señalización como las que involucran a CAMKII, MAPKs, JNK y ERK, así como de proteínas de choque térmico (HSPs), lo cual da origen a la activación de factores de transcripción como NFκβ y c-Jun, los que antagonizan la actividad de PPARγ, bloqueando los procesos de adipogénesis, lipogénesis y captación de glucosa en adipocitos. Existe la propuesta de que el isómero *trans-10, cis-12-CLA* de forma directa o indirecta activa a GPRs o receptores β adrenérgicos acoplados a la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc y activando a PKA. Esta cinasa puede fosforilar a la lipasa sensible a hormona (HSL) induciendo la lipólisis, lo cual permite el aporte de ácidos grasos para la β-oxidación y la termogénesis (Shen Wan, McIntosh Michael. 2016) **(Figura 12)**.

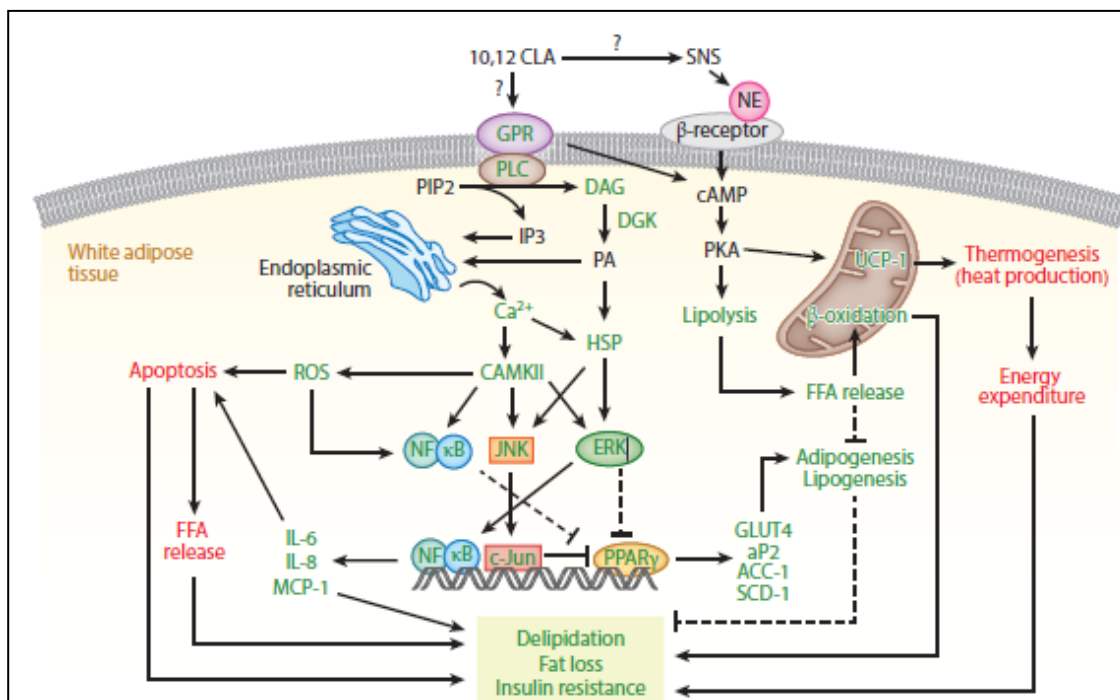


Figura 12. Propiedades inflamatorias de CLA en el tejido adiposo. Principales hallazgos del grupo de McIntosh y colaboradores en el proceso de deslipidación y reducción de masa grasa en tejido adiposo pardo (Shen Wan, McIntosh Michael. 2016).

II.III Evidencia de los efectos de CLA en tejido hepático

La evidencia existente con respecto a los efectos de CLA en la regulación de la respuesta a insulina en el tejido es escasa, sin embargo; existen algunos trabajos en donde ha sido reportado el papel que tiene este ácido graso. Choi et al, evidenciaron en un modelo de ratas Sprague–Dawley, el efecto de tres preparaciones distintas de los isómeros de CLA, las cuales fueron administradas durante 8 semanas a estas. Cada preparación consistió en la siguiente proporción de ácidos grasos: *cis-9, trans-11-CLA* (76.5%), *trans-10, cis-12-CLA* (89.6%) y la mezcla de ambos (31.3% *cis-9, trans11-CLA*, 36.7% *trans-10, cis-12-CLA*, 17.3% de otros isómeros de CLA). Fueron evaluados diversos marcadores de

sensibilidad a la insulina y se encontró que los valores de HOMA, NEFA y R-QUICKI fueron significativamente más elevados comparados con el grupo control, indicando una mayor sensibilidad a la insulina en los ratones tratados con CLA, en el tejido hepático aislado los niveles de fosforilación de proteínas que participan en la vía de señalización de insulina fueron determinados también, la fosforilación de la cinasa Akt en la Ser⁴⁷³ aumentó únicamente en la preparación en donde predominó el isómero *trans-10, cis-12-CLA*. Con respecto al sustrato del receptor de insulina 1 en la Ser³⁰⁷, un marcador de resistencia a la insulina, las tres preparaciones de CLA disminuyeron el nivel de fosforilación en este residuo de IRS, además de que las tres condiciones presentaron una mayor acumulación de glucógeno con respecto al grupo control, hallazgos que sugerirían que los isómeros y la mezcla de CLA, podrían tener efectos positivos en la regulación de la respuesta a insulina y que resultan ser totalmente opuestos a los encontrados por otros grupos de estudio como los reportados en células adiposas, tal y como se mencionó con anterioridad (Choi JS, et al. 2007) **(Figura 13)**.

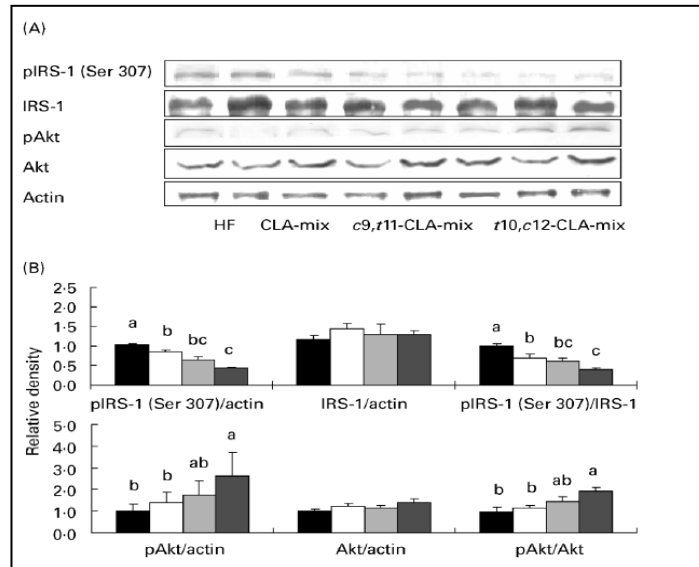


Figura 13. Efecto de tres preparaciones distintas de CLA en la señalización de insulina en un modelo de hígado de rata. Efecto de tres preparaciones de CLA en el hígado de ratas. (A) La fosforilación en serinas de IRS-1 fue disminuida, bajo las tres condiciones. La preparación cuyo isómero predominante fue el isómero *trans*-10, *cis*-12 - CLA incrementó el estado de activación de Akt en la Ser⁴⁷³, (B) Análisis de densitometría de IRS-1 Ser³⁰⁷ y Akt Ser⁴⁷³ (Choi JS, et al. 2007).

Un estudio realizado por Adkins et al, en el 2013 con respecto a los efectos del ácido linoleico conjugado en tejido hepático, demostró que ratones hembra C57BL/6N alimentados con una dieta enriquecida con CLA, mostraron resistencia a la insulina de acuerdo a los valores obtenidos en las pruebas de tolerancia a la glucosa, insulina y HOMA.-IR. Además, con la finalidad de identificar el mecanismo de resistencia a la insulina encontrado en las pruebas anteriores, el tejido hepático de estos animales fue aislado y analizado por medio de ensayos de western blot, fue evaluada la fosforilación de Akt en la Thr³⁰⁸, encontrando un menor nivel de fosforilación en esta cinasa, adicional a estos efectos resultados, encontraron la presencia macroesteatosis hepática y daño celular (Adkins Yuriko, et al. 2013) **(Figura 14)**.

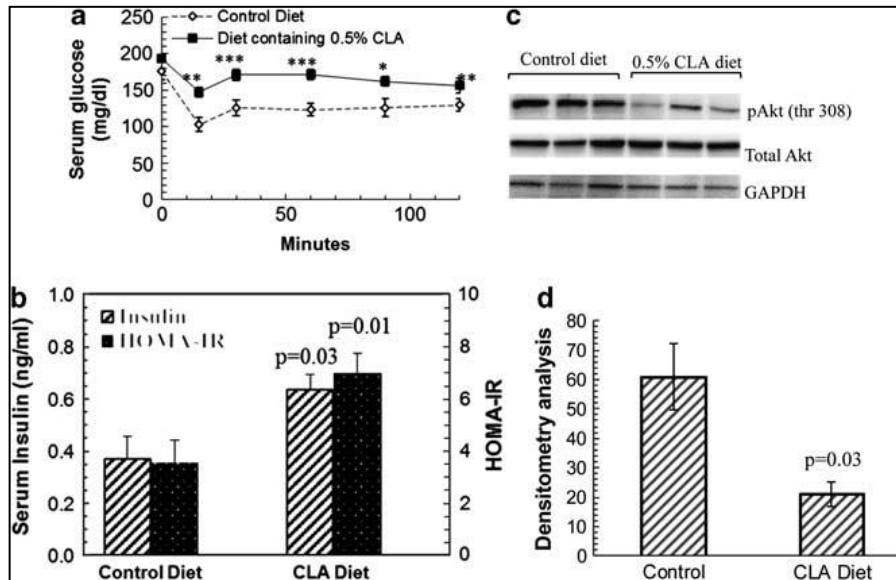


Figura 14. Un nuevo modelo de ratón con esteatohepatitis no alcohólica que presenta resistencia a la insulina. Las pruebas de HOMA e ITT muestran que los ratones sometidos a una dieta enriquecida con CLA presentan resistencia a la insulina y una menor fosforilación en la Thr³⁰⁸ de Akt, lo cual fue analizado mediante western blot (Adkins Yuriko, et al. 2013).

Diferentes reportes han mostrado que CLA incrementa la transcripción de genes involucrados en la captación de ácidos grasos en el hígado y en la lipogénesis. Por su parte, el isómero *trans-10, cis-12-CLA* ha sido involucrado en la inducción de esteatosis hepática, y se ha asociado estrechamente con la patogénesis de la resistencia a la insulina en el tejido hepático. Se conoce que la acumulación de diacilglicerol y triglicéridos, contribuye de forma importante en la evolución de esta patología, e induce la activación de otras vías que desencadenan la activación de proteínas como PKC, además de inducir el proceso de gluconeogénesis hepática. Existen escasos estudios con respecto al papel de CLA en dichas alteraciones. Uno de los más relevantes es el reportado por Belury et al, en donde ratones C57Bl/6 fueron alimentados con una dieta suplementada con la mezcla de ambos

isómeros de CLA, *trans-10, cis-12-CLA* 38.5% y *cis-9, trans-11-CLA* 36.9% durante 6 semanas, grupo en el cual fueron encontrados niveles séricos elevados de glucosa en comparación con el grupo control, además de un mayor nivel de expresión de enzimas gluconeogénicas. Al evaluar la deposición de lípidos en el tejido hepático, los resultados obtenidos fueron niveles de triglicéridos mayores al 77% y de diacilglicerol de más del 169% del grupo con el tratamiento de CLA con respecto al grupo control sometido a una dieta alta en grasa. Como parte final de este trabajo, fue evaluada la translocación a la membrana plasmática de PKC ϵ , efecto asociado a su activación, encontrando en el grupo con el tratamiento de CLA un incremento en la activación de PKC ϵ de casi dos veces más con respecto al grupo control (Belury, et al. 2011) **(Figura 15)**. Estos resultados sugieren un mecanismo molecular adicional con respecto a las acciones de CLA en la inducción de resistencia a la insulina en el tejido hepático. Por otra parte, la activación de PKC ϵ inducida por ácidos grasos saturados, se ha relacionado con la disminución de la fosforilación en tirosinas del IRS y la expresión del IR en modelos celulares de adipocitos y hepatocitos (Dasgupta, et al. 2011) Sin embargo se desconoce si en el tejido hepático CLA puede inducir resistencia a la insulina a través de este mecanismo.

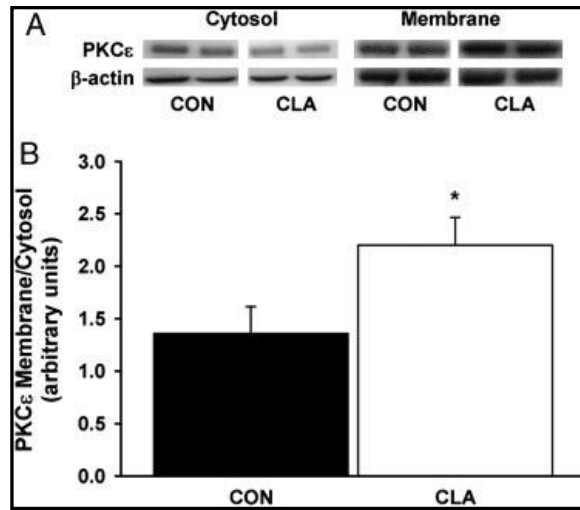


Figura 15. La esteatosis hepática inducida por CLA es acompañada por la acumulación de DAG y la activación de PKCε en ratones. Incremento en la proporción membranal-citosólica como marcador de activación de PKCε posterior al tratamiento con CLA en ratones obesos, efecto vinculado con el mecanismo de acción de este ácido graso en la generación de estados de resistencia a insulina en el hígado (Belury, et al. 2011).

III.JUSTIFICACIÓN

A la fecha las estrategias de salud pública no han resultado ser del todo exitosas en la reducción de la prevalencia de diabetes en la población, por lo que intervenciones a través de la alimentación que logren atenuar la severidad de esta patología dentro del contexto de obesidad, son requeridas. La alteración en la composición de los ácidos grasos en la dieta podría participar en estos estados; mientras que dietas ricas en ácidos grasos saturados desensibilizan la respuesta de tejidos periféricos a la insulina, los ácidos grasos poliinsaturados contrarrestan este efecto. El papel de los isómeros de CLA en sus efectos anti-inflamatorios y en la alteración de la grasa corporal, hacen al CLA un candidato importante para el tratamiento dietético en estados de resistencia a la insulina. Múltiples hallazgos con respecto al papel que ejerce CLA en estados de resistencia a la insulina son controversiales. Los efectos antiinflamatorios y antidiabéticos reportados en tejido adiposo y muscular con respecto a este ácido graso, han sido propuestos como isómero-específico, siendo el isómero *cis-9, trans-11-CLA*, el responsable de disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias y de promover mayor sensibilidad a la insulina, mientras que el isómero *trans-10, cis-12-CLA* ha mostrado tener una respuesta contraria. La mezcla comercial de ambos isómeros ha mostrado tener efectos variables en la respuesta a insulina, lo cual depende de la condición fisiológica de cada individuo, así como de la dosis y duración del tratamiento. En la actualidad, la mezcla es administrada como suplemento alimenticio y es utilizada principalmente por su capacidad de reducir el porcentaje de grasa corporal en los individuos. Fue aprobada en el año 2008 por la FDA

como un suplemento seguro para el consumo humano; sin embargo, diversos efectos negativos se han encontrado posterior a la ingesta de ésta, por lo que resulta de gran importancia e interés, conocer los efectos que los isómeros de CLA de forma individual, así como de la mezcla de este podrían tener, en especial en el tejido hepático, ya que la evidencia existente en éste tejido con respecto a los mecanismos moleculares relacionados con los efectos de sensibilidad y resistencia a la insulina son escasos y poco claros, por lo cual resulta importante esclarecer el papel de estos ácidos grasos en este tejido.

IV.HIPÓTESIS

Los isómeros *cis-9, trans-11* y *trans-10, cis-12* del ácido linoleico conjugado (CLA) disminuirán los niveles de fosforilación y expresión del receptor de insulina y sus proteínas blanco, a través de un mecanismo que involucra la participación de la proteína cinasa C ϵ en células hepáticas.

V.OBJETIVO GENERAL

Se evaluó el efecto de los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*, en la vía de señalización de insulina, a través de la identificación del estado de activación del receptor y de sus proteínas blanco en células de origen hepático.

VI.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la respuesta a insulina por el tratamiento de los ácidos grasos *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* a través de:

- Ensayos de dosis-respuesta para conocer los niveles de fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³.
- Cursos temporales de 24 hasta 60 horas para evaluar los niveles de fosforilación de la cinasa Akt y uno de sus principales blancos GSK-3.

Conocer el nivel de activación y expresión del receptor de insulina por el efecto de los isómeros de CLA, por medio de la evaluación fosforilación en tirosinas y el total de proteína del receptor y de su sustrato.

Evaluar los niveles de fosforilación en residuos de Ser de IRS, específicamente en las Ser³⁰⁷ y Ser⁶¹², como un posible mecanismo de resistencia a la insulina asociado a los efectos de los isómeros de CLA.

Determinar la participación de **PKCε** como un posible blanco de las acciones de los isómeros de CLA a través de:

- La fosforilación de esta proteína en el residuo de Ser⁷²⁹.
- Realizar ensayos de transfección para llevar determinar su sobreexpresión, utilizando las construcciones wild type y dominante negativa de esta proteína.

Conocer si ambos isómeros de CLA promueven la acumulación de lípidos intracelulares en nuestro modelo celular, por medio de ensayos de microscopia confocal y microscopia electrónica de transmisión.

VII. METODOLOGÍA

VII.I Cultivo celular

Para el presente trabajo de tesis, se utilizaron células C-9 (ATCC- CRL1439) cuyo origen es de tejido hepático normal de ratas macho de 4 semanas de edad “Sprague-Dawley”, con morfología epitelial. Las células C9 fueron mantenidas en medio Ham’s F-12K suplementado con 10% de suero fetal bovino, 250 ng/ml de anfotericina, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 UI/ml de penicilina, en una incubadora de atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y temperatura de 37 °C.

VII.II Diseño experimental

VII.II.A Cursos temporales cortos

Con el objetivo de determinar los efectos de los isómeros del CLA en la respuesta a insulina, se evaluaron los siguientes tiempos:

- 5, 15, 30, 60 minutos.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente forma:

- Una vez obtenida una confluencia celular al 80%, se realizó un cambio de medio de cultivo (1% suero, 1% BSA), antes de llevar a cabo el primer estímulo.
- Para cada experimento, los estímulos se realizaron con una concentración de 50 µM con los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* y la mezcla de CLA y 10 nM de insulina durante los tiempos antes mencionados.

VII.II.B Ensayos de concentración-respuesta

- Para los ensayos de concentración-respuesta los estímulos se efectuaron con las siguientes tres concentraciones: 10, 25 y 50 μM , con los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA*, *trans-10*, *cis-12-CLA* y la mezcla de CLA, durante 24 horas.

VII.II.C Cursos temporales largos

Se realizaron experimentos de mayor duración con los isómeros de forma individual y de la mezcla en cada uno de los siguientes tiempos: 24, 36, 48 y 60 horas en las células hepáticas C9.

Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente forma:

- Una vez obtenida una confluencia celular al 80%, se realizó un cambio a un medio de cultivo con 1% de suero y 1% de BSA (Libre de ácidos grasos, Sigma Aldrich), antes de realizar los estímulos correspondientes.

VII.III Ensayos de transfección

Para realizar los ensayos de transfección, las células C9 se sembraron en cajas de 6 pozos hasta obtener una confluencia del 70%, posteriormente se lavaron con 1 ml de medio sin suero y se llevó a cabo la preparación de la mezcla de transfección, la cual consistió en 4 μl de lipofectamina 2000 por cada 1.5 ml de medio sin suero, pasados 5 minutos se adicionaron 0.75 μg de DNA de cada plásmido y se incubaron durante 20 minutos. Los plásmidos utilizados fueron las dos construcciones de PKC ϵ , la wild type WT y la dominante negativa DN (Soh Jae-won et al. 1999). Finalmente la mezcla fue añadida a cada uno de los pozos correspondientes para cada experimento. Las células se incubaron durante 6

horas a una temperatura de 37⁰ C con 5 % de CO₂, y posteriormente se llevó a cabo otro cambio de medio con 20% de FBS durante 16 horas; se realizaron los experimentos con la pre-incubación con los isómeros de CLA (50 µM) durante 24 horas, en presencia o ausencia del estímulo con 10 nM de insulina durante 10 minutos.

