

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE  
ALTERAN LA RESPUESTA INSULÍNICA EN RATAS  
SUBNUTRIDAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Lucía Gavete Lozano

Bajo la dirección del doctor

Fernando Escrivá Pons

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2745-X** □ □



## **TESIS**

# **ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE ALTERAN LA RESPUESTA INSULÍNICA EN RATAS SUBNUTRIDAS**

**Presentada por  
LUCÍA GAVETE LOZANO**

**Para aspirar al grado de Doctor en Farmacia**

**Dirigida por el Doctor Fernando Escrivá Pons**  
Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular II. Facultad de Farmacia (UCM).



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES  
QUE ALTERAN LA RESPUESTA INSULÍNICA EN  
RATAS SUBNUTRIDAS**



Lucía Gavete Lozano  
Madrid, 2004.



**El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid) , bajo la dirección del Dr. Fernando Escrivá Pons.**



<b>ATP</b>	Adenosín-5'-trifosfato
<b>AMPK</b>	Proteín-kinasa activada por adenosín-5'-monofosfato
<b>APS</b>	Proteína adaptadora con dominio de homología a plectrina
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
<b>CAP</b>	Proteína asociada a Cbl
<b>Cbl</b>	Casitas B lineage lymphoma
<b>cAMP</b>	Adenosín-5'-monofosfato cíclico
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>C3G</b>	Proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina
<b>cGMP</b>	Guanosín-5'-monofosfato complementario
<b>CIA</b>	Cloroformo / alcohol isoamílico
<b>CK</b>	Caseína kinasa
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CrkII</b>	Proteína reguladora de TC10
<b>dATP</b>	Desoxiadenosín-5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidín-5'-trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dTTP</b>	Desoxitimidín-5'-trifosfato
<b>2-DOG</b>	2-desoxi-D-[1- <sup>3</sup> H]glucosa
<b>dpm</b>	Desintegraciones por minuto
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilén diamino tetraacético
<b>eIF</b>	Factor de iniciación de la síntesis proteica en eucariotas



## Abreviaturas

---

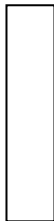
<b>Exo</b>	Proteína componente del complejo de exocitosis
<b>ERK</b>	Kinasa regulada por señales extracelulares
<b>Gab1</b>	Proteína de unión a Grb2
<b>GLUTs</b>	Transportadores de glucosa
<b>Grb2</b>	Proteína adaptadora de unión al receptor del factor de crecimiento
<b>GSK</b>	Glucógeno sintasa kinasa
<b>Hepes</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazín-etil-sulfónico
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo I
<b>IGF-II</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo II
<b>IH</b>	Dominios de homología IRS
<b>ip</b>	Vía intraperitoneal
<b>iv</b>	Vía intravenosa
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRAP</b>	Aminopeptidasa activada por insulina
<b>IRR</b>	Receptor relacionado con la insulina
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KD</b>	Dominio kinasa
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAR</b>	Proteína relacionada con el antígeno común de leucocitos
<b>MAGI</b>	Proteína de membrana de células epiteliales
<b>MAPKs</b>	Proteínas kinasas activadas por mitógenos
<b>MC</b>	Extracto crudo de membranas
<b>MEK</b>	MAPK kinasa

<b>MI</b>	Membranas intracelulares
<b>MOPS</b>	Ácido 4-morfolinopropanosulfónico
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>mTOR</b>	Proteína diana de rapamicina en mamíferos
<b>PAC</b>	Complejo asociado a PTEN
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>PD-1</b>	Fosfodiesterasa-1
<b>PDK</b>	Kinasa dependiente de PIP <sub>3</sub>
<b>PH</b>	Dominio de homología a pleckstrina
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PIKKs</b>	Kinasas relacionadas con la PI3Kinasa
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-kinasa
<b>PIP</b>	Fosfatidilinositol 3-fosfato
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol-(3, 4)-difosfato
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Fosfatidilinositol-(3, 4, 5)-trifosfato
<b>PKB / Akt</b>	Proteína kinasa B
<b>PKC</b>	Proteína kinasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
<b>PRK</b>	Proteína relacionada con la PKC
<b>p70S6K</b>	Kinasa de 70 kDa de la proteína ribosomial S6
<b>PS</b>	Dominio pseudosustrato
<b>PTB</b>	Dominio de unión a fosfotirosina
<b>PTEN</b>	Fosfatasa con homología a tensina

## Abreviaturas

---

<b>PTK</b>	Proteína tirosina kinasa
<b>PTP</b>	Proteína tirosina fosfatasa
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTK</b>	Receptor tirosina kinasa
<b>SDS</b>	Lauril sulfato sódico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>Ser</b>	Serina
<b>SH2</b>	Dominio de homología src 2
<b>SH3</b>	Dominio de homología src 3
<b>SHIP</b>	Fosfatasa de inositoles 5' fosfato
<b>SHP2</b>	Fosfotirosina fosfatasa
<b>SNARE</b>	Proteína asociada al receptor de sinaptosomas
<b>SOCS</b>	Supresores de las señales mediadas por citoquinas
<b>SOS</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>TC10</b>	Proteína de unión a GTP de la familia Rho
<b>Tir</b>	Tirosina
<b>Tre</b>	Treonina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroximetil)-amino metano
<b>UI</b>	Unidad internacional
<b>VAMP</b>	Proteína de membrana asociada a vesículas



---

## **AGRADECIMIENTOS**



Durante estos años, he recibido ayuda y apoyo de tantas personas que no sabría por donde empezar... y quisiera que esta parte de la Tesis sirviera además de agradecimiento, como recuerdo de tan buenos momentos que he pasado estos años, ¡con todos vosotros!

En primer lugar, agradecer a Fernando Escrivá, el director de mi Tesis todo su apoyo, ayuda y paciencia durante todo este tiempo, así como sus consejos que de tanto me han servido en muchos momentos.

Gracias a Manuel Benito, Director de este Departamento, por ser siempre tan atento y por permitirme formar parte de los becarios de este Centro.

En general, gracias a todos los profesores de este Departamento, en especial a Pilar González, Pilar Iniesta, Mabel, Almudena, Ángel Jiménez y Margarita Lorenzo por prestarme siempre su colaboración y sobre todo, por su amabilidad.

Gracias a Lisardo y a Paloma, por su enorme generosidad y disponibilidad que tanto me ha ayudado. Gracias también a Ángela y a Luis.

Durante la realización de esta Tesis, me licencié en Bioquímica y ésto sin duda, no fue tan solo mérito mío; así es que primero de todo, gracias de nuevo a Fernando por permitirme compaginar estos estudios con mi Tesis y ser tan comprensivo en las épocas de prácticas y exámenes; bueno, y por animarme en todo. En esa época tan dura, son muchos los compañeros y amigos y como lo prometido es deuda... ¿os acordáis? Pues... ¡allá voy! Javi, Toño, Peri, Noelia, Ana, Marian, los Nachos y mi “mejor amiga de Bioquímica”, ¡Raquel! Gracias a todos, cuando me licencié os lo dije pero de nuevo quiero y ahora uno por uno volver a agradecer.

Nacho (rubio), mi compañero de prácticas del primer año y uno de mis mejores amigos, gracias por tener tanta paciencia (cuando yo llegaba tarde a las prácticas... ¿recuerdas? si, el atasco en paraninfo...), bueno y además de prácticas, compañero de trabajos que aún recuerdo ese sábado en la farmacia con aquel informe (no sé exactamente de qué asignatura, pero sí

## *Agradecimientos*

---

recuerdo que se nos borró todo del ordenador y el humor que tu le echabas... (yo no tanto...).

Nacho (moreno), compañero además, de biblioteca y de muchos ratos, siempre dispuesto a dejarme todos los apuntes y a informarme de todo... te lo dije una vez y te vuelvo a insistir...sin Javi y sin ti, ¡no lo hubiera conseguido!

Javi, mi compañero de prácticas de segundo año, quizás el más duro... menuda época tuviste que pasar, aunque, nos reíamos, ¿eh? Como me hacías de rabiar... bueno, y aún sigues... Eres un tío estupendo y puedo decir, que de los más generosos que he conocido nunca.

Raquel, ¿que te voy a decir? Pues que sigamos como hasta ahora, ¡esta claro!

Y a todos los demás, pues lo mismo, que ¡¡¡mil gracias!!!

Durante estos dos años de la licenciatura también fueron cruciales para mí los famosos fines de semana “historia” y “CEU”, y el ánimo que mucha de la gente que estudió conmigo me ofreció semana tras semana; así es que de nuevo, gracias y aquí incluyo a Cristina, Pepe, Marta, Eugenia, Pilar, Raquel, Nacho, y demás compañeros de biblioteca. Perdonad por faltar al primer café pero ya sabéis lo que me costaba levantarme... y menos mal que Eugenia arramplaba con la mitad de sitios de la biblio que si no...

No puedo olvidarme de mis compañeros de farmacia, ¡de mis amigos! Poli, Marta, Arancha, Clara, Enrique, Cristian, Cristina, Marga y también, por supuesto (aunque no farmacéutico sino informático), a Alberto, ¡a todos muchas gracias!

¿Y tú que? ¿te pensabas que no me iba a acordar? Pues aunque no estés aquí, me acuerdo, ¡y mucho! De mi vecina, “alucina”, Ana Madrid... ¡lo más! Todo lo mejor para ti, ¡está claro!¿Y del resto de mis vecinas? ¡Almu! Gracias por ser tan buena amiga, y a las demás, a todas, también os lo agradezco.

Leito, Ana, Clara, Poli, Cristian, Enrique, Paula, Raquel, Peri, Patricia, ¿os acordáis del “momento DEA”? Gracias por estar conmigo aquella tarde en Químicas y prepararos para éste que va a ser mucho peor...¡menudos nervios!

Más que compañeros, quiero agradecer a los amigos que he ido conociendo en este Departamento durante todos estos años. Todos me habéis ayudado y animado mucho día a día, espero no olvidarme de ninguno: Nuria (a la primera que conocí y que tanto me ayudó), Sonsoles (con sus siempre alegres “buenos días”), Paqui (sin duda la más salada), Olga (como ves, sigo tu consejo: lo dejo todo por escrito), Mónica (ya se te echa en falta por aquí), Alberto (compañero pre-Tesis), Cristina de Álvaro (siempre tan dispuesta a ayudar, escuchar y animar), Miguel, Cristina García-Aranda (son ya muchos años), Antonio (ejemplar), Jimena (la “mejor”), Águeda (juntas durante su beca de colaboración), Maribel (siempre tan amable y dispuesta a ayudar, y eso se agradece, y ¡mucho!), Ángel (de verdad gracias, por ser tan comprensivo con mi alergia y realizar, además de tu trabajo, parte del mío). También Rafa, Gemita, Dani, Carmen, Susana, Amalia, Nora, Salva, Paco, Adoración y Oscar. Siempre que he necesitado algo habéis estado ahí, ¡MUCHAS GRACIAS!

Quisiera hacer especial mención a Miriam ya que empezamos juntas y con ella he pasado muchos momentos como la tarde lluviosa de la “ encuadernación ” (tú ponle un canutillo y ya está...). Me has ayudado mucho en todo y eres una gran persona y amiga. Espero que tengas mucha suerte en tu experiencia postdoctoral, ¡seguro que triunfas! Paqui, Miriam, ¡hay que hacer un poco más de “ antaño ”!

No puedo dejar de agradecer muchos de mis conocimientos en el maravilloso mundo de la informática que tanto me han servido en la realización de este trabajo a un buen compañero y amigo, Rafa, también a ti te irá muy bien, ya verás; también quisiera agradecer a Miguel su ayuda y sobre todo su amistad en estos cuatro años y además de agradecerte, desearte todo lo mejor y muchísima suerte en esto de la investigación donde, ten por seguro que ¡vales mucho!

Gracias a Carmen Álvarez por permitirme formar parte de este grupo y por su ayuda y apoyo en muchas ocasiones y gracias también a María Ángeles y demás miembros de mi grupo, de las que tanto he aprendido



## *Agradecimientos*

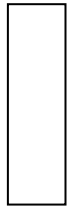
---

durante estos años, en especial a María Agote, sin la cual parte de este trabajo no podría haberse realizado.

Una de las épocas más significantes en este periodo para mí fue mi estancia en Toulouse en donde aprendí muchas cosas, entre ellas francés y quiero agradecer enormemente a Luc Penicaud permitirme formar parte de su grupo, y su amabilidad y atención en los meses que estuve allí. Fueron muchas las personas que me ayudaron a que ahora recuerde esa estancia tan positiva: Allen, Manolita, Mari Alba, Mamen, Arnaud y Katie, merci beaucoup! Quiero agradecer especialmente a Geraldine, mi compañera de “manipe”, por su paciencia (logramos entendernos en francés, ¡qué dolores de cabeza al principio!) su amistad y los buenos momentos que pasamos trabajando juntas y lo bien que nos entendimos, aunque siempre andábamos en retard... eso sí, al final, fuera como fuese llegábamos (te adaptaste a mi horario, ¿eh? Y esos viernes, siempre las últimas en salir...).

He dejado para el final la parte sin duda más importante de mi vida, mi familia. Mi prima (mi medio hermana a todos los efectos...), qué bien lo pasamos en Toulouse, ¿eh? Mis abuelos, Paz y Luis, que os tengo siempre presentes, Claudia y Jesús, mi llamada más alegre de todas las mañanas... bueno abuelita, lo de alegre siempre que no me dices eso de “...ya sabes...” y “¿Qué fa?”, no sé que más te puedo decir ya que tú siempre insistes en eso de “a mí no se me dice gracias”, y tú también sabes lo que te digo yo, ¿no? No has perdido memoria. Pues lo dicho, ¡a la que más!

Y por último, como dices tú, lo primero de todo y más importante en mi vida...¡¡¡mis padres!!! No sabría ni por dónde empezar, ya que las aportaciones son todas y espero se reflejen como merecen, así es que infinitamente gracias porque no podría ser más feliz y que sigamos como hasta ahora teniendo claro qué es lo importante y ¡qué es lo primero!



---

## ÍNDICE



## **I.- INTRODUCCIÓN**

<b>1.-La subnutrición en la actualidad</b>	<b>1</b>
1.1.- La subnutrición y el sistema cardiovascular	1
1.2.- La subnutrición y la diabetes de tipo 2	2
<b>2.- Hipótesis del fenotipo ahorrativo</b>	<b>3</b>
2.1.- Malnutrición y sensibilidad a la insulina	7
<b>3.- Modelos animales de subnutrición iniciada en etapa perinatal</b>	<b>9</b>
<b>4.- Importancia del metabolismo de la glucosa en los tejidos</b>	<b>11</b>
<b>5.- Acciones generales de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa</b>	<b>13</b>
<b>6.- Vía de señales de la insulina</b>	<b>14</b>
6.1.- El receptor de insulina	14
6.1.1.- Principales sustratos del receptor de insulina	16
A) Familia de los IRSs	17
B) Proteínas Shc	19
6.2.-Proteínas con dominios SH2 en la vía de señales insulínica	19
PI 3-Kinasa	19
Proteína adaptadora Grb2	21
6.3.- Proteínas quinasas de restos de Ser/Tre de la vía de señales insulínica	22
PKB	22
PDK1	23
GSK3	24
PKC	26
6.4.- Señales moleculares implicadas en la biosíntesis proteica	29
mTOR	29
p70S6Kinasa	30
4EBP1	31
6.5.- Protein-tirosin fosfatasas (PTPasas)	31
LAR	31
PTP1B	31

6.6.- PTEN	33
6.7.- Vía CAP	36
<b>7.- GLUTs</b>	<b>37</b>
7.1.- Translocación del GLUT-4 regulada por insulina	39
7.2.- Acción de la insulina sobre la actividad intrínseca del GLUT-4	42
7.3.- Acción de la insulina sobre la expresión del GLUT-4	43

## **II.- OBJETIVOS**

45

## **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1.- Animales y dieta</b>	<b>47</b>
1.1. Composición del alimento suministrado	47
1.2. Pauta de subnutrición	48
<b>2.- Determinaciones analíticas</b>	<b>49</b>
2.1.- Análisis de la glucosa en sangre total o desproteinizada	49
2.2.- Valoración de proteínas	50
2.3.- Análisis de la insulina plasmática	50
<b>3.- Tratamiento de las ratas con insulina</b>	<b>51</b>
3.1.- Clamp hiperinsulinémico-euglucémico	52
3.2.- Test de tolerancia a la glucosa	52
<b>4.- Determinación del consumo tisular de glucosa</b>	<b>53</b>
4.1. Administración de 2-desoxi-D-[1- <sup>3</sup> H]glucosa (2DOG) tritiada y toma de muestras	53
4.2.- Fundamento de la cuantificación de la 2DOG captada por los tejidos	54
4.3.- Evaluación de la relación plasmática 2DOG tritiada/glucosa	55
4.4.- Evaluación de la 2DOG-6-Fosfato acumulada	56
<b>5.- Fraccionamiento de los músculos esquelético y cardíaco de las ratas adultas</b>	<b>56</b>
<b>6.- Fraccionamiento del músculo esquelético de las ratas lactantes</b>	<b>57</b>

<b>7.- Valoración de las actividades de Fosfodiesterasa-I y 5' - Nucleotidasa</b>	<b>58</b>
<b>8.- Desarrollo del procedimiento del “Western Blotting”</b>	<b>58</b>
8.1.- Preparación de las muestras	58
8.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membranas de PVDF	59
8.3.- Inmunodetección de las proteínas	59
8.4.- Borrado de las membranas de PVDF previamente transferidas	60
9.- Obtención de lisados titulares	60
<b>10.- Inmunoprecipitaciones</b>	<b>61</b>
<b>11.- Determinación de la actividad de la PI 3-Kinasa en músculo y corazón</b>	<b>62</b>
<b>12.- Aislamiento del RNA y análisis del mRNA por “Northern Blotting”</b>	<b>62</b>
12.1.- Extracción del RNA	63
12.2.- Conservación de las muestras de RNA y recuperación posterior	64
12.3.- Valoración de las muestras de RNA	64
12.4.- Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membranas de Nylon	64
<b>13.- Obtención del DNA plasmídico para transfección de las sondas de cDNA</b>	<b>65</b>
13.1.- Procedencia y características de las sondas y plásmidos	65
13.2.- Preparación de bacterias competentes	66
13.3.- Transformación de bacterias competentes	66
13.4.- Crecimiento bacteriano, extracción del DNA plasmídico y purificación del cDNA	67
<b>14.- Marcaje radioactivo de las sondas</b>	<b>68</b>
<b>15.- Hibridaciones</b>	<b>69</b>
15.1.- Prehibridación	69
15.2.- Hibridación de la membrana con las sondas	69
15.3.- Lavado y detección de los híbridos radioactivos	69