Procesamiento de las muestras

- Para finalizar cada uno de los experimentos, fueron efectuados lavados con PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) en cada uno de los pozos de las distintas condiciones antes descritas, se realizó el lisado celular de forma mecánica y fueron adicionados 100 µl de Laemli por pozo (SDS- protein gel loading solution 2X Quality Biological, INC β-mercaptoetanol y agua).
- Posteriormente, se llevó a cabo la sonicación de las muestras con los pulsos de 40kHz durante 30 s/muestra (Sonios Vibra Cell TM, Ultrasonic Processor).
- Se realizó el calentamiento de las muestras a 99 °C en agitación a 950 rpm durante 5 minutos (Termomixer Confort Eppendorf).
- Finalmente las muestras se centrifugaron (Minispin plus, Eppendorf) a 14.5 rpm por 5 minutos.

- **Electroforesis**

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6, 8 y 10% durante 1hr 30 min a 120 V.

- **Electrotransferencia Semiseca**

Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF, durante 1hr a 15 V.

Se colocaron los anticuerpos primarios en cada una de las membranas, a 4°C durante toda la noche, los cuáles serán descritos más adelante (ver **tabla 2**).

Se llevaron a cabo tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween (Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween al 0.1%/ pH 7.5).

Se realizó la incubación con cada uno de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) a cada membrana, durante 1 hr a temperatura ambiente indicados en la **tabla 2**.

Electrotransferencia Húmeda

Las proteínas de mayor peso molecular (IR e IRS) fueron transferidas a membranas PVDF a 0.3 mA durante 1 hr con 30 minutos, en un buffer de transferencia Tris-base 19.81 mM, glicina 189.15 mM, metanol 20%, SDS al 0.01%.

Se efectuó el bloqueo de cada una de las membranas con albúmina sérica de bovino-BSA al 3% EB TBST (Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween al 0.1%/ pH 7.5) a 4°C durante toda la noche en agitación. Se colocaron los anticuerpos primarios en las membranas ya transferidas durante 2 hr a temperatura ambiente, mismos que son descritos en la **tabla 2**.

Se llevaron a cabo tres lavados de las mismas 10 minutos cada uno con TBS-Tween (Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween 20 0.1%/ pH 7.5).

Se realizó la incubación de cada membrana, con cada uno de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), durante 2 hrs a temperatura ambiente.

Se llevaron a cabo tres lavados de las membranas 10 minutos cada uno con TBS-Tween (Tris Base 20 mM, NaCl 137 mM y Tween 20 0.1%/ pH 7.5).

Para la detección de los anticuerpos en las membranas, se utilizó el kit de quimioluminiscencia ECL (Enhanced chemiluminescence reagent, Amersham Biosciences).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpos primarios	Concentración	Compañía	Anticuerpos secundarios	Compañía
pAkt Thr308	1:3000	Cell Signaling Technology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
pAkt Ser473	1:6000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:6000 Sta. Cruz Biotechnology
pIRS Tyr632	10 µl/5ml	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
pIR Tyr1158	3.3 µl/5ml	Thermo Fischer Scientific	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
Akt	1:6000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:8000 Sta. Cruz Biotechnology
pGSK3 Ser21/9	1:3000	Cell Signaling Technology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
GSK3	1:8000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-ratón	1:8000 Sta. Cruz Biotechnology
IRS	1:1000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
IR	1:1000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
pPKCε Ser729	1:3000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-cabra	1:5000 Jakson
PKCε	1:6000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:8000 Sta. Cruz Biotechnology
pIRS Ser612	1:3000	Cell Signaling Technology	HRP anti-ratón	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
pIRS Ser307	1:3000	Sta. Cruz Biotechnology	HRP anti-conejo	1:5000 Sta. Cruz Biotechnology
Actina	1:10000	Dr.J. M. Hernández, Depto. Biología Celular, CINVESTAV.	HRP anti-ratón	1:15000 Sta. Cruz Biotechnology

VII.IV Tinción de lípidos intracelulares con rojo oleoso

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos con cubreobjetos hasta alcanzar una confluencia del 70% durante dos días, posteriormente se realizó el cambio de medio a 1% BSA y 1% de FBS y se estimularon las células durante 48 horas con los isómeros de CLA y con LA durante 24 y 48 horas. Para el montaje de las laminillas se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se lavaron las células con PBS 1X.
- Se realizó la fijación de éstas con 3.7% de paraformaldehído durante 30 minutos.
- Se hicieron 3 lavados con PBS 1X por 2 minutos en agitación cada uno.
- Se adicionó el rojo oleoso durante 5 minutos en agitación leve, en condiciones de oscuridad.
- Se hicieron 5 lavados en agitación con PBS 1X, durante 2 minutos cada uno de ellos.
- Finalmente se montaron las laminillas en portaobjetos con 10 μ l de Vectashield con Dapi (Vector Laboratories, Inc) y finalmente fueron observadas en el microscopio confocal Zeiss.

Análisis de datos

Western Blot

Para el análisis estadístico se analizaron al menos tres experimentos independientes, y se efectúa la cuantificación de los Western Blot, por medio del programa Image J (National Institute of Health Imaging software).

Los datos obtenidos se reportan como unidades arbitrarias de la Σ pixeles – Σ fondo +- error estándar y se reportan como el % del estímulo empleado.

Para la evaluación de las diferencias estadísticas, los datos se analizan mediante pruebas de ANOVA post-hoc de Dunnett del programa de estadística Graphpad Prism 5.0.

Se consideran diferencias significativas, cuando la probabilidad de la hipótesis nula son menores al 5% $p < 0.05$.

Ensayos de microscopía confocal

La cuantificación de la fluorescencia se llevó a cabo mediante el uso del programa Image J (National Institute of Health Imaging software), se delimitó el área de cada una de las células de 3 experimentos distintos. Se calculó el valor total de fluorescencia a través de la CTCF por sus siglas en inglés (Integrated Density – (Area of selected cell X Mean fluorescence of background readings), para obtener el valor de fluorescencia corregida de cada célula (la cual consiste en la diferencia entre el valor de la densidad integrada y el fondo de fluorescencia por cada área seleccionada) y finalmente posteriormente se realizó el análisis estadístico en el programa Graph Prism 5.

VII.V Microscopía Electrónica de Transmisión

Las células se sembraron en cajas con cubreobjetos hasta alcanzar una confluencia del 80% durante dos días, posteriormente se realizó el cambio de medio a 1% BSA y 1% de FBS. Las células se estimularon durante 24 horas con

los isómeros de CLA a una concentración de 50 μ M, el procesamiento de las muestras fue llevado a cabo de la siguiente forma:

- Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con glutaraldehído al 2.5% durante 1 hora. Posteriormente fueron post-fijadas con 1% de OsO₄ por 1 hora a 4°C.
- Subsecuentemente, las preparaciones fueron deshidratadas con concentraciones elevadas de etanol y embebidas en resinas Spur's (Electron Microscopy Sciences, Washington, DC) y polimerizadas a 60°C durante 48 horas.
- Las secciones fueron obtenidas con ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung Wien, Austria) y fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato.
- Posteriormente fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 (JEOL LTD, Japan).

VIII. RESULTADOS

VIII.I Evaluación del estado de activación de Akt por efecto de CLA en las acciones de la insulina

La insulina es una hormona con una importante participación en procesos metabólicos como los que ocurren en el hígado, en donde participa estimulando la síntesis de glucógeno e inhibiendo la glucogenólisis, ambas acciones dependientes de la actividad de Akt (Saltiel Alan R., Kahn C. 2001) La gluconeogénesis es inhibida posterior a la fosforilación/inhibición del factor de transcripción FoxO1, un inductor de genes PEPCK y G6Pasa y blanco de esta cinasa⁸⁰. Además, Akt también induce la síntesis de glucógeno fosforilando e inhibiendo a GSK3 (Lawrence JC, Roach PJ. 1997), siendo así Akt, una proteína clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa en el hígado.

Se conoce que la insulina induce la activación de Akt por la fosforilación de los residuos Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸ lo cual genera su máxima activación, en células hepáticas C9⁸². Se ha descrito la implicación funcional de cada uno de estos sitios de fosforilación, asociados a procesos distintos: mientras que la Thr³⁰⁸ favorece la incorporación de glucosa y aquellas acciones de insulina asociadas a sus funciones metabólicas, la fosforilación de la Ser⁴⁷³ parece participar en la activación de proteínas que promueven la proliferación y crecimiento celular⁸³⁻⁸⁶. Por la implicación que tiene cada uno de los residuos de forma separada, se llevó a cabo la determinación del efecto de los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*,

cis-12-CLA, así como de la mezcla de CLA en el estado de fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸.

Existe evidencia referente a que los efectos del isómero *trans-10, cis-12-CLA* y de la mezcla de CLA, son ejercidos a través de GPR's identificados en tejidos pancreático y adiposo (Schmidt, J, et al. 2011, Malinska, H, et al. 2015) se conoce que la activación de este tipo de receptores ocurre en tiempos rápidos (minutos), por lo cual consideramos importante realizar este experimento, sin embargo; no encontramos efectos en la respuesta a insulina por parte de ninguno de los dos isómeros, ni de la mezcla de CLA en nuestro modelo de estudio (datos no mostrados), por lo cual descartamos la posibilidad de que CLA lleve a cabo sus acciones a través de receptores de membrana como los GPR's.

Los primeros análisis, se realizaron con la preincubación de los isómeros y la mezcla de CLA durante tiempos cortos, de 5 a 60 min con los isómeros y la mezcla de CLA y una incubación de 10 minutos con insulina 10 nM. Fueron evaluados los niveles de fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³; sin encontrar cambios en la activación de Akt por efecto de los isómeros ni de la mezcla de CLA (datos no mostrados).

Debido a los resultados anteriores y a los antecedentes existentes con respecto a las implicaciones del tratamiento de CLA en la respuesta a insulina en múltiples estudios a largo plazo, fue decidido determinar los efectos del tratamiento crónico de los isómeros de CLA en las acciones de la insulina en la línea celular hepática C9. Se utilizaron tiempos de incubación con ambos ácidos grasos y con la mezcla durante 24 hasta 60 horas, junto con 10 nM de insulina

durante 10 minutos y fueron determinados los niveles de fosforilación de Akt en la Thr³⁰⁸ y la Ser⁴⁷³.

Por su parte, la fosforilación en el residuo de Ser⁴⁷³, únicamente fue afectada por el isómero *trans-10, cis-12-CLA* en todos los tiempos de incubación **figura 17 B**, mientras que con el isómero *cis-9, trans-11-CLA* únicamente se observa una reducción estadísticamente significativa en los niveles de fosforilación de este residuo hasta las 60 horas (**Figura 17 A**). Como se observa en la **figura 18 A-C**, ambos isómeros y la mezcla de CLA mostraron una reducción significativa en los niveles de fosforilación del residuo de Thr³⁰⁸ en una forma dependiente del tiempo. Los efectos en la reducción del nivel de fosforilación de Akt por parte de la mezcla y sus isómeros, no podrían ser explicados por la degradación de Akt, ya que los niveles de expresión de esta proteína no se vieron afectados. Los hallazgos encontrados hasta el momento, con respecto al isómero *trans-10, cis-12-CLA*, confirman los reportes por otros grupos de estudio en cuanto a que éste promueve resistencia a la insulina, sin embargo; nuestros resultados muestran que el isómero *cis-9, trans-11-CLA* y la mezcla de CLA también tienen una participación importante en la desensibilización de la señal de insulina.

Figura 17

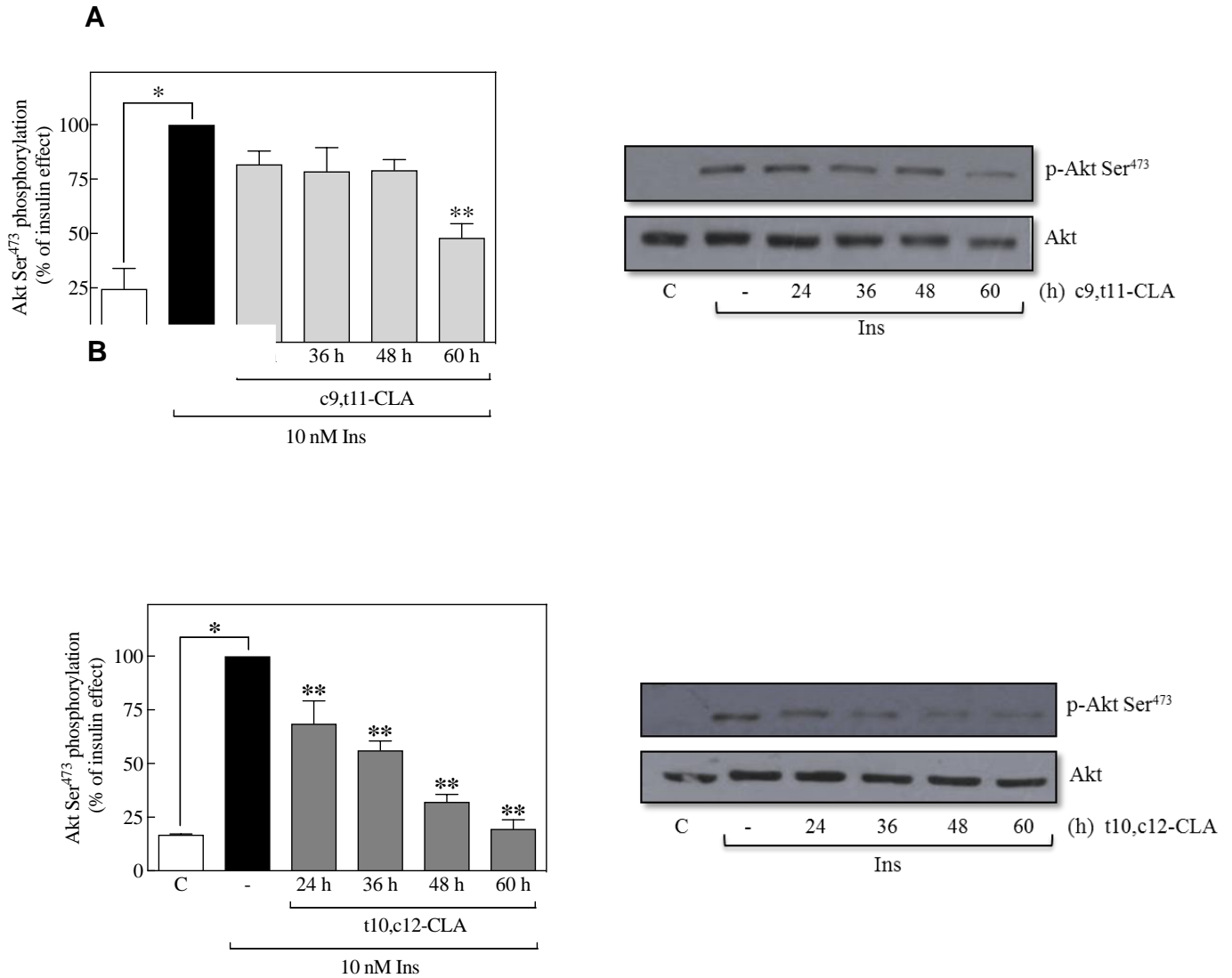


Figura 17. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante el tratamiento. Se utilizaron los isómeros de CLA de forma independiente *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) en una concentración de 50 μ M durante 24 hasta 60 horas e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt-Ser⁴⁷³. La cantidad de proteína total fue Akt. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto a insulina.

Figura 18

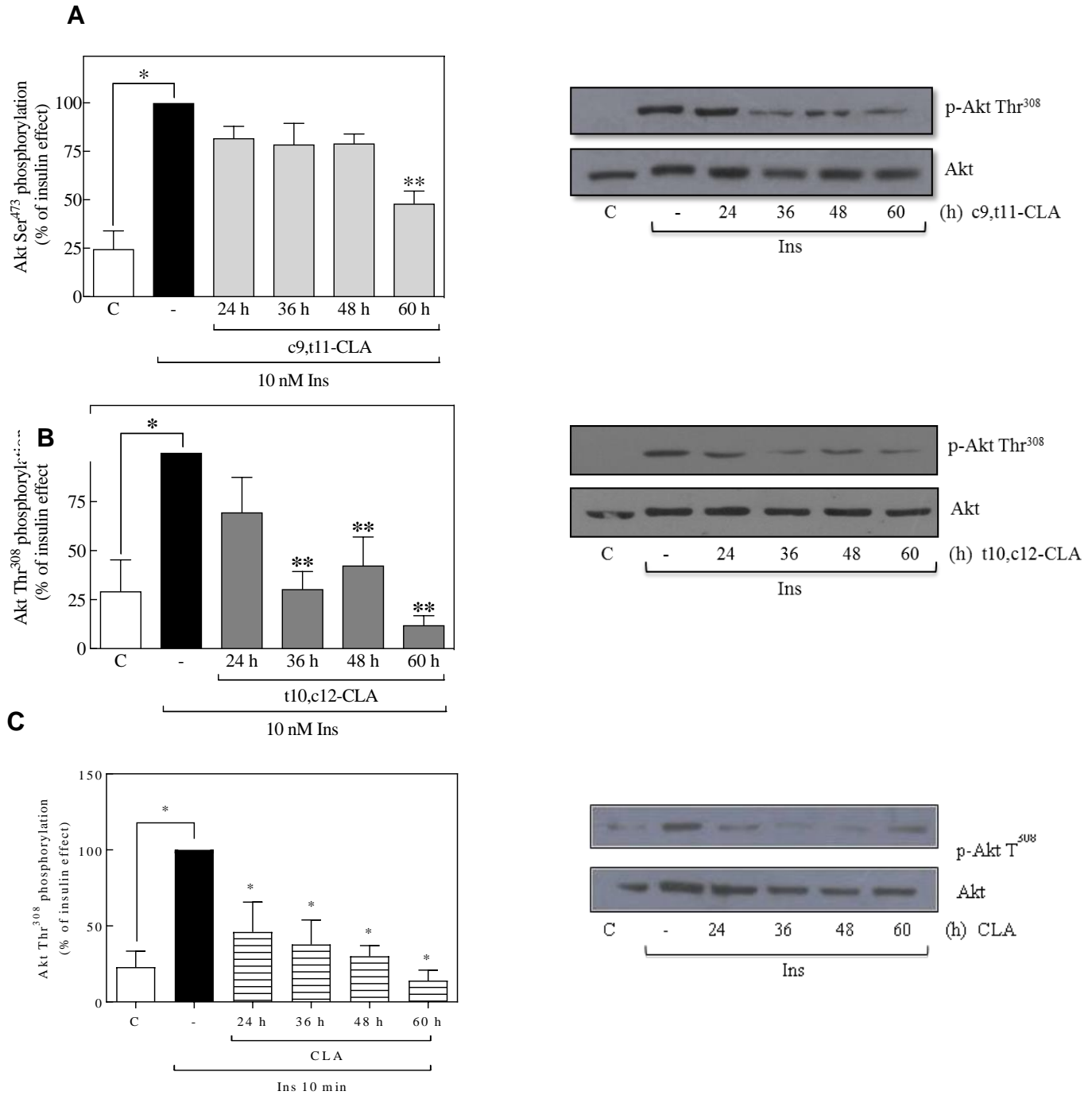


Figura 18. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) y la mezcla (C) de CLA de forma independiente, en una concentración de 50 μ M e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo, en tiempos de 24, 36, 48 y 60

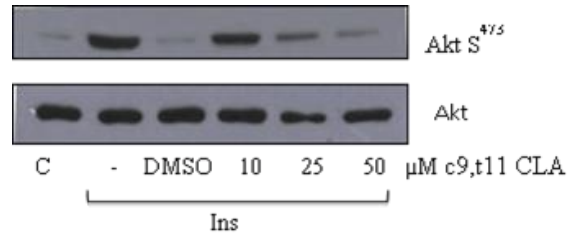
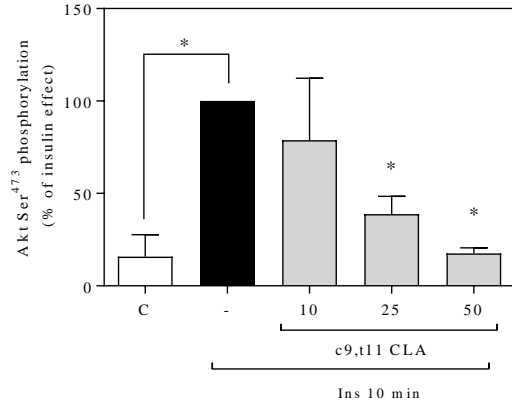
horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo de Akt Thr³⁰⁸. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-Akt 1/2/3. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto a insulina

VIII.II Evaluación de la respuesta a insulina por efecto de los isómeros de CLA a través de ensayos de concentración- respuesta

Para evaluar los efectos de los isómeros de CLA en la respuesta ante insulina, fueron realizados ensayos de concentración-respuesta con cada uno de estos ácidos grasos. Fue determinada la fosforilación de la cinasa Akt, utilizando concentraciones crecientes de lípidos que consistieron de 10, 25 y 50 μM durante 24 horas y una concentración de 10 nM de insulina durante 10 minutos. Tal y como se puede observar en la **figura 19 A y B**, ambos isómeros de CLA disminuyen los niveles de fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ inducido por insulina, en concentraciones de 25 y 50 μM ; datos que son consistentes con respecto al curso temporal realizado anteriormente en donde se observaron efectos negativos por parte de ambos isómeros de CLA en la activación de esta proteína en una concentración de 50 μM .

Figura 19

A



B

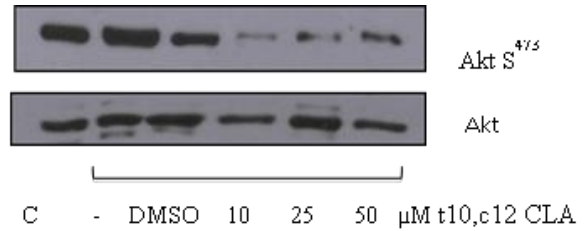
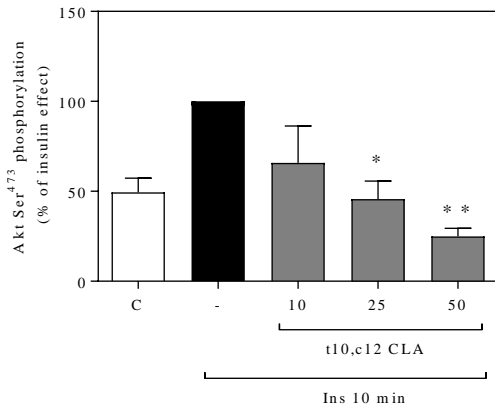


Figura 19. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) de CLA de forma independiente en concentraciones de 10, 25 y 50 μM e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo, en 24 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt-Ser⁴⁷³. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-actina. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto a insulina.

VIII.III Evaluación del estado de activación del receptor de insulina en la Tyr¹¹⁵⁸ por efecto de los isómeros de CLA

La insulina para poder llevar a cabo sus principales acciones se une a su receptor, el cual es una glucoproteína con actividad intrínseca de cinasa de tirosina, que posee múltiples sitios de fosforilación que regulan su actividad. Fueron evaluados los niveles de fosforilación en el residuo de Tyr¹¹⁵⁸ localizado el dominio de cinasa de esta proteína, uno de los más importantes implicados en su función reguladora y funcional, fueron incubados ambos isómeros de CLA en los mismos tiempos y condiciones que en el experimento anterior.

De forma interesante, se encontró un comportamiento similar por parte de los dos isómeros de CLA, ambos disminuyeron la fosforilación del receptor de insulina en la Tyr¹¹⁵⁸ de una forma dependiente del tiempo de incubación con los dos lípidos, así mismo, no fueron encontrados cambios en los niveles expresión de proteína, efecto consistente con los resultados obtenidos con anterioridad y que confirma la asociación de estos ácidos grasos con la inducción de resistencia a la insulina como se observa en la **figura 20 A y B**.

Figura 20

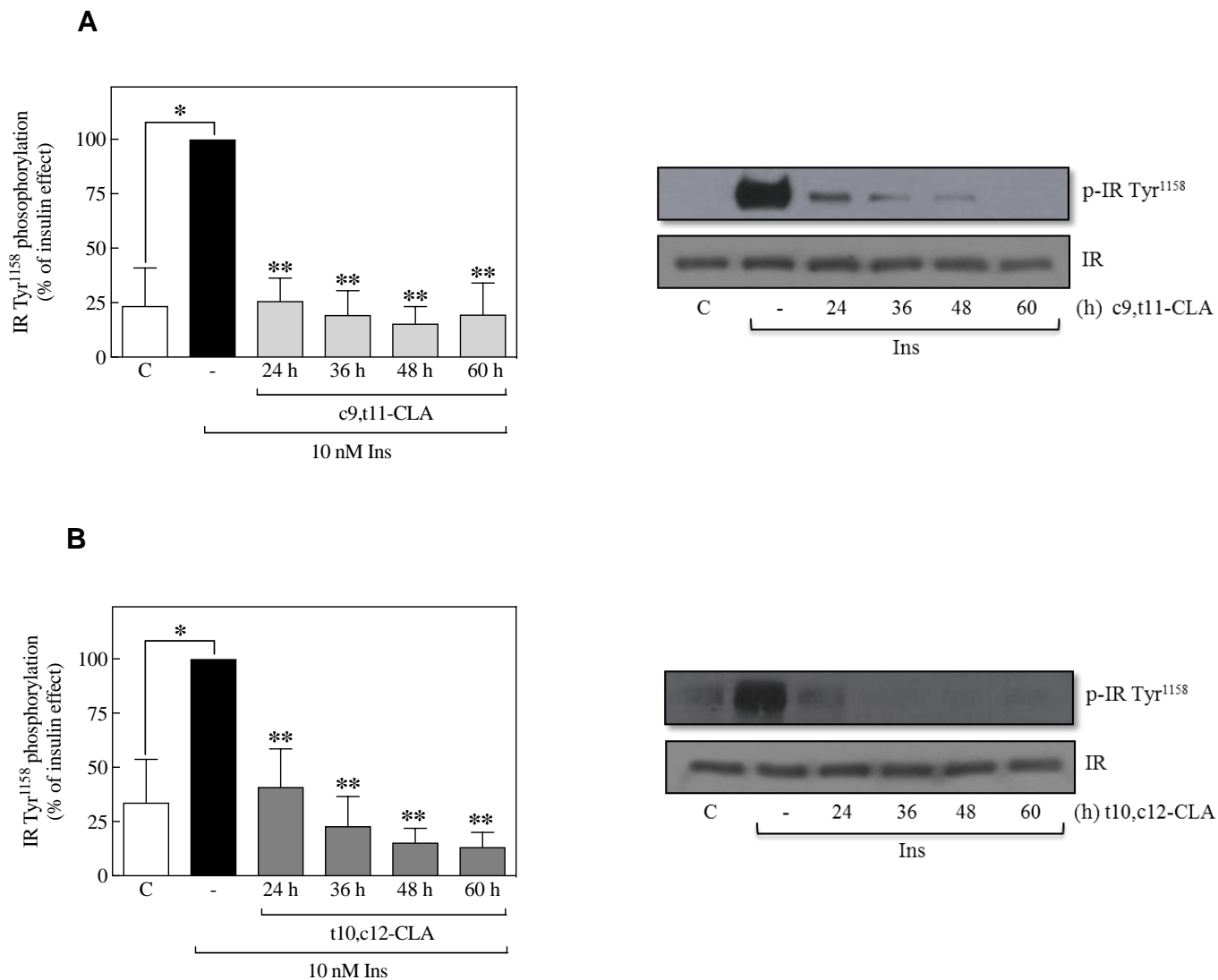


Figura 20. Evaluación del estado de fosforilación del receptor de insulina en la Y¹¹⁵⁸, por efecto de los isómeros de CLA. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizó el isómero de CLA de forma independiente *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) en concentración de 50 μ M e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo, durante 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas

utilizando el anticuerpo anti IR Tyr¹¹⁵⁸. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando IR. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto a insulina.

VIII.IV Papel de los isómeros de CLA en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina en la Tyr⁶³²

Como parte importante en la vía de señalización de insulina, el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) resulta ser una proteína clave en el proceso de activación de otras proteínas. A pesar de que existen 4 isoformas de IRS, la isoforma 1 se expresa en células hepáticas. IRS contiene varios sitios de fosforilación en residuos de tirosina que al ser fosforilados por el receptor de insulina se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K. Fue importante considerar los efectos de CLA en la activación de esta proteína. La Tyr⁶³², es un sitio conocido de fosforilación implicado en la interacción con la subunidad reguladora de PI3K y en la regulación de la actividad de IRS⁸⁷. La preincubación con el isómero *trans-10, cis-12-CLA* disminuyó la fosforilación en la Tyr⁶³² de IRS, efecto que fue dependiente del tiempo, observado en la **Figura 21 A**. Por su parte, el isómero *cis-9, trans-11-CLA* afectó parcialmente la fosforilación de IRS, ya que se encontraron cambios únicamente a partir de las 48 horas de incubación (**Figura 21 B**). La mezcla de CLA mostró tener efectos negativos en la fosforilación de IRS a las 60 horas de pretratamiento (**Figura 21 C**).

Figura 21

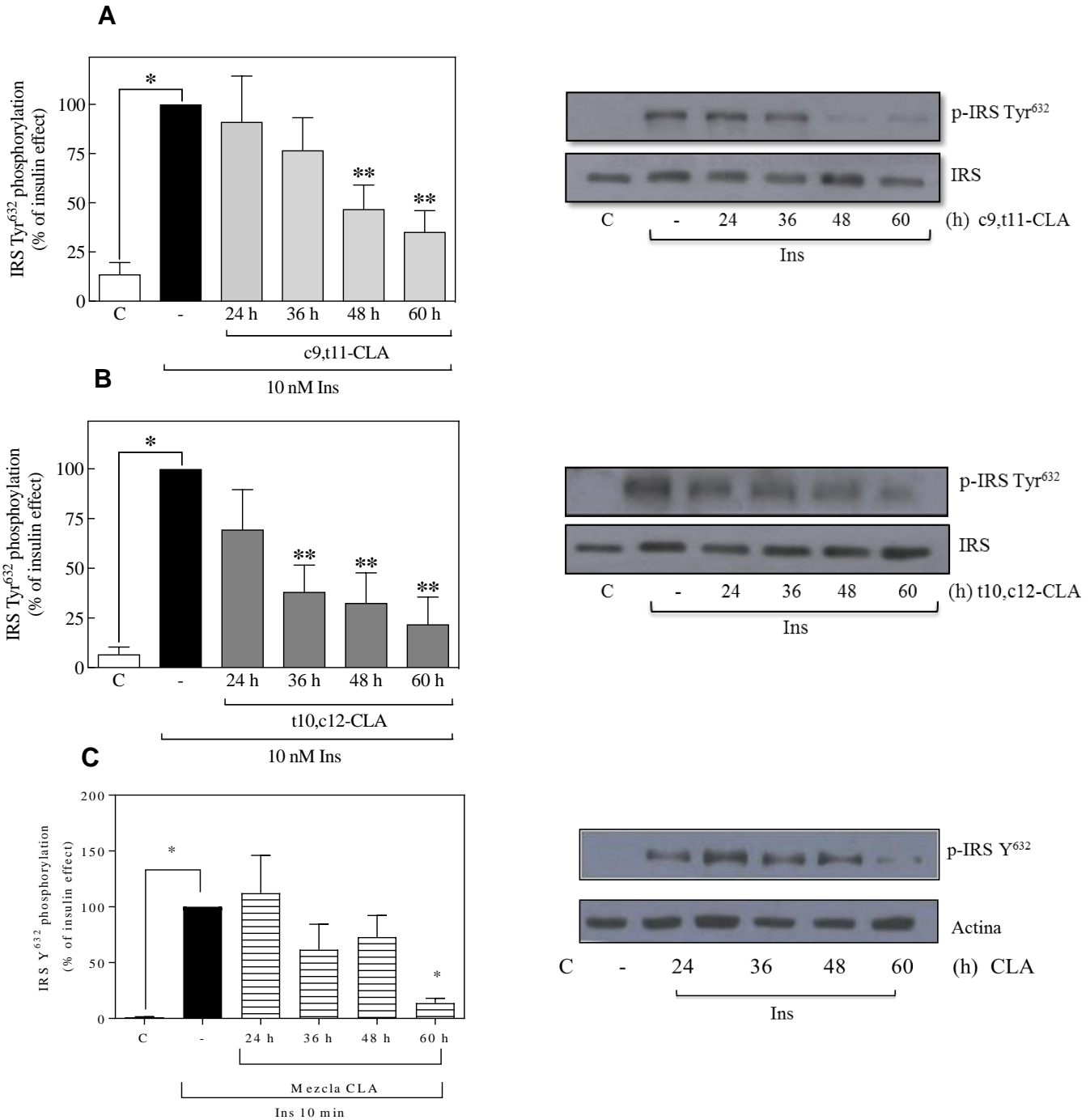


Figura 21. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros de CLA de forma independiente *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) y la mezcla (C) en una concentración de 50 μ M e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo, durante 24,

36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRSTyr⁶³². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando IRS. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto a insulina.

VIII.V Determinación de los efectos de los isómeros de CLA en el estado de fosforilación de GSK-3 en la Ser^{9/21}

La cinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK-3), es una de las proteínas más importantes en la vía de señalización de la insulina, su actividad es regulada negativamente por esta hormona, la inhibición de GSK-3 es mediada por la activación de PI3-K y su proteína blanco Akt; la cual tiene la capacidad de fosforilar en los residuos de Ser⁹ en GSK-3 β y Ser²¹ GSK-3 α , lo que promueve la inhibición de su actividad, importante función que favorece la activación de la glucógeno sintasa, la cual es una proteína involucrada en promover la síntesis de glucógeno en el hígado. Por lo tanto, resultó importante evaluar el comportamiento de cada uno de los isómeros y de la mezcla de CLA en la activación de esta proteína. Ambos ácidos grasos promovieron una menor fosforilación de esta proteína; las acciones del isómero *trans-10*, *cis-12-CLA* fueron dependientes del tiempo, tal y como se observa en la **figura 22 B**; mientras que el isómero *cis-9*, *trans-11-CLA* mostró efectos inhibitorios a partir de las 48 horas de pre-tratamiento (**Figura 22 A**), la mezcla de CLA hasta las 60 horas de incubación presentó este mismo comportamiento, efecto observado en la **figura 22 C**. Resultados que confirman que CLA posee la capacidad de desensibilizar las acciones de la insulina y sus efectores.

Figura 21

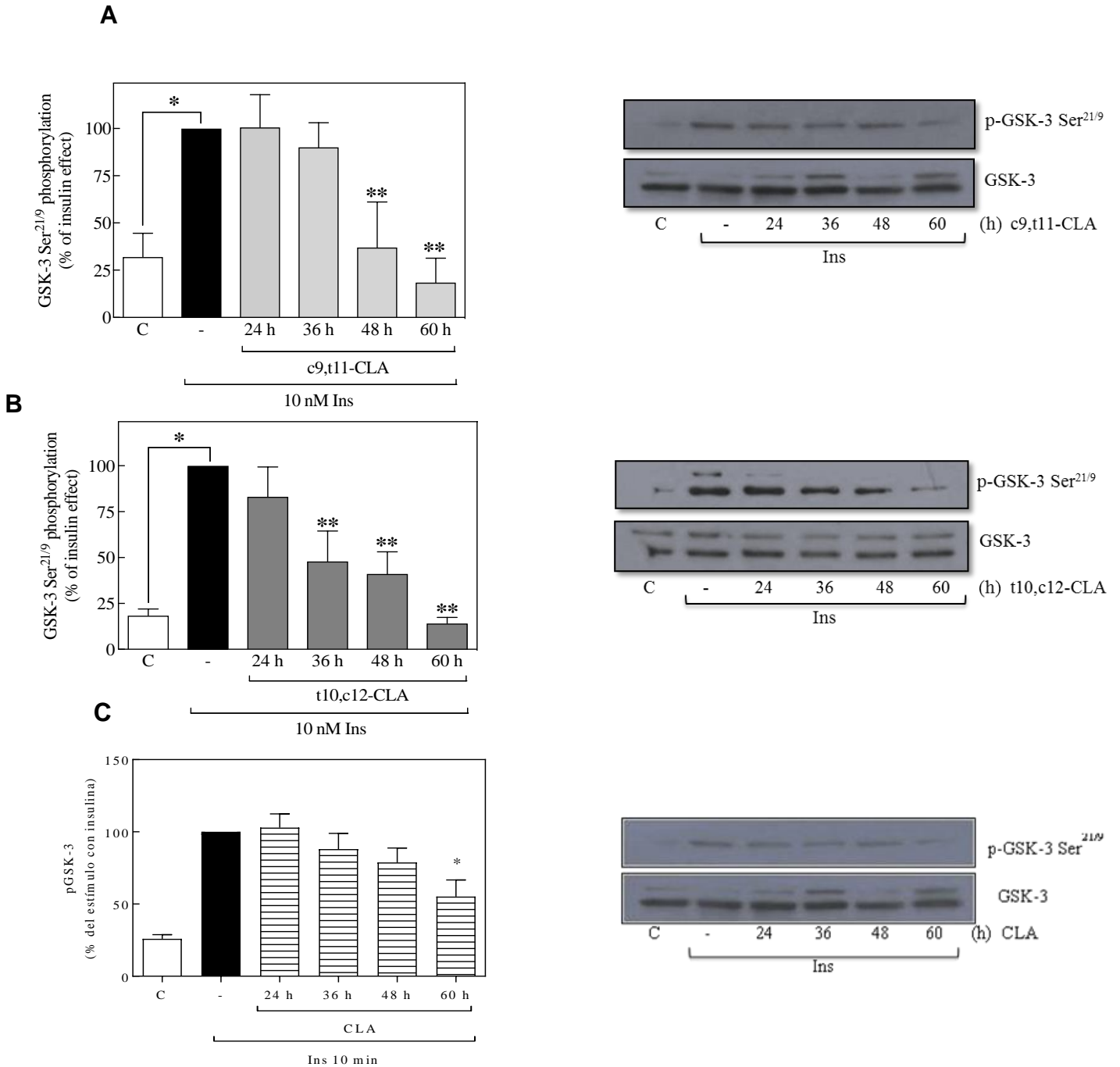


Figura 22. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) y la mezcla (C) de CLA en concentración de 50 μ M e insulina 10 nM por 10 minutos en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti GSK-3 Ser^{21/9}. La

cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti- GSK-3. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto a insulina.

VIII. VI Evaluación de los efectos de los isómeros de CLA en la fosforilación de Akt

Como parte final del trabajo y únicamente como un control de que los isómeros de CLA no activan por sí mismos la vía de señalización de la insulina, se realizaron incubaciones con los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* en una concentración de 50 μM durante 24, 36, 48 y 60 horas con cada uno de ellos, sin estímulo con insulina. Encontramos que ninguno de los dos isómeros de CLA (*cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA*), promueven la fosforilación de Akt en la Thr^{308} , ni en IRS en la Tyr^{632} , tal y como se observa en las **figuras 23 y 24**.