15.4.- Rehibridación de las membranas de nylon	70
<b>16.- Expresión de resultados</b>	<b>70</b>

#### **IV.- RESULTADOS**

##### **1.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA ADULTA** **73**

1.1.- Efecto de la subnutrición sobre el crecimiento	73
1.2.- Efecto de la subnutrición sobre la glucemia, insulinemia y captación muscular de glucosa	74
1.3.- Fraccionamiento del músculo gastrocnemius	76
1.4.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de GLUT-4 y GLUT-1 en el gastrocnemius	78
1.5.- Contenido del mRNA para GLUT-4 y GLUT-1 en el gastrocnemius	79
1.6.- Efecto de la subnutrición sobre la capacidad de translocación del GLUT-4	80
1.7.- Análisis del contenido de GLUT-3 y GLUT-5 en el músculo gastrocnemius	81
1.8.- Análisis de la vía de señales insulínica en el músculo esquelético	82
1.9.- Actividad de la fosfatidilinositol 3-kinasa	83

##### **2.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATA ADULTA** **85**

2.1.- Efecto de la restricción nutricional sobre el peso del corazón	85
2.2.- Efecto de la subnutrición sobre la captación de glucosa por el corazón	86
2.3.- Fraccionamiento de las membranas del músculo cardíaco	87
2.4.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3 en el músculo cardíaco	89

---

2.5.- Contenido cardíaco del mRNA para GLUT-4 y GLUT-1	90
2.6.- Efectos de la insulina sobre la translocación del GLUT-4 y GLUT-1	91
2.7.-Análisis de la vía de señales insulínica	93
2.8.- Actividad de la fosfatidilinositol 3 kinasa	93
<b>3.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA LACTANTE</b>	<b>95</b>
3.1.- Efecto de la subnutrición sobre la tolerancia a la glucosa	95
3.2.- Efecto de la subnutrición sobre los transportadores musculares de glucosa	96
3.3.- Fraccionamiento del músculo esquelético	97
3.4.- Efecto de la subnutrición sobre la translocación del GLUT-4	98
3.5.- Contenido y fosforilación del receptor de insulina	99
3.6.- Contenido y fosforilación del IRS-1	100
3.7.- Contenido muscular de IRS-2	101
3.8.- Contenido muscular de la PI 3-kinasa y su asociación a IRS-1 e IRS-2	101
3.9.- Contenido muscular de las kinasas PKB (Akt) y PKC $\zeta/\lambda$	103
3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la actividad de la PI 3-kinasa	104
3.11.- Contenido muscular de fosfo-GSK3 $\alpha$ y $\beta$ ; efecto de la subnutrición	105
3.12.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de p70S6K	106
3.13.- Contenido muscular de p38MAPK y efecto de la subnutrición	107
3.14.- Cantidad total de PTP1B en el músculo de las ratas lactantes; asociaciones al receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2	108



**4.- ESTUDIO EN EL HÍGADO DE RATA LACTANTE 111**

4.1.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de GLUT-2 y GLUT-1	111
4.2.- Efecto de la subnutrición sobre el receptor hepático de insulina	111
4.3.- Contenido hepático de IRS-1 e IRS-2. Asociación del IRS-2 al receptor de insulina	112
4.4.- Contenido hepático de la subunidad p85 de la PI 3-kinasa	112
4.5.-Contenido hepático de PKB	114
4.6.- Efecto de la subnutrición sobre la fosfo-GSK3 hepática	114
4.7.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de p70S6K	115
4.8.- Análisis de las fosfatasa PTP-1B y PTEN hepáticas	117
4.9.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de SOCS-1 y SOCS-3	117

**V.- DISCUSIÓN**

**1.-ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA ADULTA 119**

1.1.- Efecto de la subnutrición crónica sobre la tolerancia a la glucosa en ratas adultas	120
1.2.- Efecto de la subnutrición sobre la captación tisular de glucosa	121
1.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de GLUT-4 y GLUT-1	120
1.4.- Translocación del GLUT-4	123
1.5.- Contenido muscular de otras isoformas de GLUTs	123
1.6.-Posible papel de la actividad intrínseca del GLUT-4	124

1.7.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica de señales	125
1.8.- Efecto de la subnutrición sobre la Fosfodiesterasa I muscular	127
<b>2.-ESTUDIO EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATA ADULTA</b>	<b>129</b>
2.1.- Efecto de la subnutrición sobre el consumo de glucosa en el corazón	130
2.2.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de transportadores de glucosa en el corazón	131
2.3.- Distribución subcelular del GLUT-4 y GLUT-1 en el miocardio	132
2.4.- Translocación del GLUT-4 en el músculo cardíaco	133
2.5.- Translocación del GLUT-1 en el músculo cardíaco	133
2.6.- Papel del GLUT-1 en la captación de glucosa por el corazón	134
2.7.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica de señales	135
2.8.- Efecto de la subnutrición sobre la Fosfodiesterasa-I cardíaca	136
<b>3.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA LACTANTE</b>	<b>139</b>
3.1.- Insulinemia y glucemia características de la etapa lactante: efecto de la subnutrición	140
3.2.- Tolerancia a la glucosa de las ratas lactantes subnutridas	142
3.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de transportadores de glucosa	143
3.4.- Efecto de la subnutrición sobre la translocación del GLUT-4	145
3.5.- Efecto de la subnutrición sobre la actividad intrínseca del GLUT-4	146

3.6.- Efecto de la subnutrición sobre los componentes próximos de la vía de señales insulínica	148
3.7.- Efecto de la subnutrición sobre la PI 3-kinasa	149
3.8.- Efecto de la subnutrición sobre señales avanzadas de la vía insulínica	151
3.9.- Efecto de la subnutrición sobre la p70S6-Kinasa	153
3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la PTP-1B	155
b) Contenido total de PTP-1B	155
c) Asociación de PTP-1B al receptor de insulina	156
c) Localización subcelular de los complejos PTP-1B- receptor	155
d) Regulación de la actividad de la PTP-1B	156
(1) Fosforilación de la PTP-1B	156
(2) Oxidación de la PTP-1B	157
e) Interacción de la PTP-1B con los IRSs	157
<b>4.- ESTUDIO EN EL HIGADO DE RATA LACTANTE</b>	<b>161</b>
4.1.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica en el hígado	162
4.2.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de PTEN	165
4.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de SOCS	167
4.4.- Efecto de la subnutrición sobre los transportadores de glucosa hepáticos	168
<b><u>VI.- CONCLUSIONES</u></b>	<b>171</b>
<b><u>VII.- BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>173</b>

**I**

---

**INTRODUCCIÓN**



## **1.- La subnutrición en la actualidad**

La subnutrición mantiene una elevada prevalencia en el mundo: se calcula que hay 815 millones de personas que sólo tienen acceso a cantidades limitadas de alimentos y padecen hambre crónica. Según datos de la Organización de Naciones Unidas, en 2015 podría haber todavía 580 millones de personas sometidas a subnutrición de forma crónica. Es una condición más notoria en los países subdesarrollados, sobre todo en los que son sujetos de conflictos armados o desastres naturales; pero también aparece en las sociedades ricas: en individuos marginados, en algunos tipos de pacientes hospitalizados, etc. Constituye, por lo tanto, un problema sanitario muy significativo (Toole y Waldman, 1997; Corish et al., 2000).

El “status” nutricional es extremadamente importante en las fases de crecimiento. La Organización Mundial de la Salud calcula que 175 millones de niños menores de 5 años sufren malnutrición en países en vías de desarrollo. La subnutrición establecida durante esas etapas de inmadurez repercute negativamente sobre muchos procesos fisiológicos y metabólicos que implican a diferentes sistemas del organismo: inmunitario, nervioso, cardiovascular, etc. Como consecuencia, la subnutrición puede favorecer, o incluso provocar directamente, el desarrollo de una amplia variedad de patologías. En muchas de ellas, la relación causal todavía no se conoce, mientras que en otras esa relación ha sido demostrada pero no están bien definidos los mecanismos moleculares implicados. En función de los objetivos de este trabajo, hay que destacar las repercusiones de la subnutrición sobre la homeostasis glucídica y sobre la patología más importante derivada de la alteración de ésta, la diabetes mellitus, así como las consecuencias de un déficit precoz de nutrientes sobre el sistema cardiovascular.

### **1.1.- La subnutrición y el sistema cardiovascular**

El sistema cardiovascular puede afectarse por la restricción nutricional (Cicogna et al., 2000). La enfermedad cardiovascular está relacionada con el papel que ejercen determinados factores ambientales presentes con frecuencia en la vida adulta, como la alimentación (rica en

grasas), tóxicos (tabaco) o la escasa actividad física (sedentarismo). Aunque estos factores influyen notablemente en el desarrollo y evolución de esa patología, existen otras causas endógenas que afectan al metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono o a la presión arterial; son causas derivadas de la dotación genética, difíciles de modificar y por tanto, de especial relevancia en el desarrollo de estas patologías cardiovasculares. Esta carga genética comienza a desarrollar su programa durante la etapa intrauterina del individuo.

Se ha establecido que la exposición a una subnutrición materna durante la fase intrauterina juega un papel importante en la aparición posterior de alteraciones cardiovasculares (Barker et al., 1993; Holemans et al., 1999; Massin et al., 2001). Así, algunas patologías coronarias están ligadas a déficits nutricionales durante las etapas del desarrollo (Barker, 1999b).

## **1.2.- La subnutrición y la diabetes de tipo 2**

La Federación Internacional de la Diabetes ha constatado que esta enfermedad es una pandemia en crecimiento; se estima que para el año 2025 la cifra de diabéticos en el mundo se aproximará a los 300 millones.

La diabetes mellitus puede considerarse un estado catabólico, ocasionado por una deficiencia de insulina (diabetes de tipo 1) o de acciones insulínicas (diabetes de tipo 2). Se trata de una alteración metabólica importante, que repercute prácticamente sobre cada órgano del cuerpo y su funcionamiento.

La diabetes de tipo 2 afecta principalmente a personas adultas. Se caracteriza por dos defectos fisiopatológicos: secreción alterada de insulina y resistencia a esta hormona, es decir, una reducción de la sensibilidad tisular frente a ella. Los tejidos se ven incapacitados para responder de forma adecuada a la insulina.

Aunque hay factores genéticos predeterminantes de la diabetes de tipo 2, ésta se encuentra muy relacionada con algunas circunstancias ambientales; por ejemplo, la obesidad resulta ser crucial y constituye al respecto el principal factor de riesgo. Sin embargo, aunque parezca paradójico, una deficiencia nutricional establecida en etapas de inmadurez también puede conducir, en el curso del tiempo, a esta patología. Este hecho

puede ser considerado en el siguiente contexto, más general: hay aspectos del metabolismo que se encuentran programados desde las etapas perinatales, de modo que las alteraciones en esa programación pueden ocasionar patologías posteriores; es una idea conocida como “hipótesis del fenotipo ahorrativo” que se ha aplicado para explicar una posible etiología de la diabetes mellitus (Hales y Barker, 1992; Holness et al., 2000).

## **2.- Hipótesis del fenotipo ahorrativo:**

Esta hipótesis surgió de un estudio sobre el peso a término de varones nacidos entre 1920 y 1930 en Hertfordshire, Reino Unido; los que presentaron pesos más bajos en el nacimiento mostraron posteriormente, en su vida adulta, la mayor prevalencia de intolerancia a la glucosa y de diabetes de tipo 2 (Barker et al., 1989; Hales et al., 1991; Osmond et al., 1993).

En consecuencia, Hales y Barker propusieron en 1992 la hipótesis del fenotipo ahorrativo, explicando en ella que la programación del metabolismo tiene lugar durante la etapa fetal y la primera infancia; de modo que algunas alteraciones en dichas etapas pueden ser la causa de patologías posteriores (Hales y Barker, 1992); en la Fig. 1 se presentan estas ideas con respecto a las repercusiones de la malnutrición.

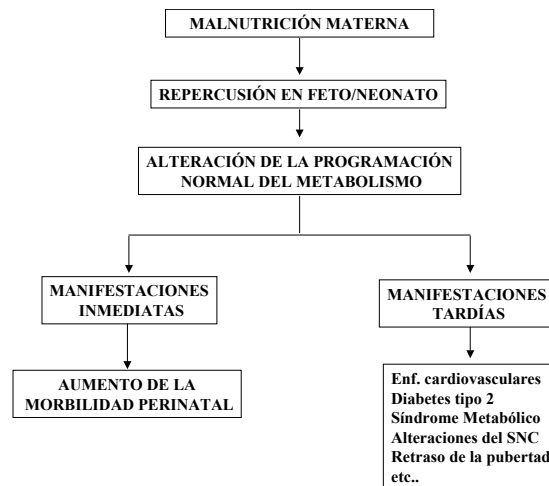


Figura 1: Representación esquemática de la hipótesis del fenotipo ahorrativo: adaptada de Hales y Barker, 1992.



La malnutrición materna durante la gestación produce una alteración en el desarrollo fetal. Esta situación puede provocar una programación anormal de diversas vías metabólicas y tener consecuencias a corto plazo, con un aumento de la morbilidad perinatal, o a largo plazo, con un incremento de ciertas patologías en la edad adulta; entre ellas, enfermedades del sistema cardiovascular, diabetes de tipo 2, alteraciones del sistema nervioso central, etc.

Para explicar estas repercusiones, la hipótesis sugiere que en periodos de restricción nutricional, el feto dirige los nutrientes hacia órganos esenciales, como el cerebro, a expensas de otros como el páncreas, músculo e hígado. Estas adaptaciones metabólicas pueden provocar *a posteriori* consecuencias negativas en dichos órganos. Un ejemplo claro es el conjunto de deficiencias que la subnutrición materna provoca sobre el páncreas endocrino fetal, resumidas en la Fig. 2.

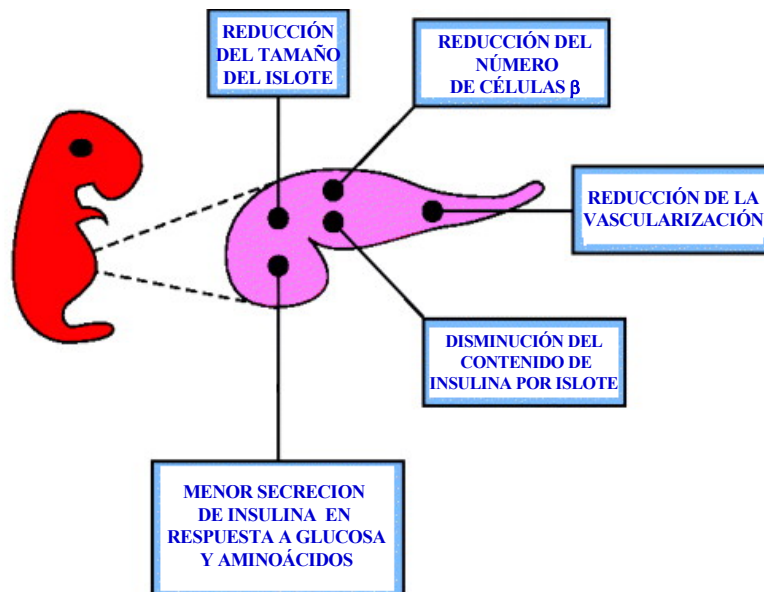


Figura 2: Influencia de una alimentación hipoproteica durante la gestación en el desarrollo funcional y estructural del páncreas endocrino; adaptado de Holness et al., 2000.

Esta reducción en el número de células  $\beta$  pancreáticas, en la vascularización del islote, en su contenido de insulina, etc., explican el déficit insulino-secretor y la consecuente hipoinsulinemia que aparecen más tarde en estos individuos, en comparación con los que se desarrollan en condiciones óptimas de alimentación.

Muchos estudios posteriores han confirmado que diferentes características del neonato como la delgadez excesiva, el bajo peso a término y la talla muy pequeña, están asociadas al desarrollo posterior de enfermedades cardiovasculares o diabetes de tipo 2; ello es una consecuencia de las adaptaciones cardiovasculares, metabólicas o endocrinas que el feto desarrolla frente a un estado de déficit nutricional (Barker, 1999a).

Entre los diversos estudios que muestran las repercusiones del déficit nutricional intrauterino sobre la homeostasis glucídica en el ser humano, destacaremos por su carácter ilustrativo los dos siguientes:

A) En Holanda, a mediados de 1944, los alemanes prohibieron la circulación de mercancías por tren y a través de los canales, lo que hizo difícil la llegada de alimentos desde el medio rural (en donde se producían) a las ciudades. En estas circunstancias tuvo que racionarse la comida y la ingesta media pasó de unas 1800 calorías / día en 1943, a unas 400 durante la primera mitad de 1945; un régimen alimenticio normal supone unas 2200 calorías / día y un régimen severo de adelgazamiento supone unas 1300 calorías diarias. A pesar de que tanto a los niños como a las gestantes se les suministró cierta cantidad extra, el aporte calórico global siguió siendo insuficiente, así que la mayoría de la población experimentó hambre aguda. Esta situación se mantuvo hasta Junio de 1945 y a partir de esta fecha la ingesta media comenzó a estar por encima de las 2000 calorías diarias.