Figura 23

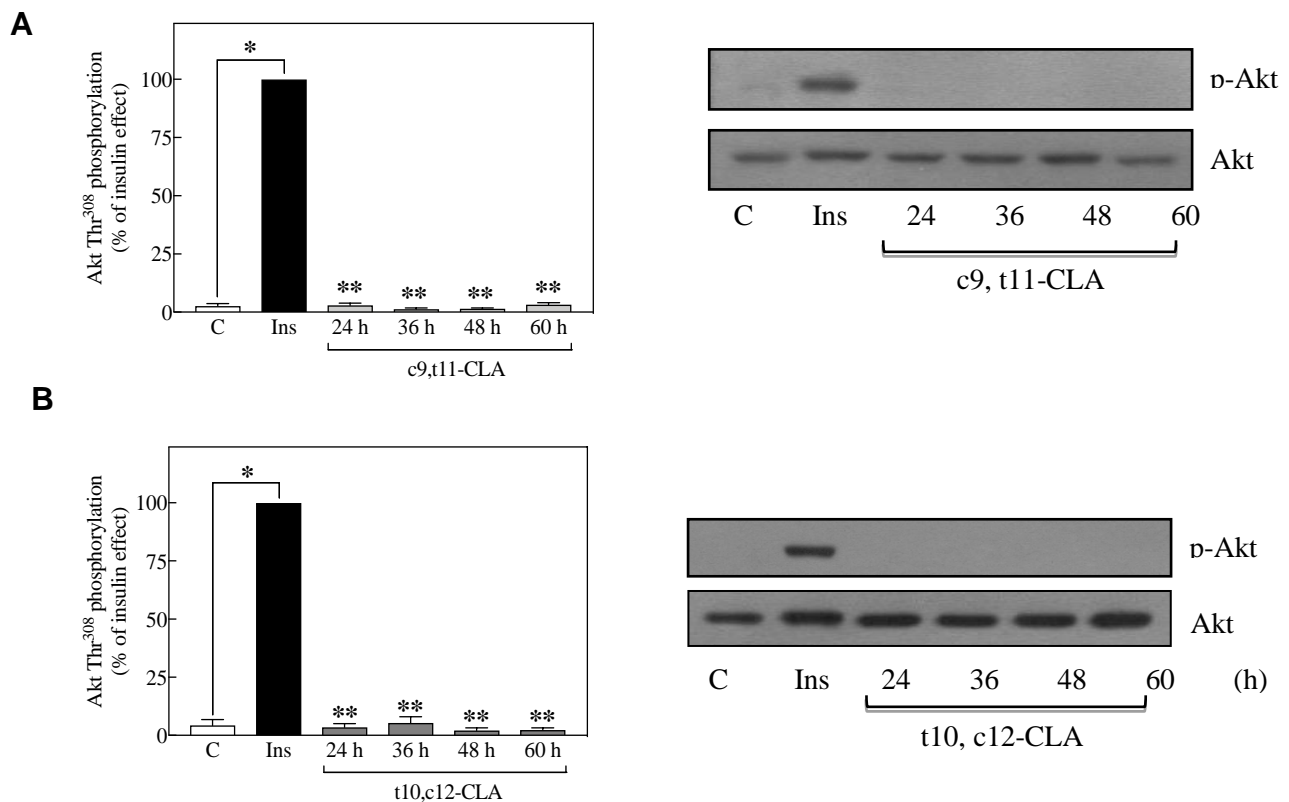


Figura 23. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* en concentración de 50 μM en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las

proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti pAkt Thr³⁰⁸. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-Akt. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con

Figura 24

A

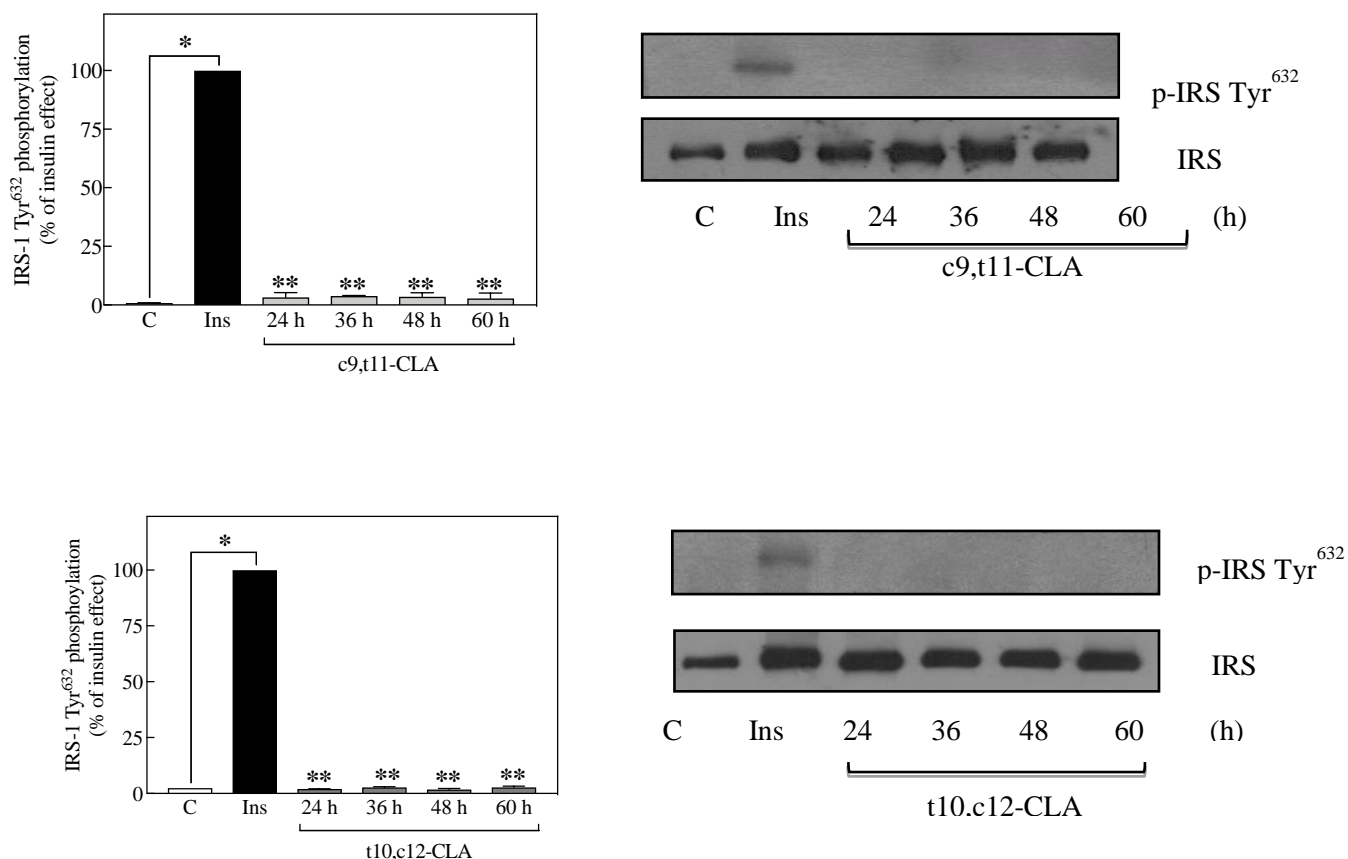


Figura 24. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11* y *trans-10, cis-12 CLA* en concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRS Tyr⁶³². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-IRS. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

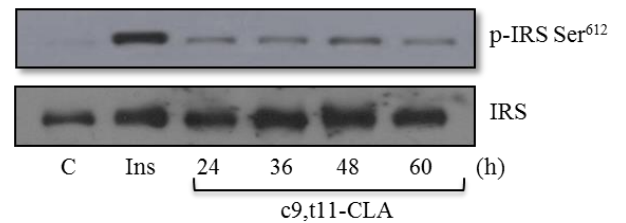
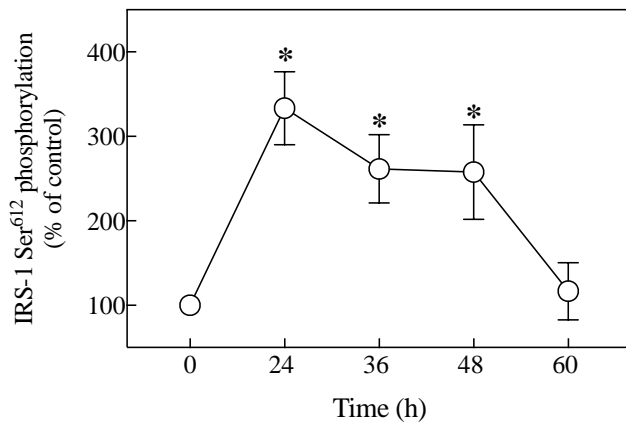
VIII.VII Efecto de los isómeros de CLA en los niveles de fosforilación en Serinas de IRS

Existe evidencia con respecto a que el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel de IRS, es uno de los mecanismos clave en el desarrollo de resistencia a la insulina. La hiperfosforilación de residuos de Ser/Thr en el sustrato

del receptor de insulina, puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en tirosina, disminuir su activación e inducir su degradación, así como reducir su interacción con PI3K, alterando la fosforilación y activación de la cinasa Akt. Diversas condiciones han sido reportadas como las responsables de promover este efecto, destacando al papel de los ácidos grasos libres (Kolesnick, RN, Kronke, M. 1998, Yang, G et al. 2009), los cuales aumentan la actividad de cinasas como varias isoformas de PKC (Li, Y, et al. 2004, Szendroedi, J et al. 2014) entre otras proteínas que pueden ser activadas por efecto de estos, tal y como se mencionó con anterioridad. Entre los sitios fosforilados en residuos de serinas de IRS, la Ser⁶¹² es un residuo que ha sido identificado ser fosforilado por PKC, además de encontrarse en cercanía a un residuo de tirosina en IRS con vital importancia para su asociación con PI3K. Por lo anterior, fue evaluado el nivel de fosforilación en el residuo de S⁶¹² en IRS bajo el tratamiento de ambos isómeros de CLA (*cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10 cis-12-CLA*) durante 24 hasta 60 horas. Fue encontrado un patrón de respuesta distinto de acuerdo al tipo de ácido graso utilizado. Mientras que el isómero *cis-9, trans-11-CLA* alcanza un efecto máximo en la fosforilación de la Ser⁶¹² de IRS en 24 horas de hasta el ~300% (**Figura 25 A**), el isómero *trans-10, cis-12-CLA* muestra un efecto de ~900% en la fosforilación de IRS (**Figura 25 B**), efecto presente posterior a las 24 horas de estimulación y que es mantenido hasta las 60 horas de pretratamiento. Por lo que sugerimos, que las acciones de CLA asociadas a la desensibilización de la respuesta a insulina en nuestro modelo de estudio, podrían llevarse a cabo a través de la fosforilación en residuos de serina de IRS.

Figura 25

A



B

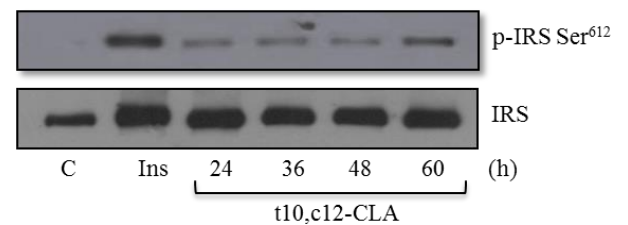
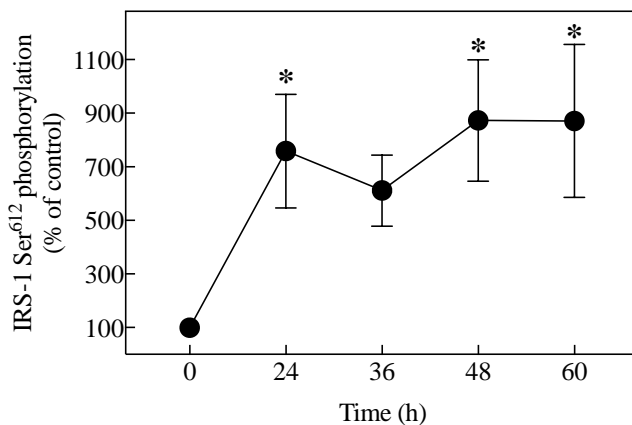
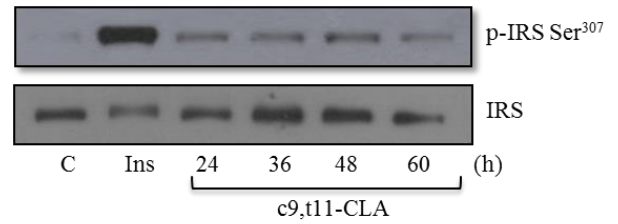
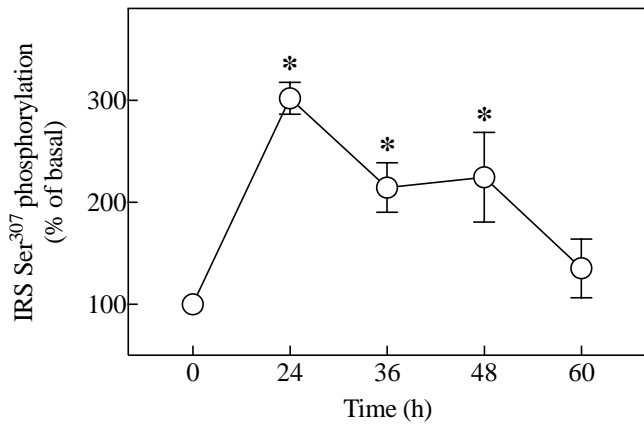


Figura 25. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) de CLA en concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRS Ser⁶¹². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-IRS. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto al basal.

Fue también de particular interés, determinar los efectos de CLA en el residuo de Ser³⁰⁷ de IRS, el cual se ha identificado afecta la asociación entre el receptor de insulina y su sustrato, además de estar implicado en resistencia a la insulina y ser un blanco de cinasas como JNK e IKK β en respuesta a TNF- α . Se realizaron incubaciones con ambos isómeros de CLA durante 24, 36, 48 y 60 horas y fue determinado el nivel de fosforilación en la Ser³⁰⁷ de IRS. Los efectos encontrados con los dos isómeros de CLA fueron similares a los hallados con el residuo de Ser⁶¹² de IRS. Con el isómero *cis-9, trans-11-CLA* se encontró un nivel de fosforilación máximo en 24 horas (~300%) como se observa en la **figura 26 A**, mientras que con el isómero *trans-10,cis-12-CLA* la mayor respuesta de preincubación encontrada fue a partir de 24 horas y fue sostenida hasta las 60 horas (~900%), efecto observado en la **figura 26 B**. A pesar de las diferencias en la temporalidad de ambos ácidos grasos, en la fosforilación en Ser de IRS, es evidente que los dos aumentan de forma muy importante este proceso, el cual podría mostrar un mecanismo adicional a los efectos de CLA en la inducción de resistencia a la insulina.

Figura 26

A



B

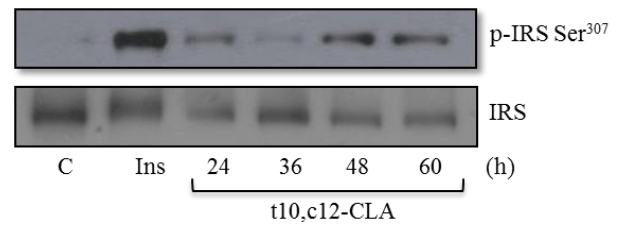
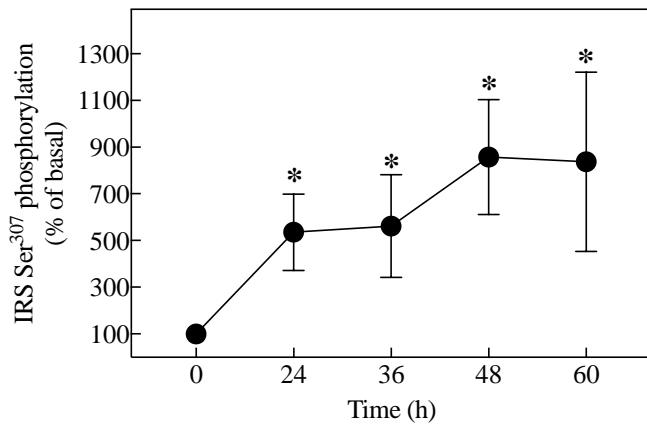


Figura 26. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron *cis*-9, *trans*-11-CLA (A) y *trans*-10, *cis*-12-CLA (B) en concentración de 50 μM en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRS S³⁰⁷. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-IRS. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

VIII.VIII Implicación de PKC ϵ en los efectos de los isómeros de CLA en la regulación de la señalización de insulina en células C9.

Reportes anteriores, han mostrado que la administración de la mezcla de CLA en ratones promueve el aumento en los niveles de diacilglicerol en el hígado, así como la activación de la proteína cinasa C ϵ PKC ϵ . PKC ϵ ha sido reportada como la isoforma predominante en el hígado bajo condiciones de una dieta alta en grasa, se conoce que esta proteína disminuye la fosforilación en tirosinas del receptor de insulina, afectando la capacidad de la insulina de promover la síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis. En ratas obesas y en la línea celular HEPG2 la activación de PKC ϵ fue asociada con la menor expresión del receptor de insulina⁷⁸, por lo que su estudio en el modelo de células hepáticas C9 resultó ser de gran interés como uno de los probables mecanismos moleculares relacionados con los efectos de los isómeros de CLA en la resistencia a la insulina.

Igual que en los experimentos anteriores, los dos isómeros de CLA fueron evaluados en tiempos de 24 hasta 60 horas de incubación y fue determinada la fosforilación en la Ser⁷²⁹ de PKC ϵ residuo presente en el dominio del carboxilo terminal de la proteína, el cual se conoce es importante para su actividad de cinasa. Como se observa en la **figura 27 A** se encontró que el isómero *cis*-9, *trans*-11-CLA promueve la fosforilación de PKC ϵ en la Ser⁷²⁹ de una forma que dependiente del tiempo, alcanzando su efecto máximo a las 48 horas de estimulación (~600%) el cual se sostuvo hasta las 60 horas. Las células tratadas

con el isómero *trans-10, cis-12-CLA*, alcanzaron un pico máximo en 24 horas de incubación (~550%), lo cual disminuyó conforme al tiempo de pretratamiento (**Figura 27 B**). Hallazgos que muestran que ambos ácidos grasos promueven la activación de esta cinasa, aunque la velocidad con la que lo hacen es diferente, los resultados son un indicador de que PKCε puede activarse por efecto de ambos isómeros de CLA.

Figura 27

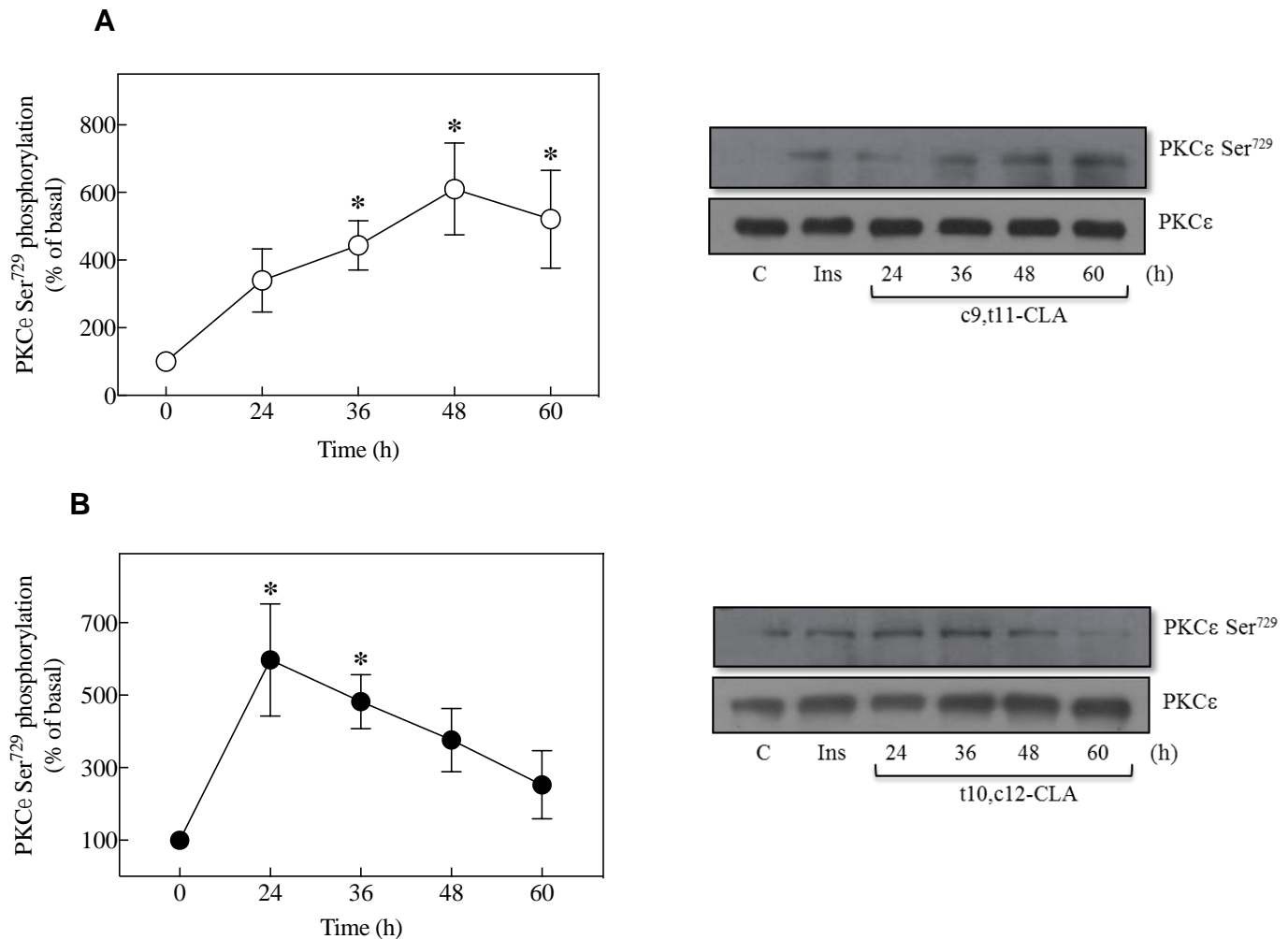


Figura 27. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) de CLA en concentración de 50 μM en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti PKCε Ser⁷²⁹. La cantidad de proteína total fue determinada