Unos 50 años después, durante la década de los 90, y hasta la actualidad, se han llevado a cabo numerosos estudios estadístico-epidemiológicos sobre la población holandesa adulta nacida de mujeres que se encontraban en plena gestación en esa época de hambre. Estas personas sufrieron retraso en el crecimiento intrauterino y está registrado que al nacer presentaron bajo peso, talla corta, una circunferencia craneal reducida, etc. Pues bien: se ha demostrado que una fracción significativa de esta población presentaba alteraciones metabólicas como: obesidad, intolerancia a la

glucosa y diabetes de tipo 2, así como una serie de patologías asociadas típicamente a esta enfermedad (sobre todo del sistema cardiovascular). (Roseboom et al., 2001a; Roseboom et al., 2001b; Roseboom et al., 2003).

B) El otro estudio destacable fue realizado hace unos años en Lyon (Jaquet et al., 2001); en éste se compararon dos grupos de individuos de la misma edad (25 años) y con los mismos datos antropométricos: el mismo peso y talla, la misma cantidad de tejido adiposo y sin alteraciones clínicas; la única diferencia importante estaba en el peso medio que presentaron en el momento de su nacimiento: 3,4 Kg en un grupo y 2,4 Kg en el otro. Estas personas se sometieron voluntariamente a la siguiente prueba: recibieron una infusión intravenosa de insulina, administrada por espacio de tres horas, para cuantificar la respuesta a esta hormona con respecto al metabolismo de la glucosa. Tanto la captación global como los destinos oxidativo y no oxidativo de este sustrato aumentaron mucho menos en las personas que habían presentado bajo peso al nacimiento (Fig. 3). Este resultado muestra claramente que dicha circunstancia puede producir, mucho más tarde, un cuadro de resistencia a la insulina, que suele ser el prelude de una diabetes tipo 2 clínicamente abierta.

### CAPTACIÓN DE GLUCOSA BAJO ESTÍMULO INSULÍNICO

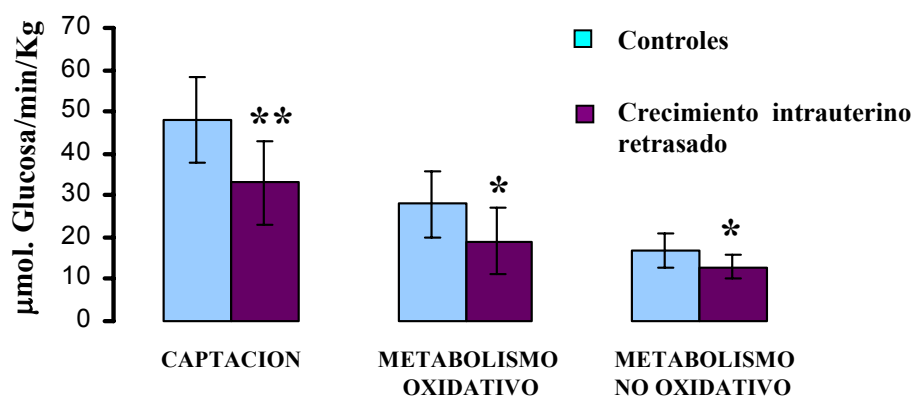


Figura 3: Adaptado de Jaquet et al., 2001. Las diferencias se expresan como: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

## 2.1.- Malnutrición y sensibilidad a la insulina

Para que las acciones insulínicas se produzcan adecuadamente no sólo se requiere una correcta secreción de la hormona sino que, además, sus efectos en los distintos tejidos se induzcan con la intensidad apropiada. La subnutrición, como hemos visto, altera la primera etapa de estas dos condiciones pero, además, también influye sobre la capacidad de respuesta tisular a la insulina. Se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de determinar las repercusiones sobre la sensibilidad hormonal cuyo la condición nutricional restrictiva se establece en etapas de inmadurez. Merecen destacarse al respecto los trabajos del grupo de Barker y colaboradores, que han publicado una serie de resultados en esa línea. En su modelo experimental, en la rata, estos autores suministran una dieta hipoproteica durante la gestación y, en algunos casos, también durante la lactancia; de ese modo, la progenie de estos animales experimenta una subnutrición indirecta, justamente en etapas que son claves para su desarrollo. Estos autores han estudiado los efectos de la restricción nutricional sobre la homeostasis glucídica *a posteriori*; es decir, cuando el desarrollo ya se ha completado. Han concluido que las consecuencias de la subnutrición, en cuanto a la capacidad de respuesta a la insulina, dependen de la edad de las ratas que fueron precozmente subnutridas. Como se indica esquemáticamente en la Fig. 4, hacia los tres meses de vida estos animales son hipoinsulinémicos y, sin embargo, presentan una tolerancia a la glucosa incrementada; dicha tolerancia se normaliza a los quince meses, aproximadamente; pero más adelante, una fracción significativa de las ratas subnutridas ha desarrollado resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y diabetes (Hales y Barker, 2001). Hay que subrayar el hecho de que cuando se llega a esa última condición, el cuadro patológico establecido es similar al que se produce en muchos seres humanos malnutridos en etapas de inmadurez, como demuestran los estudios epidemiológicos que hemos referido en el apartado anterior.

En esa pauta de acontecimientos sobresalen dos hechos: a) la subnutrición induce hipoinsulinemia; ésta deriva del deterioro del páncreas endocrino causado por la restricción nutricional precoz, como hemos indicado anteriormente (Fig. 2) b) en las primeras fases, la tolerancia a la glucosa de las ratas subnutridas se mantiene normal, o incluso está

incrementada, a pesar de su déficit insulínico. Esto último sugirió que la subnutrición podría aumentar la capacidad de respuesta a la hormona. Probablemente, esa mayor sensibilidad a la insulina permite mejorar el aprovechamiento de los sustratos nutritivos, cuya disponibilidad es limitada, resultando ser una adaptación favorable al menos durante el tiempo en que persiste la restricción. Según la hipótesis del fenotipo ahorrativo, el problema surgiría cuando esa adaptación –que quedaría en cierta manera “programada”- coincidiese *a posteriori* con una normalización de la ingesta, o con un aporte excesivo de nutrientes; en tales casos esa adaptación primaria no sería adecuada para el nuevo “status” nutricional, y ello podría conducir a una alteración de la homeostasis glucídica que constituiría el prelude de la diabetes. Así debe ocurrir en las personas cuya malnutrición estuvo delimitada exclusivamente a las etapas de inmadurez, a las cuales nos hemos referido anteriormente. En cambio, en los seres humanos sometidos a un régimen nutricional pobre a lo largo de toda su vida, como sucede típicamente en poblaciones de países subdesarrollados, esa adaptación inicialmente “programada” sería siempre apropiada, es decir, se ajustaría bien al carácter crónico de su escasez nutricional; de hecho, en esas poblaciones, la obesidad y la diabetes, son patologías menos frecuentes.



Figura 4: Esquema que resume los estudios realizados por Hales y Barker.

### **3.- Modelos animales de subnutrición iniciada en etapa perinatal**

Uno de los problemas claves que se plantean al abordar un estudio experimental sobre la subnutrición es la elección de la especie animal objeto de dicho estudio. La literatura científica ofrece una amplia gama de posibilidades a este respecto, pero entre los muchos animales utilizados (cerdo, conejo, rata, mono, ratón...) la rata es el más habitual y por ello la mayoría de los datos publicados se refieren a ésta.

Otro problema importante es la elección del momento del ciclo vital en el que se inicia la subnutrición. En el ser humano es muy frecuente que ésta comience en etapas precoces del desarrollo; lo más habitual, en realidad, es que los niños malnutridos procedan de madres que durante su embarazo también experimentaron algún tipo de carencia alimentaria. Así es que un modelo conveniente debería incluir la gestación, o parte de ella; en todo caso, la subnutrición debería encontrarse establecida al menos ya durante la lactancia.

Los métodos más corrientes para inducir una subnutrición experimental en etapa perinatal, en la rata, son los siguientes:

- Ligadura de la arteria uterina
- Cauterización de pezones de la madre
- Restricción del tiempo de permanencia de las crías con la madre
- Incremento artificial de la población de la camada
- Manipulación experimental de la composición de la dieta
- Disminución de la cantidad de alimento disponible

Los dos primeros métodos son bastantes criticables, porque implican someter a la madre a un stress quirúrgico y alterar profundamente unas condiciones que habitualmente no suelen encontrarse modificadas en la subnutrición humana. Sin embargo, con relación a la arteria uterina, es interesante señalar que el retraso del crecimiento uterino que experimentan los fetos de mujeres gestantes diabéticas (un síndrome relativamente comparable a la malnutrición *in utero*) se atribuye a una posible angiopatía de los vasos de la región pélvica, con la consiguiente disminución del aporte de sangre y de nutrientes a la placenta y al feto (ello ocurre solo cuando la diabetes es muy grave); las consecuencias son similares, por lo tanto, a lo

que sucede si se restringe, mediante una ligadura, la irrigación del útero, pero se desvía de cualquier situación de subnutrición propiamente dicha.

Más adecuados parecen ser los modelos en los que se disminuye el número de horas que las crías pasan junto a la madre o aquéllos en los que se incrementa el número de crías de una camada. En el primer caso las ratas lactantes se mantienen varias horas al día alejadas de la madre, en una incubadora, en condiciones adecuadas de humedad y temperatura (o, alternativamente, se introducen largos ratos en una jaula junto a una rata recién parida pero cuyos pezones han sido previamente cauterizados) (Shambaugh, III y Wilber, 1974; Walker y Aubert, 1988). En el segundo caso se mezclan 16-20 crías de la misma edad con una sola madre (Fickova y Macho, 1983). En ambos modelos la subnutrición se produce por el mismo motivo: disminuye la cantidad de leche accesible. Este resultado es próximo a la condición habitual de la malnutrición postnatal humana, aunque en el ser humano no sucede por esas causas.

Con respecto a la manipulación de los ingredientes de la dieta, es frecuente la reducción de proteínas. Se suministra una dieta con un bajo contenido en éstas, pero convirtiéndola en isocalórica complementando la deficiencia energética con una mayor proporción de glúcidos (rara vez lípidos). Aunque en pocos de los trabajos publicados se indica la cantidad real de comida ingerida diariamente por los animales (información clave), varios autores han presentado datos poniendo de manifiesto que aquéllos reducen voluntariamente la ingesta de un alimento así manipulado (probablemente porque resulta menos apropiado para su paladar); en consecuencia, lo que se instaura en ellos es, en realidad, una situación mixta de deficiencia proteico-energética (Weinkove et al., 1976; Crnic y Chase, 1978; Crnic, 1980; Dollet et al., 1985; Vachon y Savoie, 1987; Okitolonda et al., 1988). A esta situación se llega, más directamente, aplicando el último de los métodos citados: reduciendo la cantidad de alimento disponible para el animal. De hecho, ése es el tipo de malnutrición más común en el ser humano, el que resulta de una insuficiencia en la ración de alimentos, que implica, al mismo tiempo, una carencia en proteínas y calorías.

Creemos que el modelo experimental que nosotros hemos desarrollado (ver sección 1.2 de Material y Métodos) resulta de especial interés para el estudio de la subnutrición a la que actualmente están sometidos millones de personas en países no desarrollados y en muchas

sociedades marginadas, ya que se trata de un modelo que se ajusta más a las características de estos individuos:

- Se trata de una restricción completa, es decir, proteico-calórica.
- Se inicia en la etapa más sensible del desarrollo, la gestación.
- Se prolonga a lo largo de toda su vida.

#### **4.- Importancia del metabolismo de la glucosa en los tejidos**

La glucosa es un combustible metabólico para todos los tejidos del organismo. El cerebro utiliza en torno al 25% del total. Sin embargo, debido a que el cerebro almacena muy poca glucosa, requiere de un abastecimiento constante y controlado de ésta. En este sentido, es de vital importancia que el nivel de glucosa en sangre se mantenga en un rango de 60 a 120 mg/dl, con el fin de prevenir la falta de suministro al sistema nervioso. La insulina es la principal hormona que regula estos niveles controlando la velocidad a la que este sustrato es consumido por las células del músculo, tejido adiposo e hígado.

Cada uno de estos tipos celulares realiza un uso diferente de la glucosa, que viene determinado por la función del correspondiente tejido en el organismo.

##### Tejido adiposo:

La función primaria de la célula del tejido adiposo es almacenar energía en forma de grasa. Estas células contienen enzimas que convierten la glucosa en triglicéridos y posteriormente los triglicéridos en ácidos grasos, que son liberados.

##### Músculo:

La función primaria de la célula muscular es contraerse. Por eso convierte la glucosa en energía y, cumplido ello, la destina a la síntesis de proteínas y glucógeno.

Casi la mitad del cuerpo humano está constituido por músculo, de ahí que resulte de especial interés el estudio de este tejido. En los vertebrados, se



distinguen tres tipos de músculo: el estriado, esquelético o voluntario, el liso o involuntario y el cardíaco.

Cada célula de este tejido se denomina fibra; existen varios tipos de fibras musculares (tabla 1) y cada tipo de músculo está formado por proporciones diferentes de unas y otras, adaptándose así a la función específica de dicho músculo.

El músculo esquelético es rojizo, de contracción brusca y sus movimientos dependen de la voluntad. Constituye el tejido más abundante del organismo y representa del 40-45% del peso corporal total.

El músculo liso suele ser de color pálido, tiene contracción lenta y sostenida y su movimiento no está sujeto a la voluntad. Se encuentra revistiendo o formando parte de las paredes de los órganos huecos tales como la tráquea, el estómago, tracto intestinal, etc.

El músculo cardíaco tiene aspecto estriado, forma las paredes del corazón y no está sujeto al control de la voluntad sino que se contrae rítmicamente 60-80 veces por minuto.

CARACTERÍSTICA	TIPO I (lenta oxidativa)	TIPO IIa (rápida glucolítica oxidativa)	TIPO IIb (rápida glucolítica)
<b>DIÁMETRO</b>	Pequeño	Grande	Grande
<b>COLOR</b>	Rojo	Rosado	Blanco
<b>MIOGLOBINA</b>	Mucha	Poca	Muy poca
<b>MIOFIBRILLAS</b>	Pocas	Intermedias	Muchas
<b>CAPILARIZACIÓN</b>	Importante	Intermedia	Pobre
<b>MOTONEURONA</b>	Pequeña ( $\alpha 1$ )	Grande ( $\alpha 2$ )	Grande ( $\alpha 2$ )
<b>DESCARGA NERVIOSA</b>	Tónica(100-120 ms)	Intermedia	Fásica(40-50 ms)
<b>PROPIEDAD CONTRÁCTIL</b>	Tensión baja duración alta	Intermedia	Tensión alta duración alta
<b>VÍA METABÓLICA PREDOMINANTE</b>	Oxidación aeróbica (mitocondrial)	Glucólisis aeróbica y anaeróbica	Glucólisis Anaeróbica
<b>FATIGABILIDAD</b>	Poca	Intermedia	Mucha
<b>MITOCONDRIAS</b>	Muchas y grandes	Intermedias	Pocas y pequeñas
<b>(SDH) ENZIMA OXIDATIVA</b>	Muy elevada	Alta	Baja
<b>(FPK) ENZIMA GLUCOLÍTICA</b>	Baja	Intermedia	Alta

Tabla 1: Esquema comparativo sobre las características de los tipos de fibras musculares.

### Hígado:

La célula hepática, además de utilizar catabólicamente la glucosa, tiene una gran capacidad para convertirla en glucógeno. Éste constituye la forma de almacenamiento de la glucosa. Aunque la insulina no es necesaria para el transporte de glucosa al hígado, afecta directamente a su capacidad para aumentar la captación de ésta, al reducir la glucogenolisis y gluconeogénesis e incrementar la síntesis de glucógeno.

### **5.- Acciones generales de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa**

La insulina está sintetizada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas; fue aislada por Banting y Best en el año 1921.

En humanos está codificada por un gen situado en el brazo corto del cromosoma 11 y su peso molecular es de 5,7 kDa. Posee dos cadenas polipeptídicas diferentes, la cadena A, de 21 aminoácidos y la B, de 30. Ambas están unidas entre sí por puentes disulfuro. La molécula presenta además un puente intracatenario en la cadena A.

La insulina se sintetiza como preproinsulina catalíticamente inactiva, y mediante procesamientos proteolíticos se convierte ya en la molécula activa.

La preproinsulina posee 109 aminoácidos y un péptido señal característico constituido por 23 aminoácidos en la región N-terminal de la molécula, al que siguen la cadena B, un péptido de conexión o péptido C y por último, la cadena A. En primer lugar, en el retículo endoplásmico se escinde el péptido señal dando lugar a la molécula de proinsulina, todavía inactiva que mediante la proteólisis del péptido C, da lugar finalmente a la molécula de insulina.

Es la hormona anabolizante mejor caracterizada; su papel principal consiste en la regulación de la concentración de glucosa en sangre. En condiciones normales los niveles de ésta deben estar comprendidos entre 90-110 mg/100 ml. Existe un equilibrio entre la entrada de glucosa al torrente sanguíneo y la captación de ésta por los tejidos, que se regula principalmente a través de dos hormonas con efectos antagónicos, la insulina y el glucagón. La insulina suscita una serie de acciones en varios

tejidos, como se indica a continuación. Tras la ingesta de alimentos, aumenta el nivel de glucosa en sangre y esto produce la liberación de insulina por el páncreas, estimulando así la captación de glucosa por los tejidos sensibles a esta hormona, como el músculo esquelético y el tejido adiposo. Se induce entonces el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno en el músculo (glucogénesis) y como triglicéridos en el tejido adiposo (lipogénesis).

A su vez, la insulina también estimula la síntesis hepática de glucógeno e inhibe la síntesis de novo de glucosa (gluconeogénesis), así como la degradación de triglicéridos por el tejido adiposo (lipólisis) y la degradación de glucógeno en músculo e hígado (glucogenolisis).

El glucagón, sintetizado por las células  $\alpha$  del páncreas, ejerce efectos antagónicos: estimula la liberación hepática de glucosa, al activar la glucogenolisis y gluconeogénesis.

## **6.- Vía de señales de la insulina**

Todos los efectos de la insulina se producen como consecuencia de su interacción con receptores específicos y la activación de una vía de señales (Fig. 5). A continuación se describen los aspectos más destacables de la misma.

### **6.1.- El receptor de insulina**

Fue descubierto en 1971 por Roth y col., iniciándose entonces una nueva era de investigaciones que permitieron establecer la base molecular de la acción insulínica (Freychet et al., 1971).

El receptor de insulina está compuesto por cuatro cadenas, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$ , unidas covalentemente por puentes disulfuro; ambas derivan de un mismo precursor, el pro-receptor, mediante ruptura proteolítica. El transcrito presenta dos isoformas, derivadas de diferentes posibilidades de corte alternativo; ello origina dos tipos de subunidad  $\alpha$ .

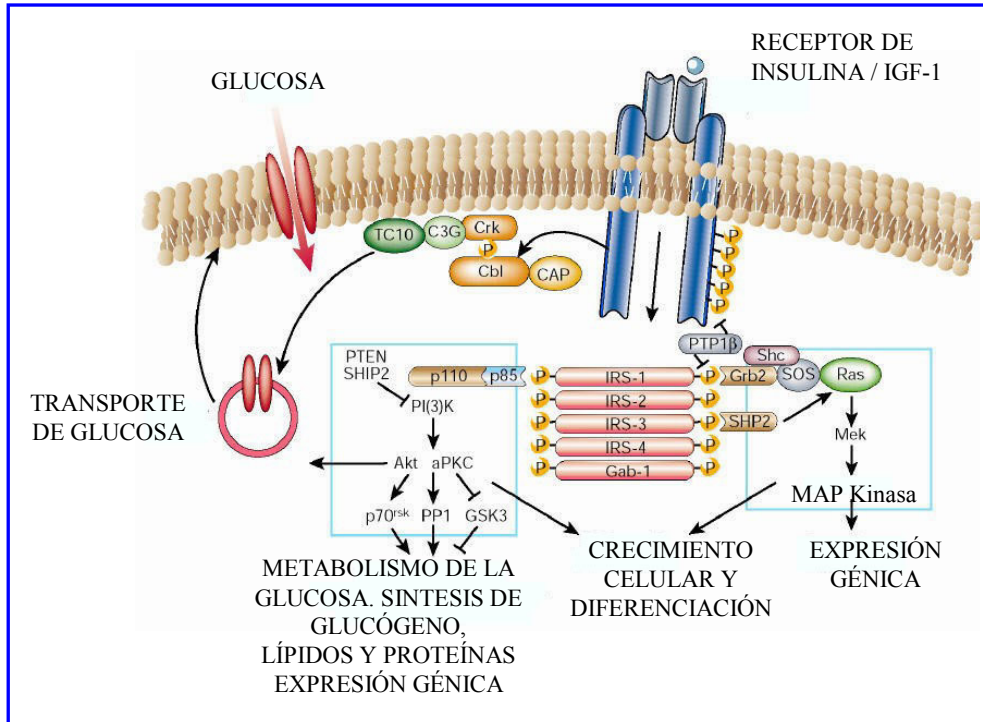


Figura 5. Vía de señales de la insulina; adaptado de Saltiel y Kahn (2001).

Existen, pues, un par de isoformas del receptor, presentes en la mayoría de los tejidos (Cheatham y Kahn, 1995).

El receptor de insulina pertenece a un amplio grupo de receptores que poseen actividad tirosín-kinásica y comparten varios hechos: una zona extracelular larga y glucosilada, que contiene los sitios de unión al ligando; una breve región intramembranosa, hidrofóbica; una amplia región intracelular.

Dentro de ese grupo, el receptor de insulina es uno de los que se activan directamente por el ligando; a su vez, pertenece a una breve familia que incluye: el propio receptor de insulina, el de IGF-1 y el denominado IRR (“insulin-related receptor”) cuyo ligando todavía se desconoce (receptor “huérfano”) (Shier y Watt, 1989).

Tras la unión de la insulina al receptor, tiene lugar un cambio conformacional que permite la unión de ATP en el dominio intracelular de la subunidad  $\beta$ , lo que determina la activación del receptor, y conlleva la fosforilación de una serie de restos de Tir situados en diferentes zonas de la región intracelular de esa subunidad. Los principales residuos implicados son: en el dominio catalítico, las Tir 1158, 1160 y 1162, esenciales para la actividad tirosina kinasa del receptor; en el dominio yuxtamembranoso, las Tir 965 y 972, necesarias para la interacción del receptor con sus sustratos intracelulares y para incrementar la estabilidad de dicha interacción (Tavare y Siddle, 1993); y en el dominio C-terminal, la Tir 1134, implicada en la acción mitogénica del receptor.

En la subunidad  $\beta$  también existen restos de Ser y Tre próximos al extremo C que son susceptibles de fosforilación, incluso en ausencia de insulina. Con la hormona, su grado de fosforilación aumenta. Esta modificación (especialmente la fosforilación de las Ser) constituye un mecanismo de regulación que conduce a una atenuación de la actividad kinásica del receptor (Cheatham y Kahn, 1995).

Además de transmitir la señal de la insulina, el receptor mediatiza la internalización de esta hormona. La secuencia que flanquea a la Tir 960 constituye un motivo de internalización. Es posible que ésta pueda contribuir a la compartimentación subcelular de alguna de las señales insulínicas (Virkamaki et al., 1999).

Además de la insulina, los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II son ligandos de este receptor.

### **6.1.1.- Principales sustratos del receptor de insulina**

Se han identificado al menos nueve sustratos del receptor de insulina/IGF-1. Cuatro de éstos pertenecen a la familia de los IRS, y entre los restantes se incluyen las proteínas Shc, Gab-1, Cbl y APS (Pessin y Saltiel, 2000; Saltiel y Kahn, 2001).

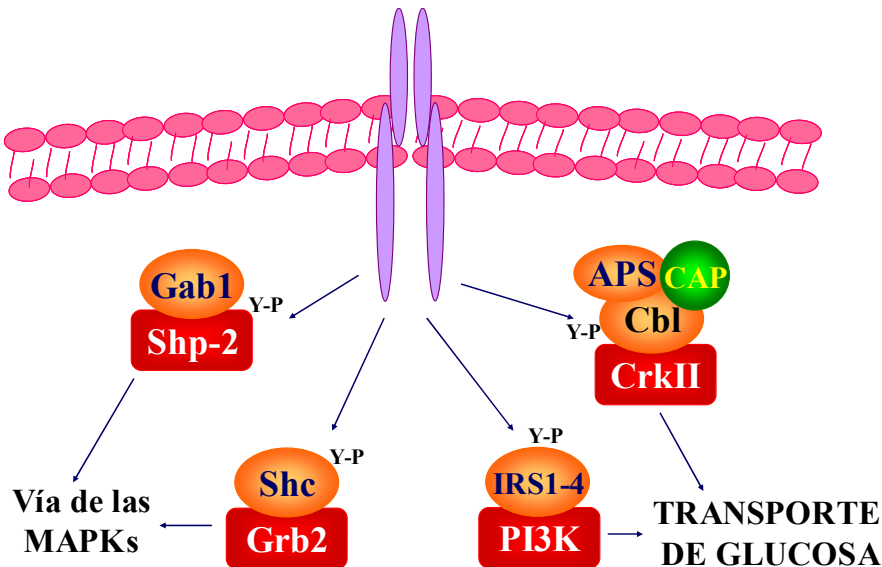


Figura 6: Principales sustratos del receptor de insulina. (Adaptado de Saltiel y Pessin, 2002).

#### A) Familia de los IRS

Está formada por los cuatro tipos de IRS (1-4) muy relacionados entre sí, y por la proteína Gab-1.

El IRS-1 es el sustrato del receptor de insulina mejor caracterizado; posee un peso molecular de 131 kDa y su gen en humanos está localizado en el cromosoma 2q36-37.

Se detectó por primera vez en células Fao de hepatoma estimuladas con insulina, por inmunoprecipitación con anticuerpos antifosfotirosina; originariamente se denominó pp185 debido a su migración en Poliacrilamida-SDS. Poco después de la clonación del IRS-1, el análisis de pp185 en estas células reveló la existencia de otra tirosinfosfoproteína de elevado peso molecular que se denominó IRS-2 (White, 1994; White y Kahn, 1994; White, 1997); su gen en humanos está localizado en el

cromosoma 13q. Tanto IRS-1 como IRS-2 poseen unas secuencias conservadas en su región NH<sub>2</sub> terminal, denominadas “dominios de homología IRS” (IH), que interactúan con la Tir 960 del receptor de insulina (Craparo et al., 1995).

Posteriormente, dos nuevas proteínas de esta familia han sido aisladas y clonadas: IRS-3, en adipocitos estimulados con insulina (Lavan et al., 1997) e IRS-4, en células embrionarias humanas de riñón (Fantin et al., 1999). Sin embargo, la implicación de éstas en la acción metabólica de la insulina no está del todo clara ya que mientras que los ratones knockout de IRS1 y de IRS2 presentan resistencia a la insulina (Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994; Withers et al., 1998) el ratón knockout de IRS3 es normotolerante a la glucosa (Liu et al., 1999) y además el IRS-4 no se ha detectado ni en tejido muscular ni en el adiposo (Fantin et al., 1999).

Tanto IRS-1 como IRS-2 se encuentran ampliamente distribuidos, siendo el IRS-1 la isoforma principal en músculo esquelético y el IRS-2 la principal en hígado (Kido et al., 2001).

Las proteínas IRS contienen múltiples sitios posibles para su fosforilación; concretamente, el IRS-1 tiene 21 restos de Tir susceptibles de ser fosforilados, de los cuales 14 se encuentran conservados en el IRS-2 y al menos 8 se fosforilan tras la activación del receptor de insulina (Sun et al., 1991; Sun et al., 1993). Además, los IRS contienen 30 residuos de Ser / Tre también susceptibles de ser fosforilados por diversas kinasas; parece ser que esta modificación podría estar implicada en la inhibición de la fosforilación en los restos de tirosinas durante la estimulación con insulina (Jullien et al., 1993). El mecanismo de regulación de estas proteínas sin embargo resulta más complejo ya que aunque se había descrito que la fosforilación en Ser/Tre inhibía su interacción con el receptor de insulina (Paz et al., 1997) y además constituía una señal para la degradación por el proteosoma (Sun et al., 1999), recientemente se ha descrito que es necesario un cierto grado de fosforilación en determinados residuos de Ser / Tre para que estas proteínas sean activadas por el receptor de insulina (Greene y Garofalo, 2002). Así, se han descrito dos Ser/Tre kinasas que incrementan la actividad del complejo IRS-1-PI3K: la AMPK, mediante la fosforilación de la Ser 789 del IRS-1 (Paz et al., 1997) y la PKB mediante la fosforilación de los residuos de Ser 265, 302, 325 y 358 (Beauloye et al., 2001).

Por otra parte la familia de proteínas SOCS (“supresor of citokine signalling proteins”) modula la acción de los IRS al competir con éstos en su unión al receptor de insulina; también porque pueden unirse con ellos y actuar como proteínas adaptadoras facilitando su ubiquitinización y por tanto, su degradación proteosómica. (Johnston et al., 2003). El ratón deficiente en SOCS1 presenta hipersensibilidad a la insulina, lo que demuestra el papel regulador negativo de esta proteína en la acción insulínica (Kawazoe et al., 2001).

#### B) Proteínas Shc

La familia de proteínas Shc está formada al menos por 3 isoformas, cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 46 y 52 kDa; todas ellas poseen un dominio SH2 en su región COOH terminal, un dominio PTB en su región NH<sub>2</sub> terminal y una región rica en prolina en la zona media de la molécula que incluye un lugar de fosforilación en Tir (Pelicci et al., 1992).

Durante la estimulación con insulina, Shc es fosforilada en Tir, lo que conduce a su activación. Como consecuencia de ésta Shc juega un papel principal en la cascada de las MAPKinasas. Esta cascada también se activa a través de varios receptores de factores de crecimiento y de citoquinas (Myers, Jr. et al., 1994).

### **6.2.-Proteínas con dominios SH2 en la vía de señales insulínica**

Las tirosinas fosforiladas en los sustratos del receptor de insulina, IRS y Shc, actúan como señales para el reclutamiento de proteínas con dominios SH2. Muchas de éstas son moléculas adaptadoras, como por ejemplo la subunidad reguladora p85 de la PI 3-kinasa, la proteína Grb 2, o la Crk II (perteneciente a otra vía de señalización que posteriormente citaremos); otras son enzimas, como la fosfotirosina fosfatasa SHP 2 y la tirosina kinasa citoplásmica Fyn.

#### **PI3K**

Estas proteínas pertenecen a una familia de enzimas expresadas en la mayoría de los tejidos de un amplio rango de especies. Participan en



numerosos procesos como en la regulación del metabolismo, crecimiento celular, proliferación, migración, fenómenos de transporte a la membrana y secreción. Además están implicadas en muchos procesos patológicos como el cáncer, la inflamación y enfermedades cardiovasculares (Cantley, 2002).

En mamíferos se han identificado 8 tipos clasificados en tres clases (I, II y III) según su homología de secuencia, especificidad de sustrato y regulación. La más estudiada es la primera que, a su vez, se subdivide en Ia y Ib (Yerson y Jackson, 2003).

Los receptores tirosínkinasas, entre ellos el de la insulina, estimulan las PI 3-kinasas de la clase Ia. Están formadas por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85; ésta posee dos dominios SH<sub>2</sub> implicados en la interacción con regiones fosforiladas en Tir de las proteínas IRS. Han sido identificadas al menos 8 isoformas de la subunidad reguladora que derivan de 3 genes distintos: p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p85<sup>PIK</sup> (Pons et al., 1995); además, por “splicing” alternativo, a partir de p85 $\alpha$  se originan las isoformas p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$ , de menor peso molecular (Antonetti et al., 1996). La subunidad catalítica consta de varios dominios: un dominio kinasa catalítico, un dominio PI 3-kinasa (PIK), un dominio C2 (de unión a fosfolípidos), un dominio de unión a Ras y, por último, un dominio N-terminal que interacciona con la subunidad reguladora.

Existen tres clases de PI3K Ia,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ . Las dos primeras son ubicuas mientras que la  $\delta$  se encuentra principalmente en leucocitos.

La activación de PI 3-kinasa transmite múltiples señales. Esta enzima cataliza la fosforilación de fosfoinosítidos en la posición 3, para producir fosfatidilinositoles-3-fosfato. Destaca especialmente el PI(3, 4, 5)P<sub>3</sub>, que se une al dominio de homología a plecstrina (PH) de una gran variedad de moléculas implicadas en diferentes vías de señalización, modificando así su actividad o su localización subcelular (Lietzke et al., 2000).

Dos fosfatasa regulan la actividad de la PI 3-kinasa:

- PTEN: destaca principalmente por ser un supresor tumoral ya que hidroliza el grupo 3' del PI(3,4,5)P<sub>3</sub> inactivando así a este segundo mensajero en la señalización celular (Simpson y Parsons, 2001).
- SHIP: es una fosfatasa del grupo 5' y genera PI(3,4)P<sub>2</sub> que actuaría entonces como segundo mensajero (Stambolic et al., 1998; Maehama y Dixon, 1999). Por tanto, el papel regulador negativo de

esta vía de señales es mucho menor que el de PTEN. (Scheid y Woodgett, 2003).

Recientes estudios han propuesto la posibilidad de que los complejos IRS-PI3K activados migren a otras zonas de la membrana plasmática, o incluso a membranas intracelulares. Así facilitarían, por ejemplo, la activación de moléculas específicamente necesarias para inducir la translocación del GLUT-4 y estimular el transporte de glucosa (Litherly et al., 2001). Los productos de la PI 3-kinasa activan a la proteínaquinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK 1) y a partir de aquí la señal insulínica diverge, ya que PDK1 fosforila dos sustratos: PKB y también una PKC atípica (PKC  $\zeta / \lambda$ ).

Diversos estudios indican que, probablemente, se necesitan ambas (al menos en algunos sistemas celulares) para la translocación del GLUT-4 (Litherly et al., 2001).

## **PROTEÍNA ADAPTADORA Grb2**

Grb 2 es una proteína pequeña citoplásmica que posee dos dominios SH3 y uno SH2 por el que se une a IRS-1 o a Shc. Se trata de una molécula adaptadora que actúa entre SOS (factor intercambiador de nucleótidos de guanina para p21<sup>Ras</sup>) y proteínas fosforiladas en tirosina como IRS-1 y Shc (Simon et al., 1993).

Durante la estimulación con insulina, Shc e IRS-1 se unen a Grb 2 y ésta a su vez se asocia, a través de sus dominios SH3, a SOS que activa a p21<sup>Ras</sup>. Dicha activación se produce mediante el intercambio de GDP por GTP. El p21<sup>Ras</sup> activo se asocia y estimula a Raf-1 kinasa, que a su vez activa a MEK (MAP Kinasa kinasa). En la etapa final de esta cascada se produce la activación de MAPkinasa (Roberts, 1992). Estas MAPKs (proteínas activadas por mitógenos) ejercen su acción mediante la fosforilación de proteínas citosólicas y/o factores de transcripción, una vez translocadas al núcleo, regulando así los procesos de diferenciación celular.

### **6.3.- Proteínas kinasas de restos de Ser/Tre de la vía de señales insulínica:**

#### **PKB**

La proteína kinasa B (PKB o Akt) es una serina/treonina kinasa de 57 kDa compuesta por un dominio de homología a plecstrina (PH) en su región NH<sub>2</sub> terminal, responsable de la unión de fosfoinosítidos (PIP<sub>3</sub>, PIP<sub>2</sub>), seguido de un dominio catalítico y una región reguladora C-terminal.