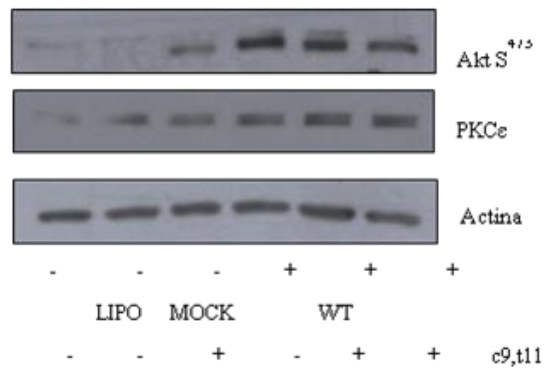
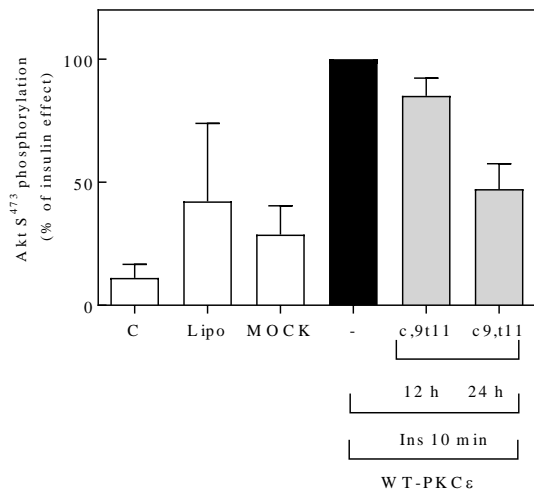
utilizando anti- PKC ϵ . Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

VIII.IX Efecto de los isómeros de CLA en los niveles de fosforilación de Akt en presencia de la sobreexpresión de PKC ϵ

Diversos reportes han evidenciado la mayor expresión de PKC ϵ en pacientes con resistencia a la insulina en el tejido hepático. Con el fin de corroborar el papel de esta proteína en nuestro modelo de estudio, fue decidido llevar a cabo ensayos de sobreexpresión de PKC ϵ . Se utilizaron dos construcciones distintas, la wild type (WT) y la dominante negativa (DN), la cual posee una mutación en el sitio de unión a ATP, lo que determina que esta permanezca inactiva, afectando su actividad de cinasa. Fue evaluada la fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ con PKC ϵ WT, se utilizaron 12 y 24 horas de incubación con los dos isómeros de CLA. En la **figura 28 A y B**, se muestra que durante 24 horas de pretratamiento con ambos ácidos grasos, la reducción en los niveles de fosforilación de Akt fueron mayores que en condiciones de incubación normales, los datos no mostraron significancia estadística, pero con el aumento en el número de experimentos es muy probable encontrar una respuesta consistente en este efecto. Por lo que concluimos, que el observar que la sobreexpresión de la isoforma épsilon de PKC exacerba los efectos de CLA en células hepáticas, lo cual es un indicador de la importante participación de esta proteína en los mecanismos de resistencia a la insulina mediados por este tipo de ácidos grasos.

Figura 28

A



B

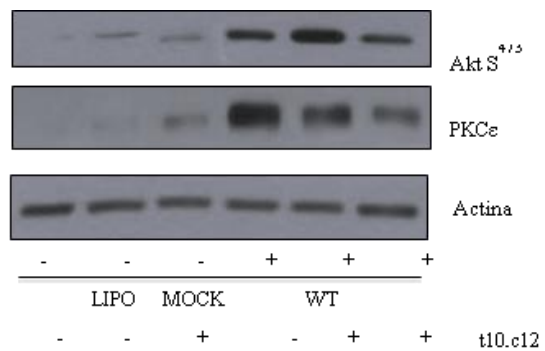
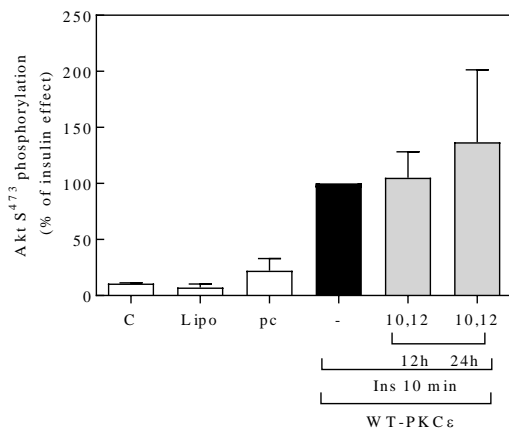
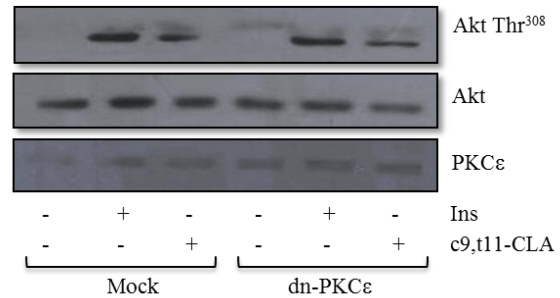
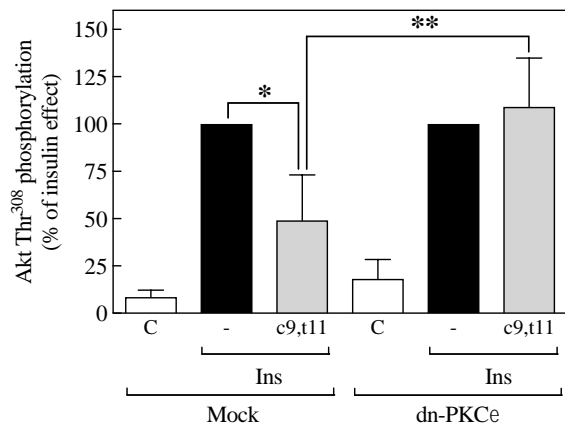


Figura 28. Las células C-9, fueron transfectadas con la construcción WT de PKC ϵ , se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) de CLA en una concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt Ser⁴⁷³. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-actina y el control de sobrexpresión fue anti-PKC ϵ . Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto al basal.

Resultó muy importante e interesante también, evaluar el efecto de la sobreexpresión de la dominante negativa de PKC ϵ junto con los isómeros de CLA en la regulación de la señal de insulina. Se realizaron incubaciones de 24 horas de tratamiento con los dos isómeros de CLA y fue evaluada la fosforilación de Akt en sus dos residuos de activación, la Thr³⁰⁸ y la Ser⁴⁷³. Los efectos negativos durante 24 horas de preincubación con ambos isómeros de CLA (*cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*) en la fosforilación inducida por insulina de la Thr³⁰⁸ de Akt, fueron mejorados en presencia de la construcción de la DN de PKC ϵ (**Figura 29 A y B**). El efecto inhibitorio del isómero *trans-10, cis-12-CLA* en la fosforilación de la Ser⁴⁷³ fue revertido también (**Figura 30 B**). De forma distinta, con el isómero *cis-9, trans-11-CLA*, no se observaron cambios en los niveles de fosforilación en la Ser⁴⁷³, en presencia de la dominante negativa de PKC ϵ (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que la isoforma épsilon de PKC modula las acciones de los isómeros de CLA en la fosforilación estimulada por insulina de Akt.

Figura 29

A



B

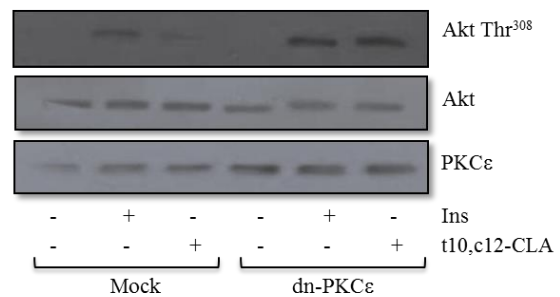
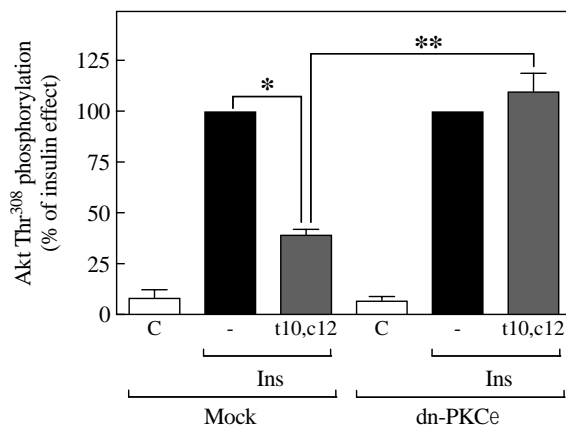


Figura 29. Las células C-9, fueron transfectadas con la construcción DN de PKCε, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) de CLA en una concentración de 50 μM en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt Thr³⁰⁸. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-Akt y el control de sobreexpresión fue anti-PKCε. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

Figura 30

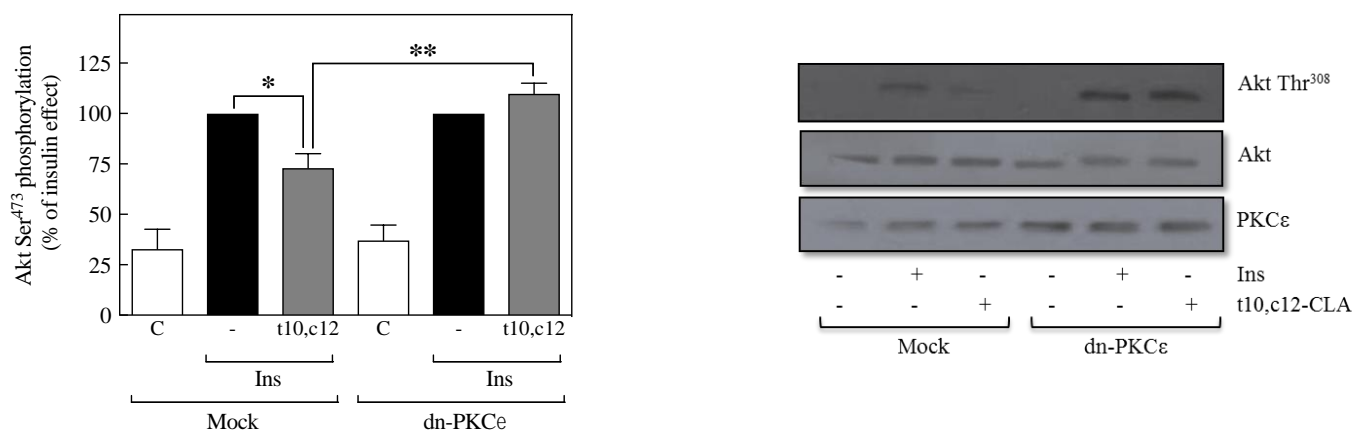


Figura 30. Las células C-9, fueron transfectadas con la construcción DN de PKC ϵ , se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* en una concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt Ser⁴⁷³. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-Akt y el control de sobreexpresión fue anti-PKC ϵ . Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto al basal.

Existe evidencia con respecto a que la activación de PKC puede promover la fosforilación de residuos de Ser en IRS. Con la finalidad de determinar si PKC ϵ forma parte de los mecanismos de los isómeros de CLA en la inducción de resistencia a la insulina, fue examinada la fosforilación en el residuo de Ser⁶¹² de IRS en presencia de la construcción de la DN de PKC ϵ . Como observamos en la **figura 31 A y B**, los ensayos de transfección con la mutante, disminuyen los niveles fosforilación de IRS en la Ser⁶¹² durante 24 horas de pretratamiento con ambos isómeros de CLA. La fosforilación del residuo de Ser⁶¹² de IRS podría tener un papel importante en la activación de PKC ϵ , dato que no ha sido reportado hasta

el momento y que puede modular las acciones de CLA en la señalización de insulina.

Figura 31

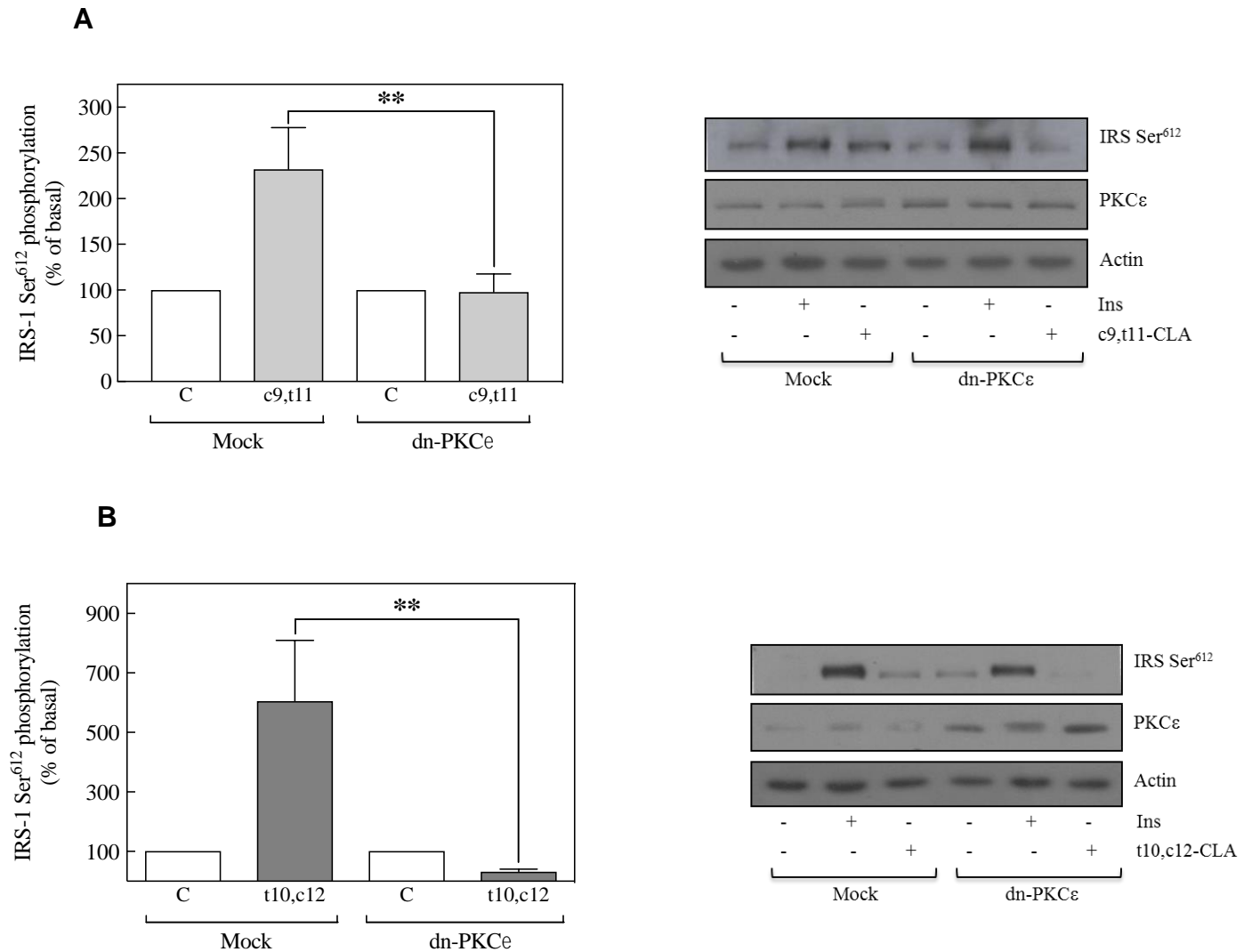


Figura 31. Las células C-9, fueron transfectadas con la construcción WT de PKCε, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* (A) y *trans-10, cis-12-CLA* (B) en una concentración de 50 μM en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRS S⁶¹². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-actina y el control de sobreexpresión fue anti-PKCε. Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

Finalmente, los niveles de proteína de PKC ϵ que fueron sobreexpresados en los ensayos de transfección mostrados con anterioridad fueron cuantificados. Claramente, se observa que existe un incremento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de PKC ϵ en las células transfectadas con respecto a las células control, lo cual fue importante determinar para garantizar la efectividad del ensayo en nuestro modelo (**Figura 32**).

Figura 32

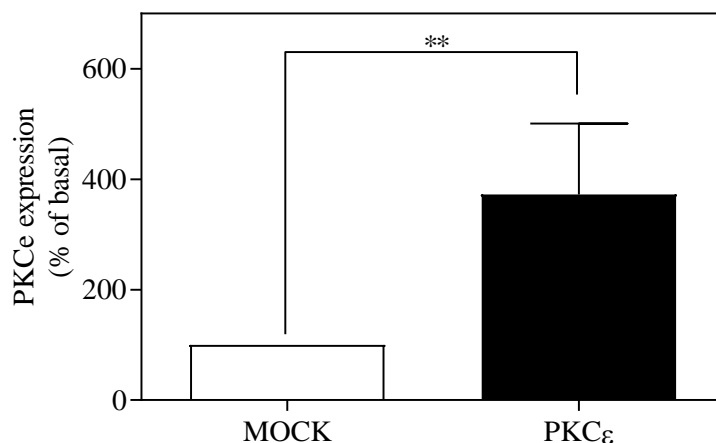


Figura 32 Sobreexpresión de PKC ϵ . Las células C-9, fueron transfectadas con la construcción WT de PKC ϵ , se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizaron los dos isómeros de CLA, *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* en una concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24, 36, 48 y 60 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti IRS Ser⁶¹². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti-actina y el control de sobreexpresión fue anti-PKC ϵ . Los datos fueron obtenidos de 5 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. *p<0.05 con respecto al basal.

VIII.X Efecto de los isómeros de CLA en la acumulación de lípidos intracelulares en las células hepáticas C9

Con el objetivo de determinar si los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* promueven la acumulación de lípidos intracelulares en nuestro modelo de células hepáticas C9, fue utilizada la técnica de microscopía confocal y la tinción con rojo oleoso. El tratamiento durante 48 horas con ambos isómeros de CLA, mostró la presencia de numerosas vesículas esféricas con el contenido del colorante; sugiriendo que su naturaleza es de origen lipídico. La preincubación con el isómero *cis-9, trans-11-CLA* indujo la producción de gotas de lípidos con diferentes tamaños, cuya distribución fue encontrada en el citoplasma. Por otro lado, el isómero *trans-10, cis-12-CLA* mostró en la mayoría de las células gotas grandes de lípidos densamente teñidas, lo cual puede observarse en la **figura 33**. El nivel de fluorescencia fue cuantificado, mostrando que los dos isómeros principales promueven la acumulación de lípidos en las células hepáticas C9. Como un control negativo de la acumulación de lípidos observada con la incubación de los isómeros de CLA, hicimos el mismo ensayo con ácido linoleico, que al ser incubado durante 24 y 48 horas muestra la presencia de pequeñas gotas lipídicas **figura 34**, pero en una menor proporción que los isómeros de CLA en nuestro modelo de células hepáticas C9; hallazgo que coincide con otros reportes en donde se ha descrito que el ácido linoleico previene la esteatosis hepática (Vincenzo et al. 2000, Malhi Harmeet, et al. 2008, Ferramosca Alessandra, Vincenzo Zara, 2014).