La PKB ( $\alpha$  o  $\beta$ ) pertenece a la familia de las AGC kinasas, que fue clonada en 1991 gracias a su homología con otros miembros de esta familia, la PKA y la PKC (Coffer y Woodgett, 1991; Jones et al., 1991).

Se han identificado tres genes relacionados con PKB denominados Akt-1/ PKB $\alpha$ , Akt-2/ PKB $\beta$  (Jones et al., 1991) y Akt-3/ PKB $\gamma$  (Brodbeck et al., 1999), junto con sus variantes PKB $\beta$ <sub>1</sub> -con una extensión adicional de 40 aminoácidos en su extremo C-terminal (Jones et al., 1991)- y PKB $\gamma$ <sub>1</sub> -cuyo extremo C-terminal no contiene el residuo de Ser característico (Brodbeck et al., 2001)-.

PKB $\alpha$  es la isoforma mayoritaria en músculo e hígado que responde al tratamiento insulínico. En adipocitos además de ésta interviene la PKB $\beta$ . Sin embargo, la isoforma  $\gamma$  no se activa con insulina en ninguno de estos tres tejidos aunque sí lo hace en la mayoría de modelos celulares *in vitro* (Walker et al., 1998). Muchos estudios indican que esta kinasa puede ser activada por un mecanismo independiente de la activación de PI3K, por ejemplo como resultado del incremento del calcio intracelular o del AMP cíclico (Sable et al., 1997; Yano et al., 1998) o también por el tratamiento con hormona de crecimiento.

Recientemente se ha descrito que el ejercicio físico activa *in vivo* esta kinasa mediante un mecanismo independiente de PI3K (Sakamoto et al., 2003).

Para conseguir la máxima actividad de PKB es necesario la fosforilación de sus restos Tre 308 y Ser 473. PDK1 fosforila al primero de ellos; en cambio, la identidad de la kinasa encargada de fosforilar a la Ser 473 no está del todo clara, aunque se ha denominado PDK2 (Alessi y Downes, 1998); se ha descrito que PDK1 interacciona con un fragmento del

extremo C-terminal de la kinasa PRK2 (PKC related kinase 2) y que, como resultado de esta interacción, PDK1 puede adquirir la capacidad de fosforilar también la Ser 473 (Balendran et al., 1999a).

Los productos de la PI3K inducen la activación de PKB al menos de tres formas: primero, permiten su reclutamiento en la membrana plasmática, situándola próxima a PDK1 y a PDK2; en segundo lugar, modifican su conformación, favoreciendo que los lugares de fosforilación queden accesibles a esas kinasas; por último, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> interacciona con el dominio PH de PDK1 y PDK2 e induce así la activación (Alessi y Downes, 1998).

Diversos sustratos de PKB han sido identificados, entre los que destacan la glucógeno sintasa kinasa (GSK3), que es inhibida al interaccionar con ésta, contribuyendo así a la desfosforilación de la glucógeno sintasa inducida por insulina y favoreciendo, por tanto, la síntesis de glucógeno (Cohen et al., 1997).

### **PDK1**

Es una Ser/ Tre kinasa de 63 kDa expresada de manera ubicua. Pertenece a la familia de las AGC kinasas. Consta de 75 aminoácidos y posee un dominio kinasa N-terminal y un dominio PH C-terminal que le permite su interacción con los fosfoinosítidos de la membrana plasmática (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998).

Aunque ya se encuentra activa en estado basal, tras el tratamiento con insulina o pervanadato se transloca a la membrana plasmática y se fosforila en dos residuos de Tir, lo que incrementa su actividad (Kandel y Hay, 1999). Recientemente, se ha demostrado que PDK1 puede también localizarse en el núcleo. Se ha propuesto que este tipo de translocación nuclear actúe como un regulador negativo de su actividad (Lim et al., 2003).

La PDK1 fue identificada por primera vez como la proteína encargada de fosforilar el residuo Tre 308 de PKB $\alpha$  *in vitro* (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997; Stephens et al., 1998). Posteriormente también se caracterizó por su capacidad para fosforilar a otros miembros de la familia de las AGC kinasas; entre ellas destacan la p70S6K, algunas isoformas de la PKC y la PRK2 (Biondi y Nebreda, 2003).

PDK1 interacciona formando complejos con varios miembros de la familia de las PKC (Le Good et al., 1998) y con la p70S6K (Romanelli et al., 1999; Balendran et al., 1999b) y es posible que estas interacciones regulen su actividad hacia otros de sus sustratos, como por ejemplo hacia PKB (Vanhaesebroeck y Alessi, 2000).

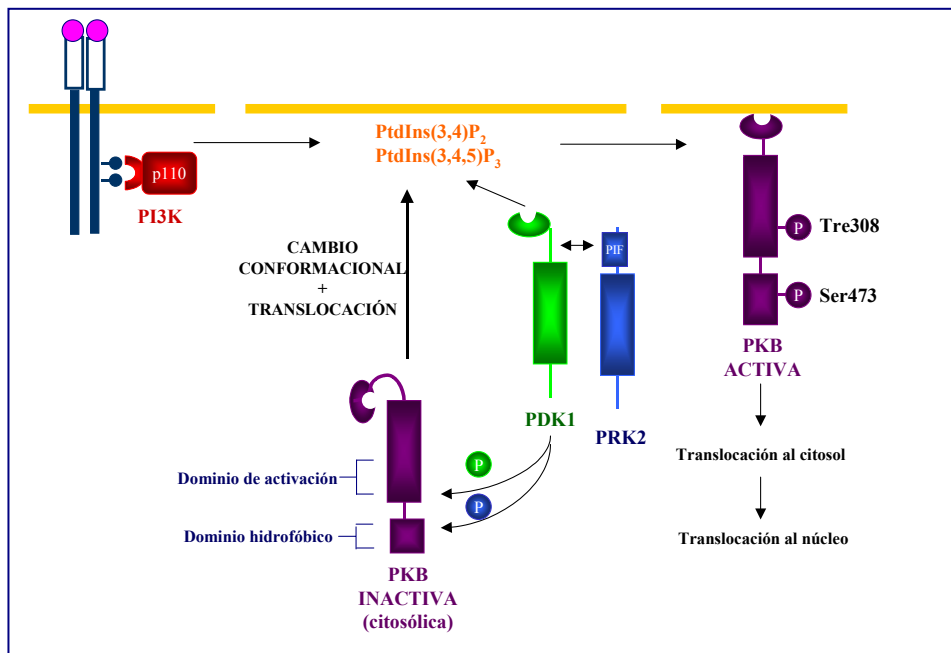


Figura 7: Mecanismo de activación de PKB (adaptado de Vanhaesebroeck y Alessi, 2000).

### GSK3

Se sabe, desde hace tiempo, que la actividad de la glucógeno sintasa se inhibe cuando aumenta su grado de fosforilación, proceso catalizado por la GSK3. Ésta fue descubierta en 1980 (Embi et al., 1980); presenta dos isoformas muy relacionadas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que en los mamíferos se expresan de manera ubicua (Coffer y Woodgett, 1991). El mecanismo concreto por el que interviene en la regulación de la glucógeno sintasa ha sido descrito recientemente; se ha visto que implica una interacción directa entre la GSK3 y la sintasa. Es un proceso en el que participan dos zonas cruciales de la

GSK3: a) un sitio catalítico, capaz de unirse a la sintasa cuando ésta se encuentra parcialmente fosforilada; precisamente, la unión se establece a partir de uno de sus restos de fosfato. Al producirse dicha unión, se estimula la actividad catalítica de la GSK3. Con ello se incrementa el grado de fosforilación de la glucógeno-sintasa, lo cual, como se ha indicado antes, conduce a su inactivación. b) la otra zona importante de la GSK3 posee una función reguladora; se trata de un resto de Ser (situado en su región N-terminal) que es susceptible de fosforilación, catalizada por la PKB. Cuando se forma esa fosfo-serina, la GSK3 cambia de conformación y dicho resto se desplaza hasta el sitio de unión de la glucógeno-sintasa. Ello impide que ésta lo ocupe, que aumente su fosforilación y que se inactive. En consecuencia, a través de este mecanismo, que implica a la PKB, la insulina determina que el enzima clave de la síntesis de glucógeno permanezca activo (revisado por Biondi y Nebreda, 2003).

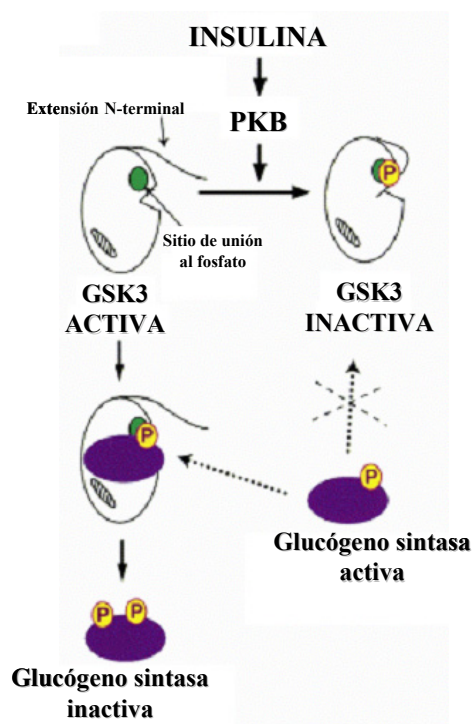


Figura 8. Mecanismo de activación de GSK3 (Biondi y Nebreda, 2003).

Recientemente se ha visto que la GSK-3 también puede fosforilar al IRS-1 en los tejidos adiposo y muscular, proceso del cual resulta una atenuación de la señal insulínica. Por eso se cree que esta kinasa podría estar implicada en la resistencia de la diabetes de tipo 2 (Eldar-Finkelman, 2002).

## **PKC**

Esta kinasa fue descubierta hace 20 años en cerebro de rata. Se trata de una serina/treonina kinasa formada por una sola cadena polipeptídica de 77-83 kDa (Azzi et al., 1992).

Han sido clonadas y caracterizadas 12 isoenzimas que se clasifican en tres familias (Mochly-Rosen y Gordon, 1998):

1. Isoformas clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$  y  $\gamma$ ): requieren fosfatidilserina, calcio o diacilglicerol para su activación.
2. Isoformas nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ): no se activan en presencia de calcio pero sí requieren fosfatidilglicerina o diacilglicerol para ser activas.
3. Isoformas atípicas ( $\iota$ ,  $\lambda$  y  $\zeta$ ): son independientes tanto de calcio como de fosfolípidos.

Algunas isoformas (PKC  $\zeta$ ) actúan como mediadores de la vía de señales insulínica, mientras que otras (PKC  $\theta$  y PKC  $\epsilon$ ) regulan negativamente dicha vía (Idris et al., 2002).

- **ISOFORMAS CLÁSICAS Y NUEVAS**

La sensibilidad muscular a la insulina es inversamente proporcional al contenido de triglicéridos de este tejido; puesto que las isoformas clásicas y nuevas de la PKC son activadas por el diacilglicerol y los acil-CoA largos, estas isoformas han sido relacionadas con cuadros de resistencia muscular a la insulina (Idris et al., 2002). Así, el incremento de estas isoformas se ha asociado a la inhibición de la actividad del receptor de insulina (Bollag et al., 1986; Takayama et al., 1988) y del IRS-1, ya que se han relacionado con

la fosforilación de éste en residuos de Ser, lo que disminuye su actividad (Chin et al., 1993; Le Good et al., 1998).

Además, los ratones knockout tanto de la isoforma  $\alpha$  (Leitges et al., 2002) como de la  $\beta$  (Styaert et al., 1999) presentan un mayor incremento del transporte de glucosa tras estímulo insulínico, tanto en tejido adiposo como en el muscular.

Sin embargo, el papel que desempeñan otras de estas isoformas no está del todo claro. Estudios en cultivos primarios de músculo esquelético de rata indican que la sobreexpresión de la isoforma PKC $\delta$  provoca un efecto positivo, al mejorar el transporte de glucosa y la translocación de GLUT-4 (Braiman et al., 1999a; Braiman et al., 1999b). Las isoformas PKC $\theta$  y PKC $\epsilon$  se han relacionado con estados de resistencia a la insulina, en animales (Donnelly et al., 1994; Schmitz-Peiffer et al., 1997) y en pacientes diabéticos (Gray et al., 1987); recientemente se ha caracterizado el ratón transgénico dominante negativo de PKC $\theta$  como un modelo de resistencia insulínica y obesidad (Serra et al., 2003).

- ISOFORMAS ATÍPICAS

Han sido descritas como reguladores positivos de la vía de señalización PI3K, ya que pacientes con diabetes tipo 2 presentan un déficit de activación de PKC  $\zeta/\lambda$ ; algo similar se ha visto en monos y roedores (Farese, 2002; Beeson et al., 2003; Kanoh et al., 2003), sugiriendo así que este defecto podría contribuir de manera importante a la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina que presentan todos ellos.

La PKC $\lambda$  es la principal isoforma atípica expresada en músculo esquelético y en tejido adiposo de ratón (Styaert et al., 1999; Bandyopadhyay et al., 2000; Kanoh et al., 2000; Kanoh et al., 2003) mientras que en humanos, ratas y monos lo es la PKC  $\zeta$ . La isoforma PKC  $\zeta$  interacciona con Akt regulando así su actividad (Doornbos et al., 1999; Mao et al., 2000). Participa también en la síntesis de proteínas, ya que fosforila a la proteína p70S6K  $\beta$ II regulando su localización subcelular y, por tanto, su actividad (Valovka et al., 2003).



Estructura y mecanismo de activación de PKC  $\zeta$ :

Es una proteína formada por cuatro dominios característicos: en su extremo N-terminal un dominio PB1, seguido de un dominio pseudosustato (PS), un dominio C1 y un dominio Ser/Tre kinasa situado en el extremo C-terminal. Es ya sabido que la translocación de las diferentes isoformas de PKC a la membrana plasmática incrementa su actividad (Kraft y Yerson, 1983); ello sucede a través de la siguiente pauta de acontecimientos (descritos esquemáticamente en la Fig. 9):

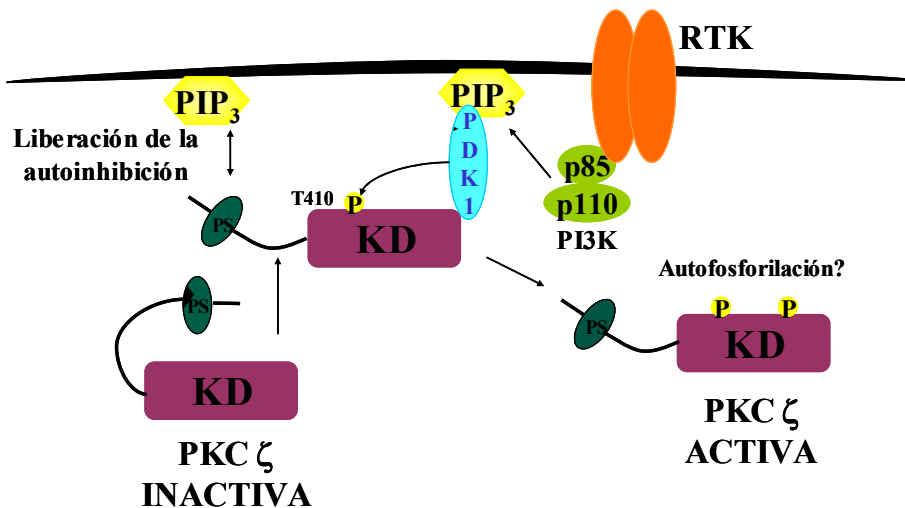


Figura 9. Mecanismo de activación de PKC  $\zeta$ . Adaptado de Hirai y Chida (2003).

Una vez activada la PI3K a través del receptor tirosina kinasa, se generan los PIP<sub>3</sub> y se activa la PDK1. Ésta interacciona con la PKC  $\zeta$  a través de su dominio PH, fosforilando el residuo Tre 410 de su dominio Kinásico e induciendo además la fosforilación de otro residuo de este dominio, la Tre 560. Por otro lado, la PKC  $\zeta$  permanece en un estado de autoinhibición: su dominio PS se encuentra plegado “ocultando” la Tre 410; los PIP<sub>3</sub> interaccionan con el dominio PS, dejando accesible el residuo de Tre 410 y mediando así la translocación de esta proteína a la membrana plasmática (Hirai y Chida, 2003).

#### **6.4.- Señales moleculares implicadas en la biosíntesis proteica:**

##### **mTOR**

Se trata de una serina/treonina quinasa de 289 kDa perteneciente a la familia de las PIKKs (quinasas relacionadas con la PI 3-quinasa) que es inhibida por rapamicina (Keith y Schreiber, 1995).

Interviene en el proceso de biosíntesis de proteínas regulando:

- las fases de iniciación y elongación de la translación proteica
- la biosíntesis de ribosomas
- el transporte de aminoácidos

mTOR es fosforilado en su residuo de Ser 2448; aunque no está del todo claro el papel que esta fosforilación desempeña sobre la regulación de esta proteína se ha propuesto que sea la Akt la encargada de fosforilar este residuo y que así se active (Nave et al., 1999; Sekulic et al., 2000).

##### **p70S6K**

Se trata de una serina/treonina kinasa perteneciente a la familia de las AGC kinasas. Su actividad es regulada por fosforilación en residuos específicos (Tre 229, Ser 371 y Tre 389) que le confieren una actividad catalítica óptima (Dennis et al., 1998). No se sabe bien cuál es la kinasa responsable de estas fosforilaciones; algunos autores proponen que sea Akt (ya que su activación se ha visto asociada a la activación de p70S6kinasa) (Burgering y Coffey, 1995; Welch et al., 1998); sin embargo, otros proponen que sea la PDK1 quien estimule tanto a Akt como a p70S6K (Dennis et al., 1998; Walker et al., 1998). También se ha descrito que la rapamicina inhibe la desfosforilación de p70S6kinasa y por tanto, que mTOR juegue un papel fundamental en su fosforilación (Burgering y Coffey, 1995; Cross et al., 1997).

Finalmente, como la actividad de la p70S6K es disminuida tanto por inhibidores de PI3K como por rapamicina, se ha sugerido que sean necesarias ambas vías, la de mTOR y la de PI3K, para su total activación (Thomas y Hall, 1997; Chen y Fang, 2002). Su función es regular la traducción de un grupo de mRNA que poseen una región de 4-14 pirimidinas en su extremo 5'terminal, denominada 5'TOP (tracto de

oligopirimidina) y de la traducción de otros mRNA que son componentes de la maquinaria de traducción (Avruch et al., 2001).

#### **4EBP1**

Esta proteína de bajo peso molecular interacciona con el factor de iniciación de la síntesis proteica eucariótica eIF4E, inhibiendo dicha síntesis (Gingras et al., 1999). eIF4E es la proteína que se une a la estructura CAP del extremo 5' de los mRNA eucarióticos, a otros factores de iniciación y a las subunidades ribosomales, para llevar a cabo la síntesis proteica (Anthony et al., 2001). En condiciones normales, 4EBP1 forma un complejo con eIF4E impidiendo este proceso. Cuando 4EBP1 es fosforilado queda inactivo y se libera el factor eIF4E, iniciándose la biosíntesis de proteínas; dicha fosforilación es promovida por los aminoácidos o por la insulina.

#### **6.5.- Protein-tirosin fosfatasas (PTPasas)**

Constituyen una familia de proteínas que, de manera coordinada con las PTKs (proteín-tirosina kinasas), regulan muchos procesos del metabolismo celular. Se encuentran codificadas por unos 100 genes del genoma humano (revisado por Tonks, 2003).

Pueden clasificarse en función de su localización subcelular o por la especificidad de su actuación. En el primer caso tenemos: PTPasas transmembranas (como PTP $\alpha$ , LAR, etc.) o intracelulares (como PTP1B) (Goldstein et al., 2000; Tonks, 2003). En cuanto a su actuación, también tenemos dos grupos:

-PTPasas clásicas: desfosforilan específicamente residuos de fosfotirosina.

-PTPasas de doble especificidad: además de fosfotirosina pueden desfosforilar residuos de fosfoserina y fosfotreonina.

Estas fosfatasas desempeñan papeles muy importantes, regulando diferentes vías de señales metabólicas como la insulínica (Xie et al., 2003). A continuación se describen las dos mejor conocidas en ese sentido.

## **LAR**

Es la PTPasa mayoritaria en el hígado y en las células endoteliales. También se han encontrado niveles elevados de esta proteína en corazón, cerebro y bazo. Sin embargo, su expresión en músculo esquelético es extremadamente baja (Norris et al., 1997).

Aunque su localización transmembranosa la convierte en un candidato lógico para regular la fosforilación del receptor de insulina, su papel en este sentido no está claro (Cheng et al., 2002).

La asociación directa entre LAR y el receptor, así como un incremento de esta asociación al tratar con insulina, han sido demostrados mediante estudios de coimmunoprecipitación en células (Ahmad y Goldstein, 1997). El ratón transgénico deficiente en LAR presenta profundos defectos en la homeostasis glucídica, con una disminución de la actividad PI 3-kinasa tras estímulo insulínico (Ren et al., 1998). Por otro lado, en ratones transgénicos que sobreexpresan LAR en el músculo esquelético, la fosforilación del IR y del IRS-1 no se ve afectada, pero sí la de IRS-2.

Tras estos resultados, se ha propuesto que esta PTPasa transmembranosa más que actuar sobre el IR, actúe sobre sus sustratos, principalmente sobre el IRS-2 (Cheng et al., 2002). El receptor de insulina es internalizado para su desfosforilación; por ello, probablemente será una fosfatasa del compartimiento endosomal la que intervenga mayoritariamente en ello (Calera et al., 2000), como se verá a continuación.

## **PTP1B**

Fue la primera PTPasa identificada. Se encontró en la placenta humana (Charbonneau et al., 1989). Posee un dominio catalítico de 37 kDa (Pannifer et al., 1998) y en su extremo C-terminal una región de 35 aminoácidos rica en prolina, que permite su localización anclada al retículo endoplásmico (Frangioni et al., 1992). Se expresa de manera ubicua; su gen, en humanos, se localiza en la región q.13.1-q.13.2 (Brown-Shimer et al., 1990).

Es la principal PTPasa implicada en la desfosforilación e inactivación del receptor de insulina. El mecanismo, representado en la Fig. 10, es el siguiente:

En ausencia de ligando, el receptor permanece en la membrana plasmática. Tras la llegada de la insulina, se une a él formándose un complejo que es rápidamente internalizado en endosomas; ahí, debido a su carácter ácido, se produce la disociación del complejo; la insulina entonces es degradada en los lisosomas. El receptor es desfosforilado por la PTP1B y, a continuación, es reciclado de nuevo a la superficie celular (revisión en Gill, 2002).

Además, PTP1B regula negativamente la vía de señales insulínica también a otro nivel, al desfosforilar al IRS-1; parece ser que esto ocurre a través de la proteína adaptadora Grb-2 (Goldstein et al., 2000).

Aunque cambios en la fosforilación de residuos de Tir y Ser/Tre provocan modificaciones en la actividad de PTP1B, este mecanismo de regulación no está del todo claro. Algunos autores indican que la insulina estimula la fosforilación en ciertos residuos de Tir e inactiva la enzima y que, en cambio, la fosforilación en residuos de Ser/Tre la estimula (Tao et al., 2001).

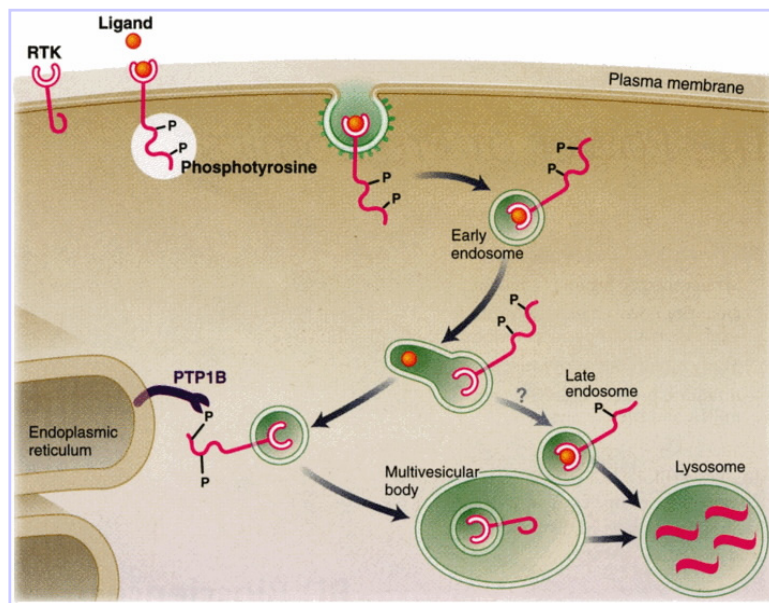


Figura 10. Mecanismo de acción de PTP1B (Gill, 2002).

Sin embargo, otros autores sugieren lo contrario; en su opinión, el propio IR fosforilaría a la PTP1B en ciertos residuos de Tir, incrementando así su actividad catalítica (Bandyopadhyay et al., 1997; Dadke et al., 2000a).

Por otro lado, esa actividad también está regulada por un mecanismo de oxidación de la Cis de su centro activo. Este residuo, indispensable para su unión al sustrato, es susceptible de ser oxidado e inactivado reversiblemente en presencia de ciertos factores, como por ejemplo, la insulina (Mahadev et al., 2001).

El ratón knockout de PTP1B manifiesta una sensibilidad a la insulina incrementada, ya que presenta un mayor nivel de fosforilación del receptor de insulina con respecto al ratón normal. Sin embargo, esto sucede en hígado y en músculo pero no en el tejido adiposo. Estos resultados sugieren que la regulación es diferente en este último, en donde otras PTPasas podrían intervenir para desfosforilar el IR como mecanismo compensatorio al déficit de PTP1B (Cheng et al., 2002). Además, se ha descrito que la sobreexpresión de PTP1B en adipocitos no altera al transporte de glucosa ni la activación de Akt (Venable et al., 2000). Esto mismo también se ha observado en trabajos *in vivo* (Hirata et al., 2003).

La PTP1B regula además la adiposidad y la expresión de los genes implicados en lipogénesis (Rondinone et al., 2002); por ejemplo, el ratón knockout de PTP1B es resistente a la obesidad. Todos estos datos hacen de esta proteína una diana farmacológica interesante para el tratamiento de la obesidad y de la diabetes (Bento et al., 2004).

## **6.6.- PTEN**

Esta fosfatasa regula negativamente la vía PI3K/Akt participando en procesos de migración, crecimiento y supervivencia celular (Torres y Pulido, 2001). Es una proteína citosólica en su estado inactivo (fosforilada) y su activación (mediante desfosforilación) conduce a su reclutamiento a la

membrana, en donde desfosforila el fosfato de la posición 3' de los fosfoinositoles.

Su gen está localizado en el cromosoma 10q23; diversas mutaciones parecen estar implicadas en múltiples procesos cancerosos, por ello se considera una gen supresor de tumores; por ejemplo, en cáncer de próstata (Simpson y Parsons, 2001).

La kinasa encargada de fosforilar en residuos de Ser/Tre y mantener en estado inactivo al PTEN es la proteín kinasa II, también denominada caseín kinasa II (CK2). En mamíferos, se trata de una proteína heterotetramérica, formada por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$  y  $\alpha'$ ) y dos reguladoras ( $\beta$ ), y se han observado alteraciones en su expresión en distintos tipos de tumores (Torres y Pulido, 2001). La fosforilación de PTEN en residuos de Tir por la familia de proteín-kinasas Src disminuye su actividad PTPásica, al igual que CK2 a través de Ser/Tre; la diferencia es que esta familia de kinasas, además reduce su estabilidad, mientras CK2 la aumenta (Lu et al., 2003).

La fosforilación de PTEN en sus residuos de Tre 382 y 383 y Ser 380 la mantiene en el citosol, en una conformación estable, monomérica y cerrada; así posee baja afinidad por los dominios PDZ de otras proteínas. Sin embargo, cuando se desfosforila adquiere una conformación abierta y se transloca a la membrana plasmática, en donde interacciona con proteínas con dominios PDZ, formando un complejo de elevado peso molecular denominado PAC (complejo asociado a PTEN) (Vazquez et al., 2001).

Las proteínas cuyos dominios PDZ están implicados en el PAC no se conocen con exactitud, pero se ha descrito que las proteínas MAGI intervienen incrementando la eficiencia de esta fosfatasa, a través de la formación de este complejo. En concreto, MAGI 2 (proteína membranosa de células epiteliales) actúa incrementando la actividad supresora de la señal PI3K/Akt de PTEN en los tejidos donde está presente (Wu et al., 2000).

La expresión de PTEN reduce en la célula los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>; sin embargo, también participa en un mecanismo de regulación positiva, ya que incrementa el contenido de IRS-2 así como su asociación a la subunidad

reguladora p85 de la PI3K (Simpson et al., 2001). Por tanto, el mecanismo de acción de esta fosfatasa resulta de especial interés; no sólo en relación con procesos neoplásicos sino también en el estudio de otras patologías, como la diabetes. Se ha descrito que la inhibición específica de PTEN in vivo en ratones diabéticos revierte su hiperglucemia y además permite la fosforilación de Akt estimulada por insulina, con una intensidad comparable a la de los ratones sanos (Butler et al., 2002).

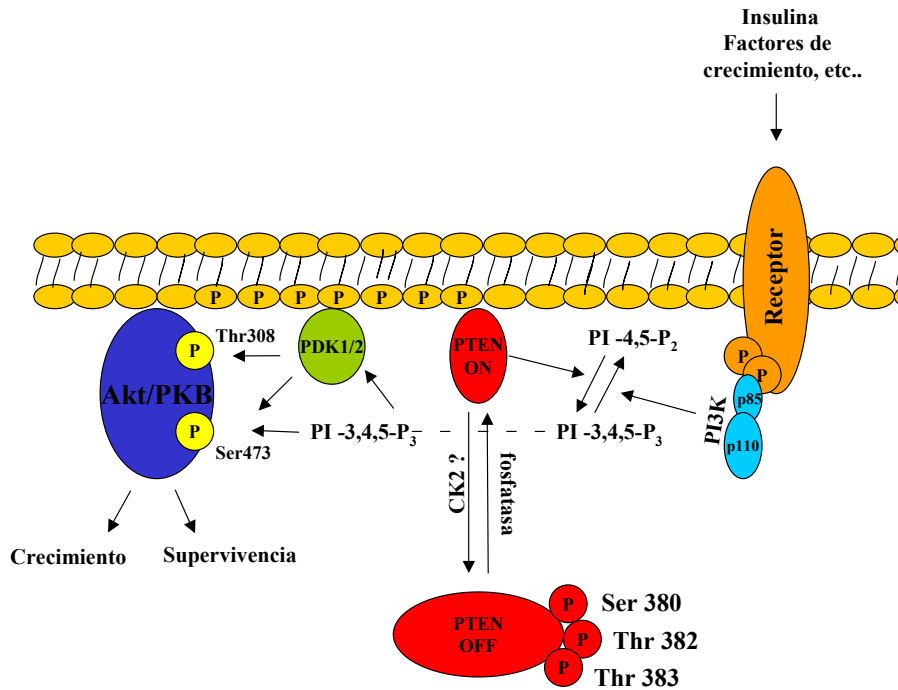


Figura 11. Activación de PTEN a través del receptor de insulina.



### 6.7.- Vía CAP

Aunque está bien establecido que la PI 3-kinasa se requiere para la translocación del GLUT-4, también es funcional otra vía, dependiente de CAP. Ello se ha deducido de la observación de que, además de la actividad de PI3K, parecen ser necesarias otras señales para la captación de glucosa estimulada por insulina.

La vía dependiente de CAP tiene lugar en unos microdominios de la membrana plasmática denominados caveolas, caracterizados por su riqueza en proteínas con restos GPI, glucolípidos, esfingolípidos y colesterol. La proteína estructural principal de estos microdominios es la caveolina; se ha descrito que la supresión del gen de caveolina 1 produce la degradación del receptor de insulina en células adiposas, ocasionando así resistencia a esta hormona (Cohen et al., 2003).

La vía CAP funciona del siguiente modo (esquemáticamente representado en la Fig.12): la insulina induce la fosforilación de Cbl; para ello se requiere la proteína adaptadora APS, que recluta al Cbl hacia el receptor de esa hormona. CAP interacciona con secuencias ricas en prolina de Cbl, por medio de sus dominios SH3 (Ribon et al., 1998). Tras la fosforilación del receptor de insulina, el complejo CAP-Cbl se transloca y se une a flotilina en la membrana plasmática, en donde a través del resto fosforilado del Cbl interacciona con el dominio SH2 de la proteína adaptadora Crk II. Ésta forma un complejo constitutivo con C3G, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina. Una vez translocado dicho complejo a la membrana, cataliza el intercambio de GDP por GTP y ello conduce a la activación de TC10 (de la familia Rho) (Chiang et al., 2001). Al parecer, éste proporciona una segunda señal para la translocación del GLUT-4, que actuaría en paralelo con la PI 3-kinasa (Saltiel y Kahn, 2001).

Datos recientemente publicados indican que la vía CAP y la de PI3K actúan sinérgicamente; por un lado, esta última regularía la incorporación del GLUT4 al medio intracelular, permitiendo así el tráfico vesicular; y por otro lado, la vía de CAP intervendría en el movimiento, unión y fusión de

las vesículas de GLUT-4 con la membrana plasmática, mediante la interacción de TC10 con un componente del complejo de exocitosis, Exo 70 (Inoue et al., 2003).

## **7.- GLUTs**

La molécula de glucosa, debido a su carácter polar, requiere de proteínas transportadoras específicas que permitan su paso a través de las membranas biológicas. Dichas proteínas se designan como GLUTs, de los cuales existen una serie de isoformas.

El primer cDNA de un transportador de glucosa fue el del GLUT-1, clonado en 1985 (Mueckler et al., 1985); desde entonces se han identificado unas doce isoformas, codificadas por genes diferentes. Se distinguen por su afinidad a la glucosa, especificidad de tejido, localización subcelular, etc. (Gould y Holman, 1993; Mueckler, 1994; Zorzano et al., 2000; Joost y Thorens, 2001).

Todos los GLUTs están constituidos estructuralmente por 12 segmentos transmembranosos con los dos extremos terminales situados intracelularmente.

El GLUT-1 constituye el 3-5% de las proteínas de membrana del eritrocito y es muy importante en el cerebro, aunque se expresa en la mayoría de los tejidos; se considera implicado en el transporte basal de glucosa. Diversos estudios demuestran una redistribución del GLUT-1 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática en respuesta a insulina en el músculo cardíaco, tanto en cardiomiocitos aislados o en corazón perfundido de rata como en estudios *in vivo* (Fischer et al., 1996; Rett et al., 1996; Fischer et al., 1997; Gavete et al., 2002). Este fenómeno no ocurre en músculo esquelético pero en adipocitos también se ha observado (Zorzano et al., 1989).

El GLUT-2 presenta una afinidad muy baja hacia la glucosa, con una  $K_M$  elevada (Thorens, 1996); se expresa selectivamente en tejidos con elevado flujo de glucosa, como el intestino o riñón y, sobre todo, en hepatocitos y células  $\beta$  pancreáticas.