Figura 33

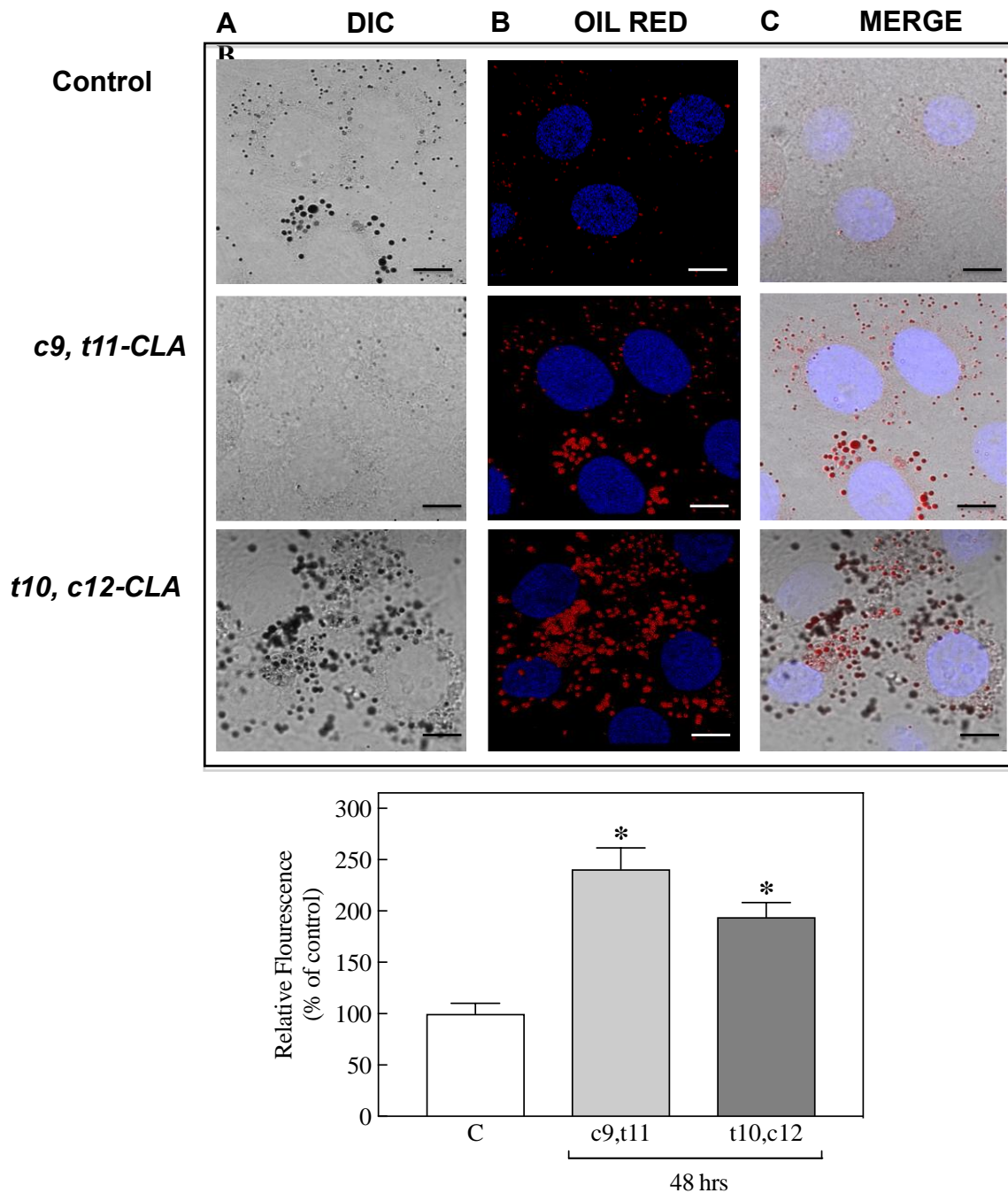


Figura 33. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* fueron incubados durante 48 horas en una concentración de 50 μ M en cada estímulo. La imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 780. A) Contraste de fase B) Los lípidos intracelulares fueron teñidos con rojo oleoso y los núcleos con DAPI C) Merge. Escala 10 μ micras. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

Figura 34

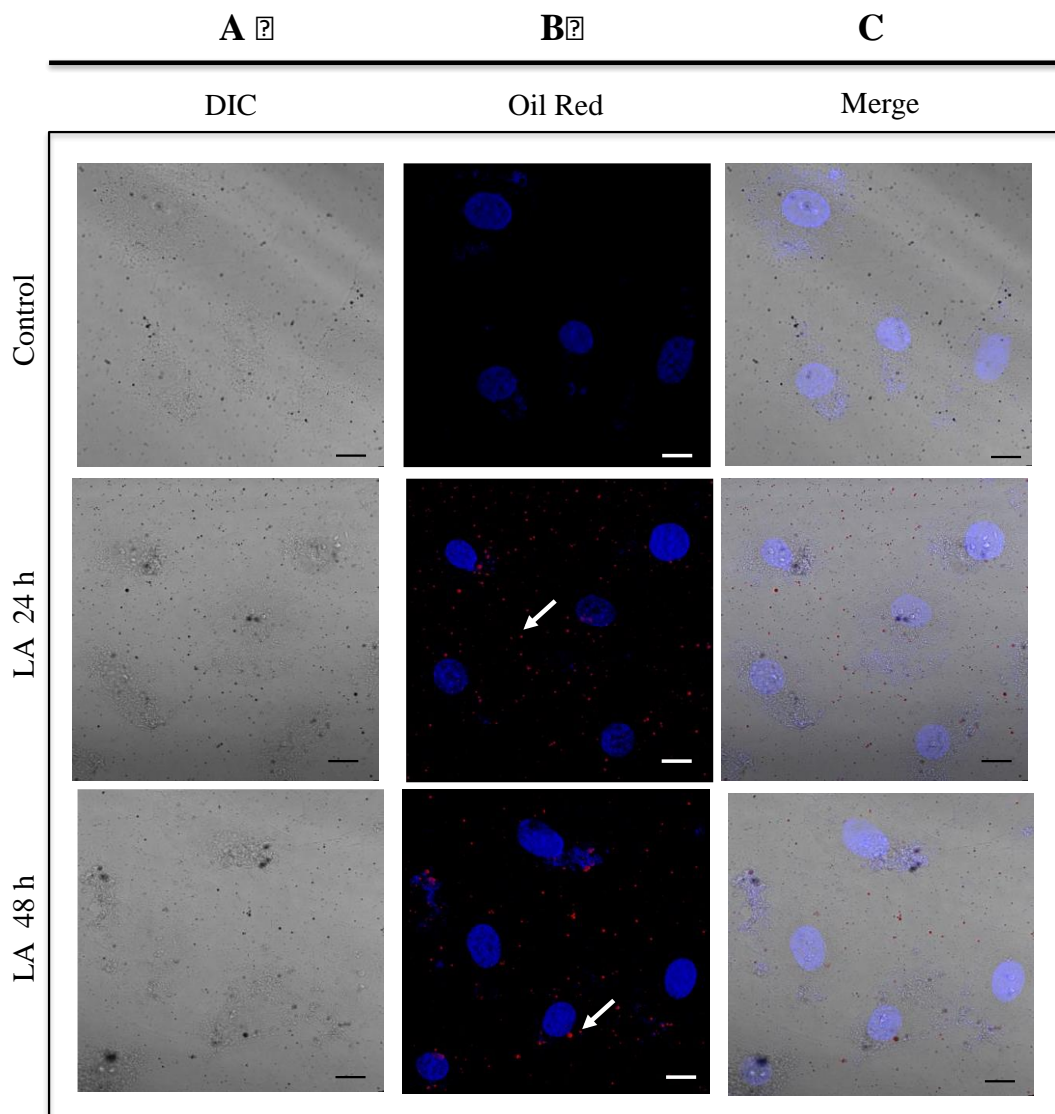


Figura 34. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. El LA, fue incubado durante 24 y 48 horas en una concentración de 50 μM en cada estímulo. Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 780. A) Contraste de fase B) Los lípidos intracelulares fueron teñidos con rojo oleoso y los núcleos con DAPI C) Merge. Escala 10 μm .

VIII.X Evaluación de los efectos de los isómeros de CLA en la morfología de las células hepáticas C9

Los datos reportados por microscopía confocal con respecto al tratamiento con los isómeros de CLA, aparentemente no mostraron cambios en la morfología celular, ni nuclear en nuestro modelo de estudio, sin embargo al utilizar la técnica de microscopía electrónica de transmisión fue posible observar con mayor detalle la estructura de las células.

Por una parte las células control presentan una morfología regular, típica de células endoteliales, con núcleos elongados, numerosos filopodios y uniones intercelulares bien conservadas.

Las células estimuladas con el isómero *cis-9, trans-11-CLA* mostraron la presencia de algunas inclusiones electrodensas esferoidales en el citoplasma, además de agregados de vesículas aparentemente de naturaleza lipídica.

El isómero *trans-10, cis-12-CLA*, también produjo modificaciones en la forma de las células y mostró la presencia de numerosas y pequeñas gotas densas en el citoplasma. Las células presentaron pequeños agregados asociados al retículo endoplásmico, formando parches discontinuos en la cara citosólica de este organelo con la incubación con ambos lípidos (**Figura 35**).

Resultados que muestran que ambos isómeros de CLA modifican la morfología de las células hepáticas C9, lo cual podría tener efectos negativos en las diferentes respuestas metabólicas que estas pueden poseer.

Figura 35

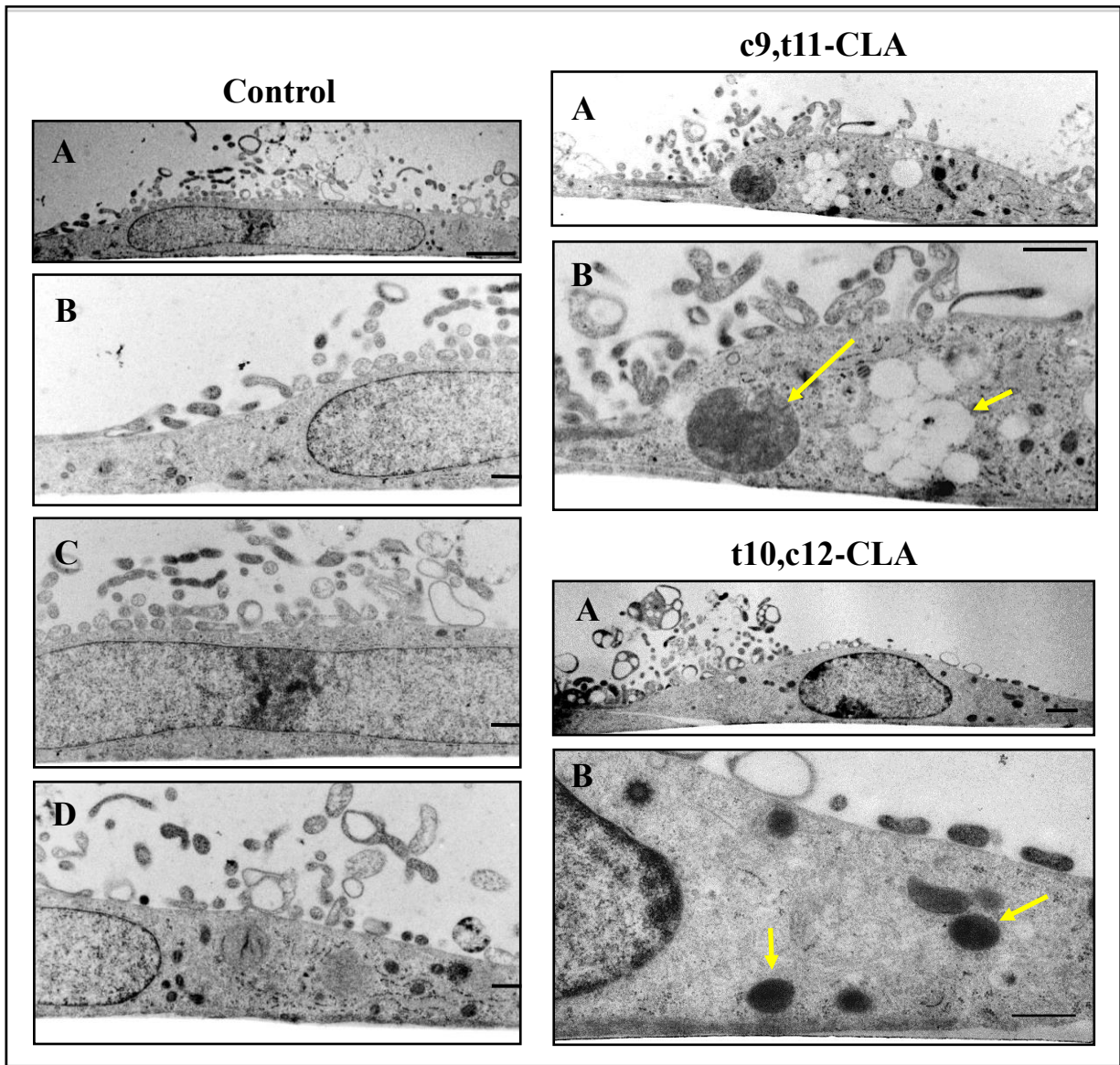


Figura 35. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Los dos isómeros de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* fueron incubados durante 24 horas en una concentración de 50 μM en cada estímulo. Las imágenes fueron tomadas utilizando el microscopio electrónico de transmisión en un JEOL 1400 TEM (JEOL LTD, Japan). A-C Panel izquierdo) Células C9 sin tratamiento A-B Panel derecho superior) Tratamiento con *cis-9, trans-11-CLA* A-B). Escala 10 μm . Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

VIII.XI Papel de otros ácidos grasos en la regulación de la respuesta a insulina en células hepáticas C9

El ácido linoleico, es un ácido graso poliinsaturado el cual se encuentra asociado con tener efectos positivos en la modulación de la respuesta a la insulina, por lo que utilizarlo fue considerado importante para tener un modelo comparativo con respecto a los efectos de resistencia a la insulina inducida por los isómeros de CLA. Para conocer el efecto del ácido linoleico (LA) en la vía de señalización de la insulina, se realizaron pre-incubaciones con este ácido graso durante 24 y 48 horas en una concentración de 50 μ M, con y sin estímulos de 10 nM de insulina durante 10 minutos. Encontramos que el ácido linoleico promueve la fosforilación de Akt en la Thr³⁰⁸ y de IRS en la Tyr⁶³² inducida por insulina a las 24 horas, mientras que a las 48 horas de incubación con este ácido graso, hay un incremento en la fosforilación de ambas proteínas como se observa en la **figura 36**. Cuando es incubado solo el ácido graso no se observa ningún efecto en la fosforilación de ambas proteínas en los tiempos antes mencionados.

Figura 36

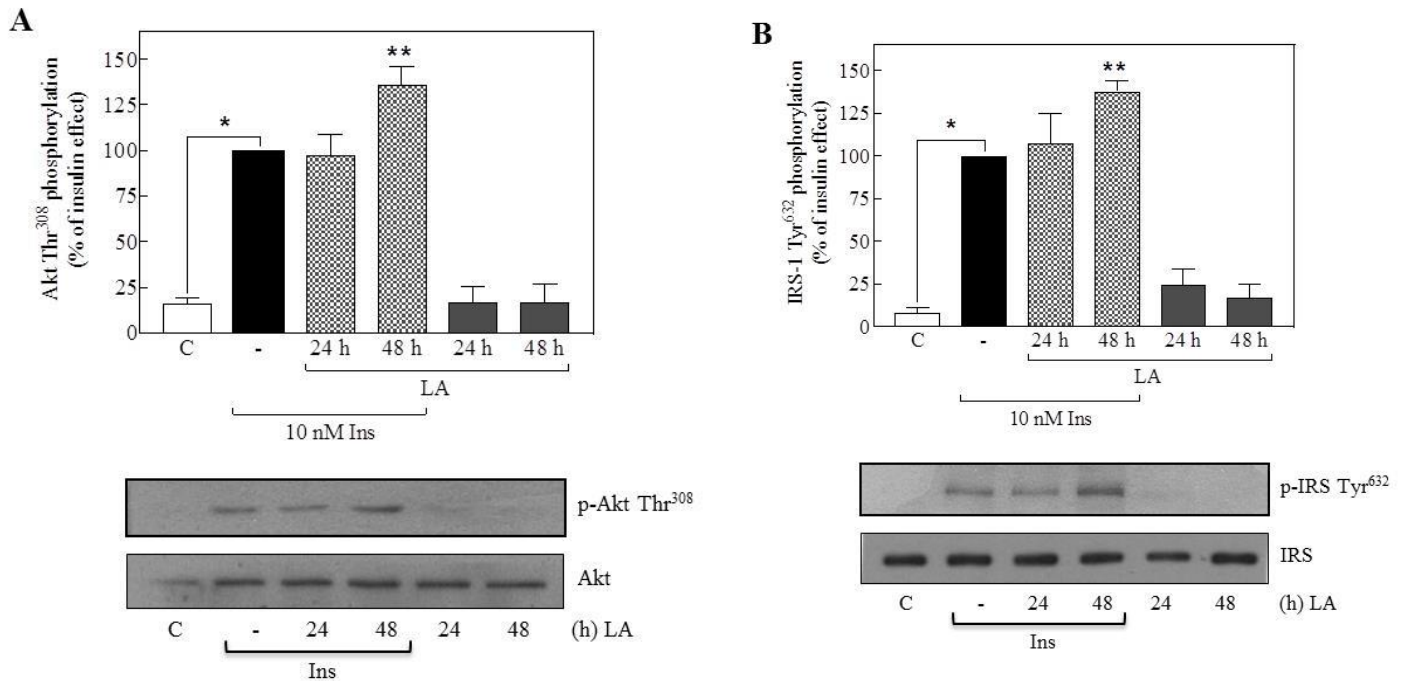


Figura 36. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizó el ácido linoleico en concentración de 50 μ M en cada estímulo, en 24 y 48 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt Thr³⁰⁸ e IRS Tyr⁶³². La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti Akt y anti-IRS respectivamente. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto al basal.

Consideramos importante tener, un control positivo de los efectos de un ácido graso de tipo saturado en nuestro sistema, el cuál ha sido descrito como un inductor de resistencia a la insulina en diversos modelos celulares (Samuel VT. Et al. 2004, Vazquez-Jimenez, et al. 2016). Encontramos que al realizar un ensayo de concentración respuesta, este ácido graso afecta la activación de Akt, por lo que el ácido palmítico también promueve resistencia a la insulina en nuestro modelo de células hepáticas.

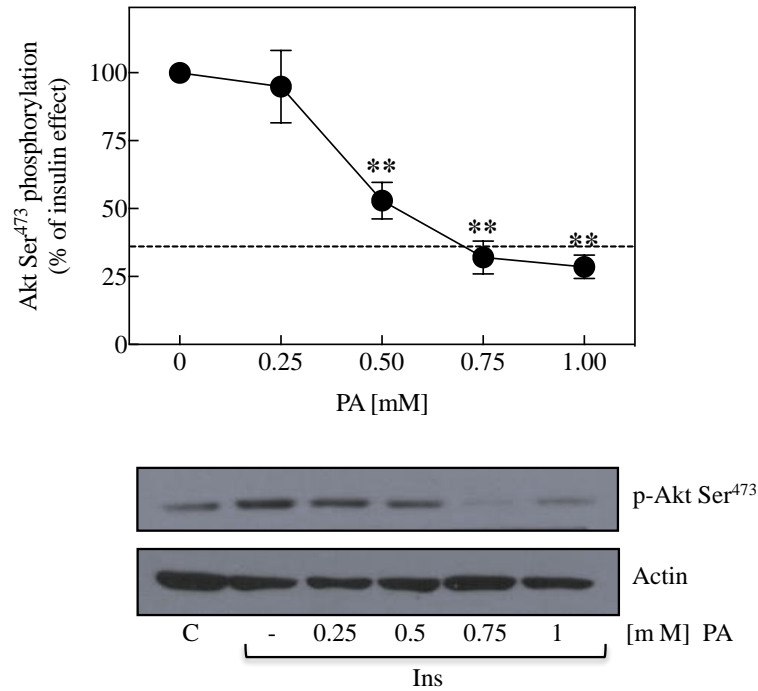


Figura 37. Las células C-9, se mantuvieron en condiciones de 1% de suero y 1% de BSA durante todo el tratamiento. Se utilizó el ácido palmítico en concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM en cada estímulo, en 24 y 48 horas. Se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE y fueron analizadas utilizando el anticuerpo anti Akt Ser⁴⁷³. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando anti actina. Los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes, tomando 1 blot como representativo para la gráfica. * $p < 0.05$ con respecto al basal.