ISOFORMA	TEJIDOS	$K_M$ (mM) 2-Desoxiglucosa
GLUT 1	Placenta; cerebro; eritrocitos; tejido muscular y tejido adiposo	$6.9 \pm 1.5$
GLUT 2	Hígado; célula $\beta$ pancreática; intestino delgado (membrana basolateral) y riñón (túbulo proximal)	$11.2 \pm 1.1$
GLUT 3	Células nerviosas, cerebro; bajos niveles en riñón, placenta, hígado y corazón (humanos)	$1.4 \pm 0.06$
GLUT 4	Múculo, corazón y tejido adiposo	$4.6 \pm 0.3$
GLUT 5	Intestino delgado (membrana apical), tejido adiposo, y bajos niveles en cerebro y músculo	---
GLUT 8	Testículo; músculo; cerebro; hígado; tejido adiposo y riñón; blastocisto	2.4
GLUT 9	Cerebro; bazo y leucocitos	elevada
GLUT 10	Hígado; páncreas; corazón; pulmón; cerebro; riñón; placenta y músculo esquelético (humanos)	0.3
GLUT 11	Corazón y músculo esquelético	---
GLUT 12	Músculo esquelético y tejido adiposo	---

Tabla 2. Transportadores de glucosa: isoformas, localización y  $K_M$  para la 2-DOG.

El GLUT-3 se encuentra mayoritariamente en las neuronas (Magnani et al., 1996) y tiene una expresión marginal en otros tejidos (Grover-McKay et al., 1999) como músculo esquelético, corazón, hígado, etc. Posee una elevada afinidad por la glucosa; por ello, resulta de especial importancia en tejidos con baja disponibilidad pero alta demanda de este sustrato, como es el cerebro.

El GLUT-4 es la proteína responsable del transporte de glucosa estimulado por insulina y por ello se expresa en los tejidos sensibles a esta hormona. En condición basal está situado en vesículas intracelulares y tras el estímulo insulínico se transloca a la membrana plasmática para llevar a cabo la captación de glucosa.

El GLUT-5 es en realidad un transportador de fructosa y está situado mayoritariamente en el intestino delgado (Castelló et al., 1995).

El GLUT-8, inicialmente denominado GLUT-X1 (Ibberson et al., 2000), posee un valor de  $K_M$  similar al del GLUT-3 y por tanto, elevada afinidad por la glucosa. Su localización es intracelular y se ha observado su translocación a la membrana plasmática en respuesta a insulina en el estadio de blastocisto, periodo en el que el GLUT-4 todavía no está presente (Pinto et al., 2002). Se ha propuesto que este transportador sea el que permita la captación de glucosa en esa célula, bajo estímulo insulínico. Además, se han encontrado niveles elevados de GLUT-8 en testículos (Doege et al., 2000b), aunque su función aquí no está del todo clara.

El GLUT-9, inicialmente denominado GLUT-6, también posee una secuencia característica que le permite su localización intracelular. No se encuentra en tejidos sensibles a la insulina (Lisinski et al., 2001); sólo se expresa en cerebro y tejido linfóide (bazo y leucocitos periféricos) (Doege et al., 2000a). Su  $K_M$  es muy elevada y por tanto, tiene baja afinidad por la glucosa.

El GLUT-10 es el transportador con mayor afinidad por la glucosa descrito hasta ahora, con un valor aproximado de  $K_M$  de 0.3 mM. Su expresión es característica en hígado y células  $\beta$  pancreáticas. Por ello, debido a sus propiedades funcionales y a su localización, podría resultar muy importante para el metabolismo de la glucosa y tener relevancia en la etiología de la diabetes tipo 2 (Dawson et al., 2001; Wood et al., 2003).

El GLUT-11 se expresa sólo en músculo esquelético y corazón; está relacionado con el GLUT-5, porque parece que transporta principalmente fructosa. Sin embargo, se ha propuesto que en el ratón deficiente de GLUT-4 sea el GLUT-11 el transportador que permita la captación de glucosa por el músculo (Doege et al., 2001).

El GLUT-12 es el transportador de glucosa más recientemente caracterizado; se expresa en los tejidos muscular y adiposo (Rogers et al., 2002; Wood et al., 2003).

### **7.1.- Translocación del GLUT-4 regulada por insulina:**

La insulina estimula la captación de glucosa por las fibras musculares y los adipocitos por medio de tres mecanismos en los que está implicado el GLUT-4: a) el incremento de su expresión o la reducción de su

degradación; b) la translocación de este transportador desde unos compartimentos intracelulares -que constituyen un reservorio del mismo- hasta la membrana plasmática; c) el aumento de su actividad intrínseca, es decir, de su capacidad de transporte (Watson y Pessin, 2001).

De los anteriores mecanismos, el que mejor se ha estudiado es el segundo; la insulina, después de unirse a su receptor, estimula la translocación del GLUT-4 a través de la activación de dos vías que implican a la PI 3-kinasa y a CAP, respectivamente; se han descrito en los apartados 6.2 y 6.7 y se esquematizan en la Fig. 12 (Saltiel y Pessin, 2002). Aunque la importancia relativa de ambas vías no está perfectamente aclarada, se sabe que la translocación ocurre según los siguientes términos generales: se han identificado dos reservorios intracelulares de vesículas de GLUT-4, tanto en músculo esquelético como en corazón (Zorzano et al., 2000). Se diferencian en su respuesta tras el estímulo insulínico y en su composición: el compartimento denominado endosomal es insensible a la insulina y posee un alto contenido de proteínas SCAMPs (proteínas de membrana asociadas a vesículas de secreción); el compartimento exocítico es sensible a la insulina y se caracteriza por su elevada concentración de VAMP2 (una proteína asociada a vesículas de membrana) e IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina).

Tras el estímulo insulínico son las vesículas exocíticas las que se translocan a la membrana plasmática; el compartimento endosomal proviene de la endocitosis posterior de estas vesículas que habían sido previamente translocadas. El compartimento exocítico se va regenerando a partir del endosomal (Fischer et al., 1997).

Además de las proteínas indicadas como principales componentes de los reservorios del GLUT-4, hay otra serie de moléculas que intervienen en el movimiento intracelular de estas vesículas, en su fusión y en su integración a la membrana plasmática; entre ellas, destacan: la culebrina, las GTPasas Rab 4 y p24 (esta última en corazón) la Akt-2, etc. (Cormont et al., 1993; Uphues et al., 1994; Sherman et al., 1996).

Otros agentes estimulantes de la translocación del GLUT-4

A título indicativo, en la tabla 3 se muestran otros agentes o situaciones que, además de la insulina, conducen a un incremento de la translocación del GLUT-4 en los tejidos musculares o adiposos. Entre ellos se ha estudiado particularmente el efecto del ejercicio físico o la contracción muscular.

Ambos modulan la captación muscular de glucosa de un modo complejo y todavía no bien conocido. Por una parte pueden inducir cambios en la sensibilidad a la insulina y, por otra parte, pueden estimular mecanismos independientes de la hormona que también conduzcan a la translocación, en cuyo caso tendrían efectos aditivos sobre los de la insulina (Lund et al., 1998; Wojtaszewski et al., 2002; Kirwan y del Aguila, 2003).

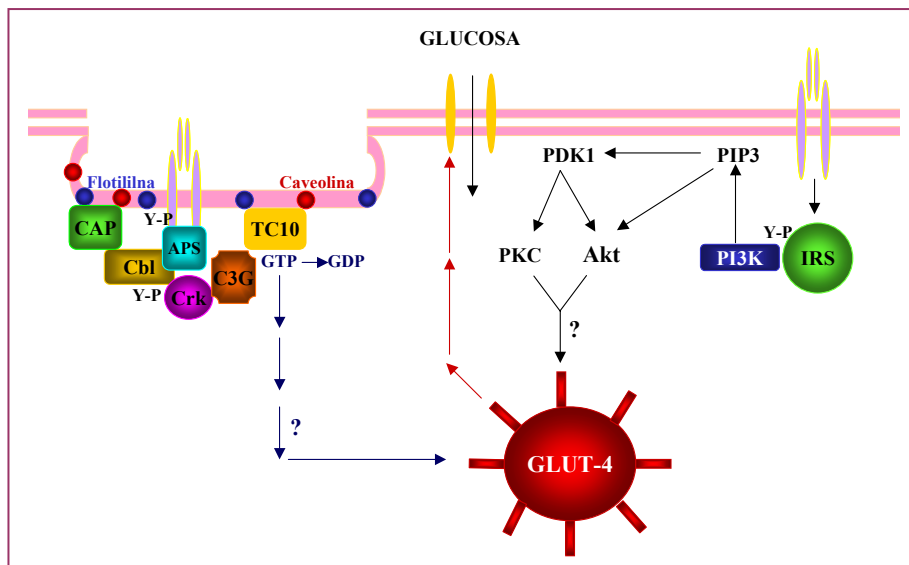


Figura 12. Mecanismo de translocación de los transportadores de glucosa (adaptado de Saltiel y Pessin, 2002).

FACTOR REGULADOR	MECANISMO DE ACCIÓN	GLUT	TEJIDO
INSULINA	IR, PI3K	GLUT-4	músculo, tejido adiposo
IGF-I, IGF-II	IGF-IR, PI3K	GLUT-4	músculo, tejido adiposo
CONTRACCIÓN	5'-AMPK?	GLUT-4, GLUT-1?	músculo esquelético
HIPOXIA	5'-AMPK	GLUT-4	músculo esquelético
ÓXIDO NÍTRICO	GMPc	GLUT-4?	músculo esquelético
ÉSTERES DE FORBOL	PKC	GLUT-4?	músculo esquelético
AGONISTAS $\beta$ -ADRENÉRGICOS	proteína Gs	GLUT-4	músc. esq., tej. adiposo marrón
AGONISTAS $\alpha$ -ADRENÉRGICOS	proteína Gi	GLUT-4?	músculo cardíaco
BRADIQUININA	proteína Gq	GLUT-4	músculo esquelético
ADENOSINA	proteína Gq	GLUT-4	tejido adiposo blanco y marrón

Tabla 3. Reguladores del transporte de glucosa a través de diferentes mecanismos en diversos tejidos (Czech y Corvera, 1999).

### **7.2.- Acción de la insulina sobre la actividad intrínseca del GLUT-4:**

La insulina, además de inducir la translocación del GLUT-4, puede incrementar su capacidad de transporte, a través de la vía de las MAPK. Estas constituyen una superfamilia de Ser/Tre kinasas que mediatizan un amplio número de respuestas celulares (transcripción génica, organización del citoesqueleto, apoptosis, etc), muchas de las cuales son típicamente inducidas por situaciones de stress. Comprende tres subfamilias: ERK (“extracellular signal-regulated protein kinases”), JNK (“c-JUN N-terminal kinases”) y p38; esta última es la que ha sido recientemente implicada en el estímulo del transporte de glucosa provocado por la insulina (además del efecto de esta hormona sobre la translocación).

Existen cinco isoformas de p38, con diferente localización tisular y especificidad de sustrato. Su activación está mediatizada por una doble fosforilación, en la Tre 180 y Tir 182, que puede ser inducida por diversos factores, entre ellos por la insulina. Como ha demostrado recientemente el grupo de Klip, esta activación de la p38 conduce a un incremento de la

capacidad de transporte de las moléculas de GLUT-4 previamente translocadas a la membrana plasmática (Furtado et al., 2002; Michelle et al., 2003; Niu et al., 2003).

### **7.3.- Acción de la insulina sobre la expresión del GLUT-4:**

El posible papel regulador de la insulina sobre la expresión del GLUT-4 ha sido objeto de varios estudios. En algunos estados de déficit hormonal, como ocurre en las ratas tratadas con estreptozotocina, esa expresión está disminuida, tanto en el tejido adiposo como en el músculo esquelético, resultado que sugiere una función positiva al respecto para la insulina (Zorzano et al., 1998; Wang et al., 1999); dicha función se ha demostrado más claramente en el tejido adiposo, en el cual la hormona actúa como un potente inductor de la expresión del transportador (Klip et al., 1994; Ducluzeau et al., 2002). Recientemente se ha visto que en el ser humano la insulina induce un aumento del mRNA del GLUT-4, tanto en el músculo como en el tejido adiposo y que esta respuesta no se produce si existe un cuadro de resistencia a la hormona, derivado de un retraso en el crecimiento intrauterino (Jaquet et al., 2001).





**II**

---

**OBJETIVOS**



**Los objetivos que se han planteado en este trabajo son los siguientes:**

**1.- Estudiar el efecto de la subnutrición proteico-calórica crónica sobre la capacidad de respuesta a la insulina y la vía de señales de esta hormona en el músculo esquelético de la rata adulta.**

**2.- Estudiar el efecto de la subnutrición proteico-calórica crónica sobre la capacidad de respuesta a la insulina y la vía de señales de esta hormona en el corazón de la rata adulta.**

**3.- Estudiar el efecto de la subnutrición proteico-calórica iniciada en la etapa intrauterina y continuada durante la lactancia sobre la capacidad de respuesta a la insulina y la vía de señales de esta hormona en el músculo esquelético de la rata lactante.**

**4.- Estudiar el efecto de la subnutrición proteico-calórica iniciada en la etapa intrauterina y continuada durante la lactancia sobre la vía de señales de la insulina en el hígado de la rata lactante.**



**III**

---

**MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- Animales y dieta**

Para la realización de este trabajo se han empleado ratas de la raza Wistar obtenidas del propio animalario del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Ello ha permitido controlar rigurosamente la nutrición de estos animales, tanto en las etapas gestacional y lactante como en la adulta.

El animalario está dotado de un acondicionador de temperatura que lo mantiene constantemente entre 22-24 °C y de un reloj regulador automático que determina la existencia de un ciclo de luz/oscuridad, iluminando la estancia a las 7:00 h y oscureciéndola a las 19:00 h.

El inicio de la gestación fue establecido mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata (180-200 g) al día siguiente de su apareamiento con el macho (300-400 g) y fue confirmado a los 14 días por palpación abdominal. Al día siguiente del nacimiento, todas las camadas se uniformaron, disponiendo 8 crías hembras en cada una. Las ratas se destetaron a los 21 y 25 días de vida, controles y subnutridas respectivamente.

### **1.1.- Composición del alimento suministrado**

El alimento suministrado a las ratas fue el pienso SYERMUS S-10, adquirido de SYERS; éste se presenta en forma de porciones prensadas cuya composición general, en gramos por ciento, es la siguiente:

Proteínas.....	19%
Hidratos de carbono.....	56%
Lípidos.....	3.5%
Celulosa.....	4.5%
Vitaminas y minerales.....	5%
H <sub>2</sub> O.....	12%

Esta mezcla posee un valor de 2.54 Kcal/g.



## 1.2.- Pauta de subnutrición

En base a la cantidad de alimento suministrado a las ratas se definieron dos grupos experimentales:

- Ratas controles:

Las ratas controles procedían de progenitores que siempre se alimentaron *ad libitum* con el pienso descrito. Tras el destete, estos animales dispusieron en sus jaulas de un amplio exceso de dicho pienso, que fue ingerido *ad libitum*.

- Ratas subnutridas:

El modelo de subnutrición que hemos aplicado se basa en una limitación de la cantidad del pienso que se suministra diariamente. En consecuencia, la subnutrición derivó de una deficiencia nutricional mixta, es decir, proteico-energética. La limitación se inició durante la última fase de la gestación, continuándose a lo largo de la lactancia y tras el destete. Por lo tanto, durante las dos primeras etapas mencionadas la restricción se aplicó a la gestante y a la madre y así la deficiencia nutricional en la rata feto y en la lactante fue indirecta, resultante de la carencia materna; a partir del destete, una vez separadas las crías de la madre, la restricción se aplicó directamente a las crías. La cantidad de pienso suministrado varió a lo largo de las etapas que se están considerando (gestación, lactancia y periodo posterior) concretándose en la siguiente pauta (esquemática en la Fig. 13):

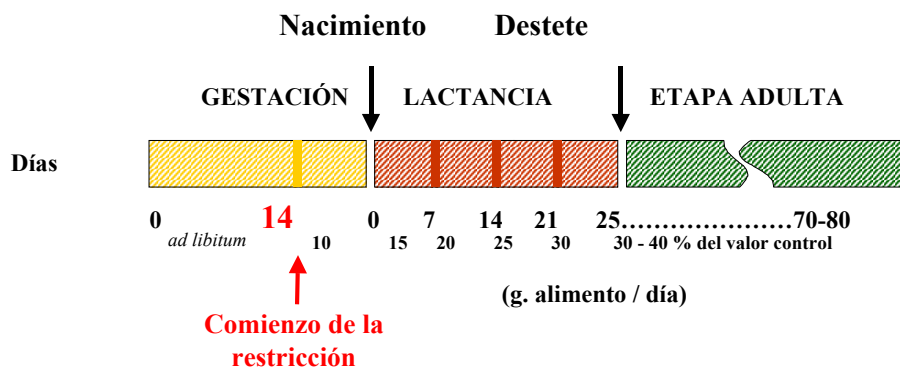


Figura 13: Esquema representativo del modelo de subnutrición.

### 1.- Gestación:

A partir del día 14 de la gestación, las ratas preñadas recibieron diariamente 10 g de pienso hasta el día del parto.

### 2.- Lactancia:

Durante la 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> semana de la lactancia se proporcionó a las ratas madres, 15, 20 y 25 g diarios de pienso, respectivamente; durante los tres días siguientes (los inmediatamente previos al destete) se les suministró 30 g por día.

### 3.- Etapa posterior al destete:

A partir del día 25<sup>o</sup> y hasta la edad adulta, se fijó una pauta de subnutrición mediante la cual las ratas recibieron el 30-40 % de la comida ingerida *ad libitum* por los controles; para establecer dicha pauta, se calculó el peso del pienso ingerido cotidianamente por éstas, obteniendo un valor promedio cada cinco días sucesivos; es decir, la media diaria ingerida entre los días 25<sup>o</sup> y 29<sup>o</sup>; 30<sup>o</sup> y 34<sup>o</sup>; etc., así hasta los 70 días. A las ratas subnutridas se les suministró cada día, como se ha dicho, una cantidad de pienso equivalente al 30-40 % del valor promediado.

## **2.- Determinaciones analíticas**

### **2.1.- Análisis de la glucosa en sangre total o desproteinizada**

#### Sangre total:

Para el análisis de la glucosa en sangre total, efectuado durante el desarrollo del “clamp” (sección 3.1), se utilizó el analizador automático “Glucometer Elite XL” (Bayer). Está basado en la aplicación de unas tiras reactivas, capaces de succionar por capilaridad un volumen aproximado de 15 µl de

sangre, que es dirigida hacia unos electrodos sensibles, posteriormente leídos por el aparato.