IX. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente proyecto de tesis, muestran que los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* promueven resistencia a la insulina, efecto reflejado en la menor fosforilación del receptor de insulina en el residuo de Tyr¹¹⁵⁸, IRS en la Tyr⁶³², la cinasa Akt en la Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³ y GSK-3 α/β en la Ser^{21/9}. Ambos ácidos grasos promueven la fosforilación en serinas de IRS en los residuos 612 y 307, por medio de un mecanismo que involucra a la activación de PKC ϵ y la acumulación de lípidos en la línea celular hepática C9.

Akt es una Ser/Thr cinasa importante en las acciones metabólicas de la insulina, particularmente en la regulación del metabolismo de glucosa en el hígado, en donde promueve la síntesis de glucógeno e inhibe la gluconeogénesis. La activación de Akt requiere de la fosforilación secuencial en dos residuos. La Thr³⁰⁸ localizado en el dominio de cinasa y la Ser⁴⁷³ situado en la región reguladora del carboxilo terminal. La fosforilación de ambos sitios es mediado por PDK1 y mTORC2, respectivamente, mecanismo requerido para la completa activación de esta cinasa (Manning, et al. 2017). Como parte de la evaluación de la vía de señalización de la insulina, los niveles de fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ fueron determinados; en primera instancia, fueron realizados tiempos de incubación cortos, cuya variación fue de 2 minutos hasta 1 hora con cada isómero de CLA por separado, sin encontrar ningún cambio por efecto del tratamiento con ninguno de estos. Dada la evidencia con respecto a la participación de GPR's (receptores acoplados a proteínas G) en distintas vías de señalización, relacionadas con mecanismos antiinflamatorios y de sensibilidad a la insulina en

respuesta a diversos ácidos grasos poliinsaturados, fue muy importante la realización de este experimento. Se conoce que los receptores acoplados a proteínas G son activados en periodos cuya duración es de minutos, por lo que en nuestro modelo al no encontrar modificaciones con ambos isómeros de CLA, la posible participación de un GPR fue descartada en nuestro modelo, al menos en estas condiciones.

Por los resultados anteriores y para conocer los efectos crónicos que los isómeros de CLA podrían tener en la respuesta a insulina en células hepáticas, fueron evaluados tiempos de incubación de mayor duración, que consistieron de 24 hasta 60 horas. De forma inicial se evaluó la fosforilación de la cinasa Akt inducida por insulina en sus dos principales residuos de activación Thr³⁰⁸ y Ser⁴⁷³. Se observó que los dos isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y el *trans-10, cis-12-CLA* fueron incubados en las células y ambos afectan el estado de fosforilación de Akt en sus dos residuos; sin embargo se observó que la menor fosforilación en la Thr³⁰⁸ fue un efecto dependiente del tiempo con mayor consistencia que el encontrado en el residuo de Ser⁴⁷³. El nivel de fosforilación en este último residuo fue disminuido únicamente por el pretratamiento con *trans-10, cis-12-CLA*. El papel que posee cada uno de los residuos de Akt para su activación, aún no ha sido esclarecido por completo. Existen reportes con respecto a que la fosforilación en la Thr³⁰⁸, se encuentra principalmente implicada con las acciones metabólicas de la insulina tales como el transporte de glucosa hacia la célula, sin que el residuo de Ser⁴⁷³ esté involucrado. La delección de mTORC2, elimina la fosforilación en el residuo de Ser⁴⁷³, sin afectar a la de Thr³⁰⁸, además bajo estas condiciones Akt conserva su capacidad de fosforilar a sus blancos GSK-3, TSC2 y

S6K, proteínas que participan en el metabolismo, proliferación y crecimiento celular (Kondapaka, et al. 2004, Morisco, et al. 2005). Esto sugirió que la activación de blancos específicos de Akt no depende por completo de la fosforilación en la Ser⁴⁷³. Alessi et al., reportaron que la mutación en el dominio PH de la cinasa PDK-1, altera la fosforilación de Akt en el residuo de Thr³⁰⁸, sin ningún efecto en la Ser⁴⁷³; además mostraron que los ratones knock-in para PDK-1 presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, sugiriendo de tal forma la importante participación del residuo de Thr³⁰⁸ en el metabolismo de glucosa, por lo que sugerimos que los isómeros de CLA podrían afectar principales las acciones metabólicas que ejerce Akt en nuestro modelo de células hepáticas. Ambos isómeros de CLA han mostrado tener efectos de desensibilización en la respuesta a insulina al inducir una menor activación de Akt, un factor esencial que puede contribuir a estados de resistencia a la insulina.

Un probable mecanismo molecular asociado a las acciones de CLA en la inducción de resistencia a la insulina podría ser la hiperfosforilación en residuos de serina de IR e IRS, el cual reduce la fosforilación en tirosinas de ambas proteínas, la actividad de cinasa del receptor y las interacciones con proteínas blanco como PI3K, alterando la activación de Akt. Este mecanismo además, se encuentra asociado con promover la degradación de IR/IRS (Copps K. D. White M. F. 2012).

Porier et al, reportaron que el isómero *trans-10, cis-12-CLA* promueve resistencia a la insulina, ya que induce una reducción en los niveles de expresión y de fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y de su sustrato, a través de

un mecanismo dependiente de la proteína SOCS3, la cual promueve la degradación proteosomal de IRS.

Por lo anterior, fueron evaluados los niveles de fosforilación en tirosinas del IR e IRS, ya que constituyen parte fundamental en la señalización de la insulina. En nuestro estudio, observamos que en todos los tiempos de incubación con ambos ácidos grasos, los niveles de fosforilación en la Tyr¹¹⁵⁸ del receptor de insulina y la Tyr⁶³² de IRS se encontraron disminuidos, estos residuos poseen importantes implicaciones en la funcionalidad y regulación de la actividad de estas proteínas, tal y como fue descrito con anterioridad. No se presentaron cambios en la expresión de ambas proteínas. Hallazgos que sugieren que el mecanismo de regulación negativa ejercido por los isómeros de CLA que afecta la señalización de la insulina involucra al IR e IRS.

Otro hallazgo adicional con respecto a una de las proteínas que participan en la vía de señalización de la insulina y que tiene repercusiones metabólicas destacables, lo representa GSK-3, un blanco de la cinasa Akt, la cual es un importante regulador de la síntesis de glucógeno en el hígado, su activación regula e inactiva a la glucógeno sintasa (GS). GSK3 es regulada negativamente por Akt a través de la fosforilación de los residuos Ser²¹ (GSK3 α) y Ser⁹ (GSK3 β). En este contexto, fueron evaluados los niveles de fosforilación en dichos residuos y debido al pretratamiento con ambos isómeros de CLA, los dos se encontraron disminuidos, sin presentar cambios en la expresión de esta proteína.

Los efectos de los isómeros de CLA nuestro modelo de estudio, son mecanismos moleculares asociados con resistencia a la insulina, cuyo origen

sugerimos puede estar relacionado con la presencia de diferentes modificaciones postraduccionales en proteínas que tienen una importante participación en la vía de señalización de la insulina.

Uno de los posibles mecanismos involucrados en la alteración del proceso de fosforilación en tirosinas del receptor de insulina, lo constituye la fosforilación en residuos de Ser/Thr del mismo (Gerasimos, et al. 2001, Copps K.D. 2012). Recientemente, se identificó en un modelo de ratones alimentados con una dieta alta en grasa, la fosforilación del residuo de Thr¹¹⁶⁰ en el receptor de insulina, el cual es fosforilado por PKC ϵ y que se encuentra involucrado en la inducción de resistencia a la insulina hepática en este modelo. El grupo de Petersen et al., encontró que la fosforilación de este residuo de Thr disminuye la actividad de cinasa del receptor, ya que desestabiliza la configuración activa del mismo (Petersen et al. 2017). Este mismo mecanismo podría ser ejercido por los isómeros de CLA, en nuestro modelo de células hepáticas C9, sin embargo no realizamos ensayos que demuestren esta hipótesis, pero sería muy interesante evaluarlo a futuro.

Por otro lado, ya ha sido reportado que la fosforilación en Ser de IRS, es un mecanismo implicado en la inducción de resistencia a la insulina y que en presencia de condiciones de hiperinsulinemia, exacerba este estado (Copps K.D, White MF. 2012). Existe escasa evidencia en el tejido hepático, con respecto a que CLA promueva la fosforilación en serinas de IRS (Poirier et al. 2006). Por lo que su estudio resultó importante en nuestro modelo, ya que podría ser un mecanismo por el cual CLA, ejerce efectos negativos en la respuesta a insulina.

Se evaluaron en los mismos tiempos de incubación los efectos de los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*, en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina en los residuos de Ser⁶¹² y Ser³⁰⁷. La Ser⁶¹² es un residuo que ha sido identificado ser fosforilado por PKC, además de encontrarse en cercanía a un residuo de tirosina en IRS con vital importancia para su asociación con PI3K. La Ser³⁰⁷ de IRS, el cual se ha identificado afecta la asociación entre el receptor de insulina y su sustrato, además de estar implicado en resistencia a la insulina y ser un blanco de cinasas como JNK e IKK β en respuesta a TNF- α . Ambos ácidos grasos incrementaron la fosforilación en el residuo de Ser⁶¹² de IRS desde las 24 horas de incubación con ambos lípidos. Liu et al., reportaron que la mutación en este sitio, interfiere con la fosforilación en tirosinas de IRS y debido a su cercanía con la Tyr⁶⁰⁸, presente en este mismo, afecta su asociación con PI3K, además de que el residuo de Ser⁶¹² ha sido reportado como un blanco de PKC, cinasa implicada en fosforilar en residuos de serina al sustrato receptor de insulina; los dos isómeros mostraron participar en la fosforilación de IRS en este residuo (Liu F, et al.1994, Chin J.E, et al.1994). Hallazgos con los que podemos sugerir que, ambos isómeros de CLA desensibilizan la respuesta a la insulina a través de un mecanismo que involucra la fosforilación en la Ser⁶¹² de IRS.

Por otra parte, también encontramos que ambos isómeros de CLA incrementaron la fosforilación en el residuo de Ser³⁰⁷ en IRS; la fosforilación de este residuo tiene implicaciones importantes en resistencia a la insulina. Se conoce que JNK es una cinasa que posee la capacidad llevar a cabo esta fosforilación en respuesta a TNF α , y se ha demostrado que su delección protege

parcialmente la degradación de IRS-1 (Aguirre, et al. 2000, Pal, et. al. 2016). También existe evidencia de que la cinasa IKK β también promueve la fosforilación de IRS en la Ser³⁰⁷, aunque no es claro el mecanismo de activación de esta proteína. Existen reportes de que PKC ϵ y PKC θ podrían ser las responsables de este fenómeno, las cuales pueden activarse tras el aumento en la concentración de ácidos grasos libres (Pal, et. al.2016).

La resistencia a la insulina en el hígado ha sido atribuida a la activación de PKC ϵ , posterior a la ingesta de una dieta alta en grasa. El aumento en la concentración de DAG en el hígado promueve la activación de PKC ϵ . Belury et al; reportó en un modelo de ratones alimentados con la mezcla de CLA, concentraciones elevadas de DAG y TAG en el hígado, evento que fue asociado a la translocación de PKC ϵ a la membrana plasmática, mecanismo conocido de activación de PKC. Numerosos residuos de Ser/Thr en IRS se han identificado como blancos de esta proteína. Se conoce que PKC ϵ disminuye la fosforilación en tirosinas del receptor de insulina y de IRS-2 (Klip, et al. 2011) afectando la capacidad de la insulina de promover la síntesis de glucógeno e inhibir la gluconeogénesis. En ratas obesas y en la línea celular HEPG2 la activación de PKC ϵ fue asociada con la menor expresión del receptor de insulina, además se ha encontrado que el silenciamiento de esta proteína protege a los ratones de presentar resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos saturados (Bhattacharya, et al. 2007).

Un indicador del estado activo de esta proteína lo constituye la fosforilación de la Ser⁷²⁹, se conoce que algunos ácidos grasos saturados poseen la capacidad de inducir este efecto y afectar así la señalización de la insulina (Klip, et al. 2011).

Por lo que su estudio en el modelo de células hepáticas C9 resultó ser de gran interés estudiarlo, ya que podría representar uno de los probables mecanismos moleculares relacionados con los efectos de los isómeros de CLA en la resistencia a la insulina.

De manera interesante, en nuestros resultados encontramos que los dos isómeros de CLA promueven la fosforilación de PKC ϵ en la Ser⁷²⁹, por lo que podemos deducir que los dos isómeros de CLA activan a esta proteína y que es un mecanismo adicional a los efectos negativos que ejercen ambos lípidos en la respuesta a insulina en nuestro modelo.

Adicionalmente, estudios clínicos en pacientes que presentan resistencia a la insulina hepática, la isoforma PKC ϵ se encuentra altamente expresada. Los ensayos de sobreexpresión de PKC ϵ en nuestro modelo, mostraron que la reducción inducida por los isómeros de CLA en la fosforilación en la Ser⁴⁷³ de Akt, se presentó en mayor proporción durante 24 horas de tratamiento, con respecto a lo observado sin la sobreexpresión de esta proteína en los ensayos anteriores. Estos hallazgos dan indicios de que la sobreexpresión de PKC ϵ en nuestro sistema, exacerba los efectos negativos de los isómeros de CLA.

Los niveles de fosforilación de Akt en la Thr³⁰⁸ disminuidos por efecto de los isómeros de CLA, en presencia de la dominante negativa de PKC ϵ se recuperaron. Por otro lado, el isómero *trans-10, cis-12-CLA* tuvo el mismo comportamiento con respecto a la fosforilación de la Ser⁴⁷³, en donde en presencia de la DN-PKC ϵ se recuperó el efecto negativo que este ácido graso tiene. El isómero *cis-9, trans-11-CLA* no mostró ningún cambio en este residuo de Akt en presencia de la sobreexpresión de PKC ϵ . El residuo de Thr³⁰⁸ de Akt, ha sido el

principal involucrado en los efectos metabólicos que esta proteína posee, tal y como fue mencionado con anterioridad. Probablemente ambos isómeros de CLA afectan en mayor proporción las acciones metabólicas de Akt.

Así mismo y de forma muy interesante, la presencia de la dominante negativa de PKC ϵ reduce notablemente la fosforilación en la Ser⁶¹² de IRS, bajo el tratamiento con los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA*. Estos resultados sugieren que PKC ϵ podría ser la responsable de los mecanismos de resistencia a la insulina inducidos por los isómeros de CLA en células hepáticas C9.

En el tejido hepático, ha sido reportado que el isómero *trans-10*, *cis-12-CLA*, posee la capacidad de inducir esteatosis, además de tener la capacidad de regular la expresión de genes que participan en la lipogénesis (Vyas, et al. 2012, Kennedy A, et al. 2010). Adkins et al., en un estudio en ratones alimentados con una dieta con un alto contenido del isómero *trans-10*, *cis-12-CLA*, confirmaron la presencia de resistencia a la insulina en este modelo, lo cual fue determinado a través de ensayos de ITT y HOMA-IR, también reportaron una importante disminución en la fosforilación de Akt en la Thr³⁰⁸, así como la presencia de una severa macroesteatosis hepática.

De forma muy interesante, nuestros hallazgos demuestran que los dos isómeros de CLA incrementan la concentración de lípidos en las células hepáticas C9, resultado que fue observado por la técnica de microscopía confocal y la tinción con rojo oleoso, mientras que el ácido linoleico siendo un ácido graso con una naturaleza similar a CLA no promovió ese efecto, además de que existe evidencia de que el LA previene el proceso de esteatosis hepática (Malhi, et al. 2008,

Sarthak, et al. 2014, Sarthak, et al. 2016), por lo que el efecto de acumulación de lípidos intracelulares resulta ser específico para los isómeros de CLA. Existe evidencia de que el isómero *trans-10, cis-1-CLA* en un modelo de células de ratón, induce la expresión de genes involucrados en la lipogénesis en el hígado, tales como el de la proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP1), la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la ácido graso sintasa (FASN) y la esteroil coenzima A desaturasa-1(SCD1). Así como la menor expresión de genes que participan en la β -oxidación como la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y la acil-CoA oxidasa (ACOX1) (Belury et al. 2011). Ensayos similares serían necesarios para corroborar que en nuestro modelo tenemos este mismo comportamiento por parte de los dos isómeros de CLA.

El tratamiento con el isómero *cis-9, trans-11-CLA*; mostró un comportamiento que no ha sido reportado por ningún grupo de investigación y nos resultó de gran interés utilizar una herramienta adicional, como la microscopía electrónica de barrido, para confirmar los resultados de acumulación de lípidos en las células. Por medio de esta técnica, fueron observados cambios en la morfología de las células que fueron tratadas con ambos isómeros de CLA durante 24 horas, éstas presentaron diferencias en forma y tamaño, así como variaciones entre las uniones intercelulares comparadas con las células control, lo cual podría tener repercusiones funcionales importantes en nuestro modelo de estudio. Sin embargo, lo más destacable fue la presencia de vesículas, cuya apariencia sugiere que son de naturaleza lipídica, estos datos coinciden con los obtenidos a través de microscopía confocal. Moraes et al., mostraron también, cambios morfológicos importantes en células hepáticas derivadas de ratas bajo el

tratamiento con CLA, además de claros indicios de esteatosis hepática (Moraes C, et al. 2017). Sugerimos que los isómeros *cis-9*, *trans-11-CLA* y *trans-10*, *cis-12-CLA* promueven la deposición de lípidos en las células hepáticas C9. Los dos isómeros de CLA podrían tener la capacidad de modular a diversos factores de transcripción que participan en la expresión de enzimas lipogénicas en el hígado; sin embargo, más estudios con respecto a este fenómeno son necesarios. Como parte complementaria a nuestro trabajo, encontramos que los isómeros por sí mismos no activan la vía de señalización de la insulina, ya que ninguno de estos promovió la activación de Akt e IRS. Evaluamos de manera adicional, el papel que ejerce el ácido linoleico en la vía de señalización de la insulina en las células hepáticas C9, su utilización resultó ser de gran importancia para tener un modelo comparativo de los efectos de otro ácido graso poliinsaturado con respecto al comportamiento de CLA en este fenómeno. En otros modelos, se ha sido descrito al ácido linoleico como un promotor de sensibilidad a la insulina (Patterson, et al. 2012, Sarthak, et al. 2014); efecto que coincidió con nuestros resultados, en donde este ácido graso aumentó la fosforilación de Akt e IRS, ni promovió la acumulación de lípidos intracelulares, tal y como se ha reportado en otros modelos (Sarthak, et al. 2014, Sarthak, et al. 2016) por su parte, el ácido palmítico de forma similar a hallazgos previos (Ferramosca, et al. 2014, Vazquez Jimenez, et al. 2016), indujo resistencia a la insulina en nuestro modelo de estudio, corroborando que los efectos negativos inducidos por CLA en la respuesta a insulina son específicos para estos ácidos grasos.

X. CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos indican que los isómeros principales de CLA, *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA*, inducen una menor activación de la vía de IRS/Akt, a través de un mecanismo que involucra a PKC ϵ , sugerimos que dicho efecto conlleva a la fosforilación de IRS en la Ser⁶¹² y la Ser³⁰⁷, lo cual podría ser ocasionado por la acumulación de DAG o algún metabolito de CLA, proponemos que la cinasa JNK también podría encontrarse implicada en dichos efectos ; tal y como se muestra en el modelo propuesto de la **figura 38**.

Son necesarios más estudios para conocer los mecanismos moleculares implicados de CLA en la inducción de resistencia a la insulina y la participación de PKC ϵ en el hígado, ambos isómeros de CLA resultaron tener efectos negativos en la respuesta a la insulina en nuestro modelo de células hepáticas C9.

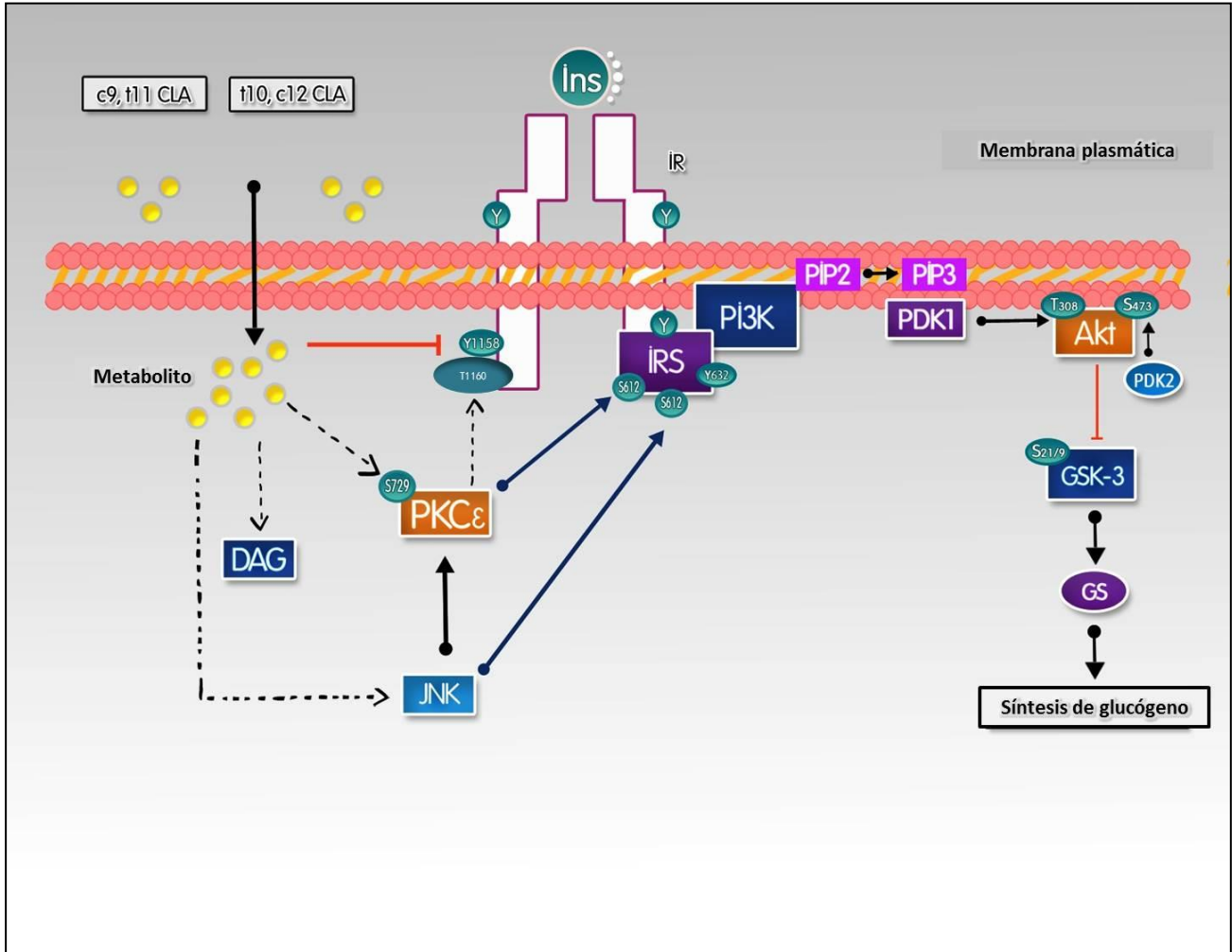


Figura 38. Modelo representativo que muestra los efectos de los isómeros *cis-9, trans-11-CLA* y *trans-10, cis-12-CLA* en la regulación de la señal de insulina células hepáticas C9.

XI.PERSPECTIVAS

Como parte adicional en la evaluación de los efectos de CLA y su asociación con la activación de PKC ϵ , será importante:

- Determinar los niveles de fosforilación en el residuo de Thr¹¹⁶⁰ del receptor de insulina, acción dependiente de PKC ϵ como un marcador de resistencia a la insulina hepática, el cual podría ser el mecanismo relacionado con los efectos negativos por parte de CLA en nuestro modelo de estudio.
- Evaluar si bajo el tratamiento con los isómeros de CLA la activación de JNK está presente, ya que esta cinasa se encuentra involucrada en fosforilar en el residuo de Ser³⁰⁷ a IRS y es además un blanco de PKC ϵ .
- Llevar a cabo la cuantificación de DAG para identificar el mecanismo de activación de PKC ϵ en las células hepáticas C9.
- Determinar la expresión de genes involucrados en los procesos de lipogénesis e inflamación modulados por los isómeros de CLA.

XII.BIBLIOGRAFÍA

Adkins Yuriko, Schie Iwan W, Fedor Dawn, Reddy Aurosis, Nguyen Samantha, Zhou Ping, Kelley Darshan S, Wu Jian. A novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis with significant insulin resistance. *Laboratory Investigation*.2013; 93, 1313–1322.

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem*. 2000. 275:9047–9054.

Alessandra Ferramosca, Vincenzo Zara. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol*. 2014 February 21; 20(7): 1746-1755.

Arellano-Plancarte A, Hernandez-Aranda J, Catt KJ, Olivares-Reyes JA. Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochemical pharmacology*. 2010;79:733-45.

Bayascas J.R., Wullschleger S., Sakamoto K., Garcia-Martinez J.M., Clac., Komander D., van Aalten D.M.F., Boini K.M., Lang F., Lipina C., Logie L., Sutherland C., Chudek J.A., van Diepen J., Voshol P.J., Lucocq J.M. and Alessi D.R. Mutation of PDK1 PH domains inhibits PKB/Akt leading to small size and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biology*. 2008.

Bayascas J.R., Wullschleger S., Sakamoto K., Garcia-Martinez J.M., Clacher C., Komander D., van Aalten D.M.F., Boini K.M., Lang F., Lipina C., Logie L., Sutherland C., Chudek J.A., van Diepen J., Voshol P.J., Lucocq J.M. and Alessi D.R. Mutation of PDK1 PH domains inhibits PKB/Akt leading to small size and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biology*. 2008.

Belury, M. A., Stout Michael B., Liu Li-Fen. Hepatic steatosis by dietary-conjugated linoleic acid is accompanied by accumulation of diacylglycerol and increased membrane-associated protein kinase C ϵ in mice. *Mol. Nutr. Food Res*. 2011.

Bhattacharya Samir, Dey Debleena, Bhattacharya Anirban, Roy SibSankar. Fatty acid represses insulin receptor gene expression by impairing HMGA1 through protein kinase C ϵ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007.474–479.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(1).

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, et al. ERKs: A family of protein-serine/ threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991; 65(4):663-75.

Boura Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(4):E581-91.

Brown, JM, McIntosh, MK: Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr*, 133: 3041-3046, 2003.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/ AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (8):4240-5.

Capurso C and Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol*. 2012;57:91-97.

Cariou B, Capitaine N, Le Marcis V, et al. Increased adipose tissue expression of Grb14 in several models of insulin resistance. *FASEB J*. 2004; 18 (9):965-7.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008; 27 (41):5527-41.

Chan TO, Tschlis PN. PDK2: a complex tail in one Akt. *Sci STKE*. 2001. 23;(66).

Chin JE, Liu F, Roth RA. Activation of protein kinase C alpha inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol*. 1994;8:51-8.

Chin S.F. Liu W. Storkson J.M. Ha M. Y.L Pariza W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*.1992. pp. 85-19.

Choi JS, Koh IU, Jung MH, Song J. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Br J Nutr*. 2007; 98 (2):264-7.

Ciaraldi TP. Poretsky L. Cellular Mechanisms of Insulin Action. *Principles of Diabetes Mellitus*. Nueva York. Ed Springer; 2010. p. 75-87.

Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012; 55(10):2565-82.

Cruz Rodríguez Maricela, Tovar R Armando, Torres Nimbe Martha. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Medigraphic*. 2005.

Desbuquois B, Carre N, Burnol AF. Regulation of insulin and type 1 insulin-like growth factor signaling and action by the Grb10/14 and SH2B1/ B2 adaptor proteins. *FEBS J*. 2013; 280 (3):794-816.

Dilzer, A, Park, Y: Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52: 488-513, 2012.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999; 399 (6736):601-5. 51.

Dyson JM, Fedele CG, Davies EM, Becanovic J, Mitchell CA. Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases. *Subcell Biochem*. 2012; 58: 215-79.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 1999;283(5407):1544-8.

Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Sawka-Verhelle D, Hilton D, Van Obberghen E. SOCS-3 Is an Insulin-induced Negative Regulator of Insulin Signaling. *J Biol Chem*. 2000; 275 (21):15985-91.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006; 7: 606-619.

Farese RV. Protein Kinase C. *Diabetes Mellitus: a Fundamental and Clinical Text*. D LeRoith, SI Taylor and JM Olefsky. Lippincott. 3rd Edition, Philadelphia, USA, 2000, pp. 301-316.

Gerasimos p. Sykiotis and athanasios g. Papavassiliou. Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1: A Novel Target for the Reversal of Insulin Resistance. Mol Endocrinol, November 2001, 15(11):1864–1869.

Gribble FM. Metabolism: a higher power for insulin. Nature. 2005; 434. 7036:965-6.

Gual Philippe, Marchand, Brustel Yannick Le, Tanti Jean-François. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. Biochimie. 2005. 99–109.

Guillén Natalia, Roche Helen M., Navarro María A., Noone Carmen Arnal, Enda, José M. Arbonés-Mainar, Sergio Acín, Joaquín C. Surra, Pedro Muniesa, Osada Jesús. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. Physiological Genomics. 2009 Vol. 37 no. 3, 187-198.

Gutiérrez Rodelo Citlaly, Roura Guiberna Adriana, Olivares Reyes Jesús Alberto. Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. Gac Med Mex. 2016; 152.

Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis 8:1881–87.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333-336.

J. Vazquez-Jimenez, Gustavo, J. Chavez-Reyes, T. Romero-Garcia, A. Zarain-Herzberg, J. Valdes-Flores, J. Galindo-Rosales, Manuel, A. Rueda, A. Guerrero-Hernandez, J. Olivares-Reyes, Alberto, Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression, *Cell. Signal*. 28(1) (2016) 53-59.

Jensen M, De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm*. 2009; 80:51-75.

Jucker BM, Cline GW, Barucci N, Shulman GI. Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes*. 1999; 48:134 –140.

K.D. Copps, M.F. White. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012. 55:2565–258.

Kennedy A, Martinez K, Schmidt S, Mandrup S, LaPoint K, McIntosh M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem*. 2010; 21(3):171-9.

Kennedy Arion, Chung Soonkyu, La Point Kathleen, Fabiyi Oluwatoyin, McIntosh Michael. *Trans*-10, *Cis*-12 Conjugated Linoleic Acid Antagonizes Ligand-Dependent PPAR γ Activity in Primary Cultures of Human Adipocytes. *J Nutr.* 2008; 138: 455–461.

Khanal R.C. and Dhiman T.R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. *Journal of Nutrition.* 2004, 3: 72-81.

Kido Y, Burks DJ, Withers D, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest.* 2000; 105 (2):199-205

Kim YJ, Liu RH, Bond DR, Russell JB. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibriosolvens* A38. *Appl. Environm. Microbiol.* 2000.66:5226–30.

Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL, Russell JB. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 92:976–82.

Klaman LD, Boss O, Peroni OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20(15): 5479-89.

Klip A , Kewalramani G, Fink LN, Asadi F. Palmitate-Activated Macrophages Confer Insulin Resistance to Muscle Cells by a Mechanism Involving Protein Kinase C θ and ϵ . PLOS ONE. 2011. 6(10).

Kolesnick, RN, Kronke, M: Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 643-665, 1998.

Kondapaka S.B., zarnowski M.,Yver DR., Sausville E.A., Cushman S.W. 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibition of Akt Thr308 but not Ser473 phosphorylation: a basis for decreased insulin stimulated glucose transport. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10: 7192-8.

Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, Kahn M, Beddow SA, Chu X, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:16381-16385.

Lawrence JC, Roach PJ. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin.*Diabetes.* 1997,46 (4):541-7.

Le Marchand-Brustel Y, Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Barres R, Tanti JF: Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochem Soc Tran.* 200331:1152–1156.

Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol.* 2008; 192(1):29-36.

Legrand-Poels S, Esser N, L'homme L, Scheen A, Paquot N and Piette J. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology.* 2014;92:131-141.

Li, Y, Soos, TJ, Li, X, Wu, J, DeGennaro, M, Sun, X, Littman, DR, Birnbaum, MJ, Polakiewicz, RD: Protein Kinase C θ Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating IRS1 at Ser1101. *Journal of Biological Chemistry*, 2004,279: 45304-45307.

Liu F, Roth RA. Identification of serines-967/968 in the juxtamembrane region of the insulin receptor as insulin-stimulated phosphorylation sites. *Biochem J.* 1994;298 (Pt 2):471-7.

Malhi Harmeet, M.D. Gores Gregory J., M.D. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2008; 28(4): 360–369.

Malinska, H, Huttli, M, Oliyarnyk, O, Bratova, M, Kazdova, L: Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriglycerolemia. *Nutrition*, 31: 1045-1051, 2015.

Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017;169:381-405.

Moloney, F, Toomey, S, Noone, E, Nugent, A, Allan, B, Loscher, CE, Roche, HM: Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes*, 56: 574-582, 2007.

Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol*. 2002; 16(8):1931-42.

Moraes C, Oliveira CA, Amaral ME, Landini GA, Catisti R. Liver metabolic changes induced by conjugated linoleic acid in calorie-restricted rats. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61:45-53.

Morisco C, Condorelli G, Trimarco V, Bellis A, Marrone C, Condorelli G, et al. Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ Res*. 2005; 96:180-8.

Myers MG Jr, White MF. The Molecular Basis of Insulin Action. Gruenberg G, Zick Y, eds. *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. Nueva York: Taylor & Francis; 2002. p. 55-87. 20.

Myers, M. G. Jr et al. IRS-1 activates phosphatidylinositol 38-kinase by associating with Src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 10350–10354 1992.

NCBI. INSR insulin receptor. *Homo sapiens* (human) Gene ID: 3643.4-Feb-2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3643>.

Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu Z-X, Romanelli AJ, Cline GW, Pongratz RL, Zhang X-M, Choi CS, Coleman RA, Shulman GI: Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA: glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knock out mice. *Cell Metab.* 2005; 2:55– 65.

Olivares Reyes J A, Arellano Plancarte A. Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica.* Vol.27, Núm. 21. 2008, 27; 21: 9-18.

Olivares Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo Hernandez JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2009. 29 302:128-39.

Olivares Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo Hernández JR. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Mol. Cell Endocrinol.* 2009. 29 302:128-39.

Olivares-Reyes JA. Bases moleculares del síndrome metabólico y resistencia a la insulina. En: Garibay Nieto GN, García Velasco S, eds. *Obesidad en la edad pediátrica: prevención y tratamiento*. Ciudad de México: Corinter; 2012. p. 185-214.

Pal M, Febbraio MA, Lancaster GI. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. *J Physiol*. 2016;594:267-79.

Patterson, E, Wall, R, Fitzgerald, GF, Ross, RP, Stanton, C: Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab*, 2012: 539426.

Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF and Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2014;510:84-91.

Petersen Max C., Vatner Daniel F., Shulman Gerald I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature, Reviews Endocrinology*.

Petersen, M. C. et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 2016.126, 4361–4371.

Poirier Helene, Shapiro Jennifer S., Kim Roy J., Lazar Mitchell. A. Nutritional Supplementation With trans-10, cis-12–Conjugated Linoleic Acid Induces Inflammation of White Adipose Tissue. *Diabetes*, 2006.55.

Puig O, Tjian R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev.* 2005; 19 (20):2435-46.

Reynolds CM, Roche HM. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. *PLEFA.* 2010; 82: 199–204.

Roche Helen M, Noone, Enda, Nugent Anne and Gibney Michael J. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutrition Research Reviews.* 2001, 14: 173–187.

S. Dasgupta, S. Bhattacharya, S. Maitra, D. Pal, S.S. Majumdar, A. Datta, S. Bhattacharya, Mechanism of lipid induced insulin resistance: activated PKCepsilon is a key regulator, *Biochim Biophys Acta*, 1812. 2011.495-506.

Saltiel Alan R., Kahn C. Ronald. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem.* 2004;279:32345-32353.

Samuel VT, Liu ZX, Wang A, Beddow SA, Geisler JG, Kahn M, et al. Inhibition of protein kinase C epsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2007;117:739-745.

Sarthak Matravadia, Eric A. F. Herbst, Swati S. Jain, David M. Mutch, and Graham P. Holloway. Both linoleic and α -linolenic acid prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E102–E114, 2014.

Sarthak Matravadia, Piotr Zabielski, Adrian Chabowski, David M. Mutch, and Graham P. Holloway. LA and ALA prevent glucose intolerance in obese male rats without reducing reactive lipid content, but cause tissue-specific changes in fatty acid composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016.310.

Sartorius, T, Drescher, A, Panse, M, Lastovicka, P, Peter, A, Weigert, C, Kostenis, E, Ullrich, S, Häring, HU: Mice Lacking Free Fatty Acid Receptor 1 (GPR40/FFAR1) are Protected Against Conjugated Linoleic Acid-Induced Fatty Liver but Develop Inflammation and Insulin Resistance in the Brain. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015.35: 2272-2284.

Schmidt, J, Liebscher, K, Merten, N, Grundmann, M, Mielenz, M, Sauerwein, H, Christiansen, E, Due-Hansen, ME, Ulven, T, Ullrich, S, Gomeza, J, Drewke, C, Kostenis, E: Conjugated Linoleic Acids Mediate Insulin Release through Islet G Protein-coupled Receptor FFA1/GPR40. *Journal of Biological Chemistry*.2011, 286: 11890-11894.

Schmitz-Peiffer C. The tail wagging the dog--regulation of lipid metabolism by protein kinase C. *FEBS J.* 2013;280:5371-5383.

Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. 2009. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function of mice and men. *Genes Dev.* 23(7):788–97 110.

Sebedio JL, Angioni E, Chardigny JM, Gregoire S, Juaneda P, Berdeaux O. The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids* 2001 36 (6):575–82.

Sesti Giorgio. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006. Vol. 20, No. 4, pp. 665-679.

Shah B.H and Catt K.J. Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein C delta, Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth receptor trans-activation. *Mol Pharmacol.* 2002; 61:343-5.

Shah B.H, Olivares Reyes J.A, Yesilkaya A. and Catt K.J. Independence of angiotensin II-induced MAP kinase activation from angiotensin type 1 receptor internalization in clone 9 hepatocytes. *Molecular Endocrinology.* 2002; 16:610-20.

Shen Wan, McIntosh Michael. Nutrient Regulation: Conjugated Linoleic Acid's Inflammatory and Browning Properties in Adipose Tissue K. Annu. Rev. Nutr. 2016.36:183-210.

Shetty M, Kuruvilla A.K, Ismail-Beigi F. and Loeb J.N. Stimulation of glucose transport in Clone 9 cells by insulin and thyroid hormone: role of GLUT-1 activation. Biochim. Biophys. Acta.1996; 1314:140-146.

Shi Y, Wang J, Chandarlapaty S, et al. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. Nat Struct Mol Biol. 2014; 21 (6):522-27.

Simopoulos, AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin Nutr, 54: 438-463, 1991.

Soh Jae-won, Lee Eun Hae, Prywes Ron, I. Weinstein Bernard. Novel Roles of Specific Isoforms of Protein Kinase C in Activation of the c-fos Serum Response Element. Molecular and Cellular Biology, Feb. 1999, p. 1313–1324.

Suwa A, Kurama T, Shimokawa T. SHIP2 and its involvement in various diseases. Expert Opin Ther Targets. 2010;14(7):727-37.

Szendroedi, J, Yoshimura, T, Phielix, E, Koliaki, C, Marcucci, M, Zhang, D, Jelenik, T, Müller, J, Herder, C, Nowotny, P, Shulman, GI, Roden, M: Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111: 9597-9602.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(2):85-96.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.

Vyas D, Kadegowda AK, Erdman RA. Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. *J Nutr Metab*. 2012;932928.

Winzell MS, Pacini G, Ahren B: Insulin secretion after dietary supplementation with conjugated linoleic acids and n-3 polyunsaturated fatty acids in normal and insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006. 290: E347–E354.

Yang, G, Badeanlou, L, Bielawski, J, Roberts, AJ, Hannun, YA, Samad, F: Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009.297: E211-224.

Youngren J. F. Regulation of insulin receptor function. *Cell.Mol.Life Sci.* 2007 873–891.

YuanG-F, Sinclair AJ, Sun HY, Li D. Fatty acid composition in tissues of mice fed diets containing conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid. *J. Food Lipids* 200916:148–63.

Zara Vincenzo, Giudetti Anna Maria, Siculella Luisa, Ferdinando Palmieri, Gnoni Gabriele V. Covariance of tricarboxylate carrier activity and lipogenesis in liver of polyunsaturated fatty acid (n-6) fed rats. *Eur. J. Biochem.* 268, 5734–5739.2000.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation.* 2000; 101(13):1539-45.

Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* 2005; (268).