#### Sangre desproteinizada:

La sangre se desproteinizó con una mezcla de  $\text{SO}_4\text{Zn}$  0.08M y  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0.08M, a partes iguales (mezcla de Somogyi). El análisis de la glucosa se efectuó en el sobrenadante de este desproteinizado neutro, aplicando el método de la glucosa oxidasa acoplado a la oxidación de un cromógeno. El Kit con los reactivos necesarios se adquirió de BioSystems.

### **2.2.- Valoración de proteínas**

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford, utilizando como patrón  $\gamma$ -globulina (Bradford, 1976). Esta técnica colorimétrica se basa en el cambio de absorbancia (de 465 nm a 595 nm) producido cuando el colorante azul brillante Coomassie, en solución ácida, se une a proteínas, a través de sus restos básicos y aromáticos. El reactivo se adquirió de Bio-Rad.

### **2.3.- Análisis de la insulina plasmática**

En el caso de las ratas adultas se analizó por radioinmunoensayo, utilizando un kit de reactivos suministrado por NOVO Research Institute; dicho kit consta de lo siguiente: insulina de rata (como patrón), insulina humana marcada con  $\text{I}^{125}$  y anticuerpos contra insulina porcina, procedentes de cobaya.

La pauta operativa, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial, en esencia, consistió en lo siguiente:

Se mezclaron las soluciones de insulina patrón o el plasma problema con el anticuerpo y la insulina marcada, procediéndose a su incubación durante 20-24 horas a 4 °C. El complejo inmunológico formado se precipitó añadiendo etanol al 96% y centrifugándose a continuación. El precipitado se lavó con 2 ml de una mezcla de etanol al 96% y tampón fosfato 40 mM.

Tras una segunda centrifugación, el precipitado se redisolvió con 0.5 ml de NaOH 0.05 N. La radioactividad ligada en el complejo se midió en un contador Packard Auto-Gamma 5650.

Con las dosis crecientes de insulina patrón se confeccionó una curva sobre la cual se leyeron los problemas.

En el caso de las ratas de 10 días de vida la insulina también se analizó por radioinmunoensayo, pero con un kit adquirido de LINCO; dicho kit contiene: insulina de rata (como patrón), insulina de rata marcada con  $I^{125}$  y anticuerpos contra insulina de rata, procedentes de cerdo.

La pauta operativa, indicada también por el fabricante, en esencia, consistió en lo siguiente:

Se mezclaron las soluciones de insulina patrón o problema con el anticuerpo y la insulina marcada, procediéndose a su incubación durante 20-24 horas a 4 °C. El complejo inmunológico se precipitó durante 20 minutos con un reactivo precipitante que incluía dicho kit y que consistía en una mezcla de: Ig G anti-cerdo procedente de cabra, 3% de polietilenglicol, 0.05% de Tritón X-100 en fosfato salino 0.05M, EDTA 0.025 M y azida sódica al 0.08%. Posteriormente se centrífugo y en el precipitado resultante se midió la radioactividad ligada con un contador Packard Auto-Gamma 5650.

### **3.- Tratamiento de las ratas con insulina**

Se han aplicado diferentes modalidades de tratamiento insulínico, en función de la edad de las ratas estudiadas y del tipo de información que se quería obtener sobre la acción de la hormona. En todos los casos, se utilizó insulina humana biosintética Actrapid (Novo Nordisk A/S, Dinamarca). Para estudiar los efectos a corto y medio plazo, la hormona se administró instantáneamente, por vía intravenosa o intraperitoneal, en unas condiciones determinadas que se irán indicando en los apartados que se refieren a los distintos resultados. Para evaluar el estímulo sobre la captación de glucosa en las ratas adultas, se aplicó la técnica del “clamp” que, por su especial complejidad, se describe a continuación con más detalle.

### **3.1.- Clamp hiperinsulinémico-euglucémico**

Esta técnica consiste en el mantenimiento de la glucemia en su nivel inicial a lo largo de una condición hiperinsulinémica; para lograr esta situación se requiere efectuar una doble infusión por vía intravenosa: de insulina, para alcanzar un determinado nivel plasmático, y de glucosa, para compensar el efecto hipoglucemiante de la hormona (DeFronzo et al., 1979).

Las ratas adultas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (4 mg/100 g peso) y se les practicó una traqueotomía, para prevenir posibles problemas respiratorios; se cateterizó una arteria carótida para la toma de muestras de sangre. Se les administró una dosis de 5.0 UI /h /Kg de insulina (Actrapid, Novo, Copenhague, Dinamarca) a través de la vena safena, mediante una bomba de perfusión. La solución de insulina contenía heparina.

Las soluciones de glucosa, al 30% y 40% para controles y subnutridas respectivamente, fueron introducidas a través de la otra vena safena, a partir de los 5 minutos del comienzo de la infusión de insulina. Estas soluciones se administraron por medio de una bomba Precidor (Infors AG, Basilea) que permitía ir cambiando paulatinamente el volumen infundido; para evaluar éste con exactitud se calibró previamente la bomba.

Tras el comienzo de la infusión de insulina, fueron obteniéndose pequeñas muestras de sangre arterial carotídea, a intervalos de unos 5 minutos, determinando en ellas la concentración de glucosa (como se ha indicado en la sección 2.1.). En función del valor obtenido se fue variando (incrementando paulatinamente) la tasa de infusión de glucosa, de modo que a lo largo del experimento la glucemia fuese constante. Esta condición se mantuvo durante 60 minutos; entonces la rata fue sacrificada y los diferentes órganos (corazón y gastrocnemius) se recogieron y congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Después se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

### **3.2.- Test de tolerancia a la glucosa**

Esta prueba se efectuó en las ratas lactantes, a los 10 días de vida. Los animales se separaron previamente de las madres y se mantuvieron a 37° C. Se les administró una cantidad de 1mg/g cuerpo de glucosa, mediante la

inyección intraperitoneal de una solución al 35%. Las ratas se sacrificaron a los 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 minutos después, por decapitación, y se obtuvo la sangre del cuello. La glucemia se determinó inmediatamente, empleando el analizador automático indicado en la sección 2.1. A continuación se heparinizó la sangre, se obtuvo el plasma y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento del análisis de la insulina, efectuado mediante el RIA descrito en la sección 2.3. Las respuestas integradas de glucosa e insulina se calcularon sumando los incrementos, sobre el valor basal, de las concentraciones alcanzadas a lo largo de la prueba.

#### **4. Determinación del consumo tisular de glucosa**

##### **4.1.- Administración de 2-desoxi-D-[1- $^3\text{H}$ ]glucosa (2DOG) tritiada y toma de muestras**

El consumo de glucosa, tanto en situación basal como en la condición hiperinsulinémica lograda con el “clamp”, fue evaluado por medio de la administración del análogo no metabolizable de la glucosa, 2-desoxi-D-[1- $^3\text{H}$ ] glucosa (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra); este compuesto se fosforila a 2DOG-6 Fosfato y entonces se acumula en los tejidos sin experimentar catabolismo ulterior, de modo que la evaluación de la radioactividad tisular es un índice de la tasa de captación (Sokoloff et al., 1977).

La pauta empleada para evaluar dicha captación fue diferente para la situación basal (A) y para la condición hiperinsulinémica (B).

(A) En la situación basal se actuó del modo siguiente: una vez operadas las ratas como se indica en la sección anterior y tras unos 30 minutos de estabilización, se inyectó por una vena safena una cantidad de 30  $\mu\text{Ci}$  de 2DOG tritiada, disueltos en 0.25 ml de ClNa al 0.9% (conteniendo 50  $\mu\text{l}$  de heparina). A continuación se tomaron muestras de sangre carotídea cada cinco minutos, hasta los 60 minutos; dichas muestras, una vez desproteinizadas, se utilizaron para evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de 2DOG tritiada y glucosa, relación necesaria para el cálculo de la cantidad de análogo acumulado en los tejidos. Inmediatamente después de la última toma de sangre, se sacrificó

al animal, se extrajeron el gastrocnemius de ambas patas y el corazón y se trataron como se ha indicado antes.

(B) Cuando se efectuó esta prueba en las ratas tratadas con insulina las condiciones fueron las siguientes. A los 40 minutos del comienzo de la administración de la hormona se inyectaron por una vena safena 30  $\mu$ Ci de 2DOG tritiada, disueltos en 0.25 ml de ClNa 0.9%; a partir de ese momento se extrajo sangre carotídea, cada 5 minutos, hasta el final de la prueba que, en este caso, tuvo una duración de 25 minutos. Después se procedió como se ha indicado anteriormente.

#### **4.2.- Fundamento de la cuantificación de la 2DOG captada por los tejidos**

La cuantificación de la 2DOG captada por los diferentes tejidos se efectúa aplicando la siguiente expresión, descrita por Sokoloff y col. (Sokoloff et al., 1977):

$$R_g = \frac{C_m(T)}{LC \int_0^T (C_p^*/C_p) \times dt}$$

En donde:

$R_g$  es la tasa de acumulación de la 2DOG por unidad de masa tisular.

$C_m(T)$  es la cantidad total de 2DOG acumulada irreversiblemente por unidad de masa tisular a lo largo de un tiempo  $T$  de permanencia de este análogo en la sangre (como se ha explicado, la especie acumulada irreversiblemente es, en realidad, 2DOG-6 Fosfato).

$C_p^*$  es la concentración plasmática de 2DOG tritiada.

$C_p$  es la concentración plasmática de glucosa.

$LC$  ("lumped constant") es una constante adimensional cuya significación es la siguiente: dado que las moléculas de glucosa y 2DOG son ligeramente distintas, existe una cierta discriminación tisular entre ambas para su captación desde la sangre; la  $LC$  puede considerarse como la relación de

probabilidades de que una u otra sea captada. Su valor se obtiene in vitro, incubando un tejido concreto en presencia de glucosa o DOG (Leturque et al., 1986); en la fórmula ejerce un efecto corrector de la cantidad de análogo captada. Cuando la LC para un tejido es bien conocida y se aplica en la fórmula, el dato obtenido corresponde exactamente a la “tasa de glucosa acumulada por unidad de masa”. Sin embargo, dado que en este trabajo interesa menos conocer la cantidad absoluta de glucosa acumulada por un tejido determinado que la posible diferencia entre la capacidad de las ratas subnutridas y sus controles con respecto a dicho acúmulo, no se ha tenido en cuenta el valor de este parámetro.

En función de la expresión anterior se deduce que para evaluar la tasa de captación de 2DOG-6 Fosfato se requiere conocer: a) la relación de concentraciones plasmáticas entre 2DOG tritiada y glucosa,  $C_p^*/C_p$ ; b) la cantidad de 2DOG-6 Fosfato acumulada en el tejido,  $C_m$  (T). Ambos parámetros se determinan como se explica a continuación.

#### **4.3.- Evaluación de la relación plasmática 2DOG tritiada/glucosa**

Para calcular la relación 2DOG tritiada /glucosa en el plasma a lo largo del tiempo de desaparición de la 2DOG introducida en el compartimento sanguíneo se operó del siguiente modo: 20  $\mu$ l de las diferentes muestras de sangre se desproteinizaron con la mezcla de Somogyi (ver sección 2.1.). A continuación, por un lado se determinó la glucosa (sección 2.1.) y por otro se evaluó la radioactividad de 0.1 ml del sobrenadante tras la adición de 3 ml de líquido de centelleo, en un contador Betamatic Kontron.

#### **4.4.- Evaluación de la 2DOG-6-Fosfato acumulada**

Unos 150 mg de cada tejido fueron digeridos a 60 °C durante 1 hora, con agitación continua, en 0.5 ml de NaOH 1M. El digerido se neutralizó con 1 ml de ClH 1M. Una alícuota de 0.2 ml del neutralizado fue tratada con 1 ml de ácido perclórico al 6%, con posterior centrifugación; otra alícuota de 0.2 ml se trató con 0.5 ml de  $SO_4Zn$  0.08 M y 0.5 ml de  $Ba(OH)_2$  0.08 M, siendo también centrifugada. Dado que tanto la 2DOG como la 2DOG-6-Fosfato son solubles en ácido perclórico, en el primero de los sobrenadantes



se encuentra la mezcla de ambas especies que están contenidas en el tejido; en cambio, la 2DOG-6 Fosfato es adsorbida en el precipitado que se genera con la mezcla de Somogyi ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 + \text{SO}_4\text{Zn}$ ), de modo que el segundo de los sobrenadantes solo contiene la 2DOG tisular (Kipnis y Cori, 1959). En consecuencia, la diferencia de radioactividad entre ambos sobrenadantes (evaluada en 0.8 ml de uno y otro tratados con 5 ml de líquido de centelleo) se corresponde con el contenido de 2DOG-6 Fosfato en el tejido, el dato Cm (T) de la ecuación anterior. Una porción del digerido neutralizado se destinó al análisis de las proteínas.

### **5.- Fraccionamiento de los músculos esquelético y cardíaco de las ratas adultas**

El procedimiento utilizado fue similar al descrito por Gumá y col. (Gumá et al., 1995), con algunas modificaciones. Se partió de 4-6 g de músculo esquelético (gastrocnemius) o cardíaco, los cuales se homogeneizaron en el siguiente tampón: Hepes 20 mM, ClK 0.15 M, con Leupeptina 1  $\mu\text{M}$  y PMSF 100  $\mu\text{M}$  como inhibidores de proteasas, pH 7.4, con el Polytron (V = 5) durante 20 segundos; posteriormente se añadió un determinado volumen de una solución de ClK, para llegar a una concentración final en el homogeneizado de 0.65 M. Se dejó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó a 2000 g 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se depositó en hielo. El pellet resultante se resuspendió en 7 ml de tampón de homogeneización, se rehomogeneizó en las mismas condiciones anteriores durante 10 segundos y se volvió a tratar con la solución de ClK; se dejó 15 minutos en hielo y se centrifugó durante 10 minutos, de nuevo a 2000 g.

La mezcla de los dos sobrenadantes obtenidos fue sometida a ultracentrifugación a 190000 g durante 1 hora. El pellet resultante se resuspendió en un potter de Teflón, tras añadir 1 ml de tampón: Sacarosa 0.25 M,  $\text{CO}_3\text{HNa}$  10 mM,  $\text{NaN}_3$  5mM, PMSF 100  $\mu\text{M}$ , pH 7.4.

El homogeneizado así obtenido constituyó el extracto crudo de membranas; de éste se separó una pequeña alícuota para la determinación de enzimas y proteínas; el resto se dispuso sobre un gradiente discontinuo de

sacarosa: 25%, 30% y 35% (p/p, en Hepes 20 mM, pH 7.4) y se centrifugó durante 16 horas a 150000 g.

Después de este proceso, las interfases de los gradientes se recogieron por medio de una jeringuilla y se diluyeron diez veces con el tampón de homogeneización; fueron centrifugadas durante 90 minutos a 190000g. Los pellets resultantes se resuspendieron en Hepes 20 mM, pH 7.4; estas preparaciones constituyen las diferentes fracciones de membrana, designadas como 25, 30 y 35; el pellet obtenido en los gradientes de sacarosa, también resuspendido, se denominó 35P. Todos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### **6.- Fraccionamiento del músculo esquelético de las ratas lactantes:**

Para las ratas lactantes se utilizó otra técnica de fraccionamiento muscular, basada en el procedimiento descrito por (Dombrowski et al., 1996); permite utilizar una menor cantidad de músculo de partida (2.5-3 g), lo cual resulta ventajoso en el caso de estas ratas más pequeñas. El tejido, una mezcla de los músculos obtenidos de las dos patas traseras de varios animales, se homogeneizó en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  10 mM,  $\text{NaN}_3$  5 mM, sacarosa 0.25M, PMSF  $100\mu\text{M}$ , pH 7.0, durante 8 segundos en el Polytron ( $V=4.4$ ). Tras centrifugar a 1300 g 10 minutos, el pellet se homogeneizó con 7 ml del tampón indicado, en las mismas condiciones, repitiendo la centrifugación. La mezcla de los dos sobrenadantes se centrifugó a 9000 g 10 minutos y el nuevo sobrenadante se centrifugó a 190000 g durante 1 hora.

El pellet se resuspendió manualmente en un póter de Teflón, con 1.2 ml del tampón de homogeneización y se dispuso sobre un gradiente discontinuo de sacarosa: 10% y 40% (p/p en Tris 50 mM, pH 8.5).

Al pellet inicial resultante de las dos centrifugaciones se le añadieron 6 ml del tampón de homogeneización y se resuspendió mecánicamente con un póter de Teflón. Tras añadir  $\text{ClK}$  y  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_2$  sólidos para lograr unas concentraciones de 0.3 M y 25 mM, respectivamente, se incubó con agitación orbital a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas y después se centrifugó a 1200 g 5 minutos; el sobrenadante, así como los siguientes, se sometieron a las siguientes centrifugaciones: 1000 g/30 min, 53000g/1 hora y 190000 g/1 hora. El último pellet se resuspendió manualmente en un potter de teflón

con 1.5 ml del tampón de homogeneización y se dispuso sobre el siguiente gradiente discontinuo de sacarosa: 25%, 32% y 35% (p/p en Tris 50 mM, pH 8.5).

Los dos gradientes se centrifugaron a 150000 g durante 16 horas; las interfases, recogidas como se ha descrito en el apartado anterior, fueron diluidas con Tris 50 mM, pH 8.5 y se centrifugaron a 200000 g durante 90 minutos. Los pellets resultantes, resuspendidos en Hepes 20 mM, pH 7.4, constituyen las diferentes fracciones de membrana y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **7.- Valoración de las actividades de Fosfodiesterasa-I y 5'- Nucleotidasa**

Ambos enzimas se utilizaron como marcadores de la membrana citoplasmática. La Fosfodiesterasa-I se analizó empleando el método descrito por (Bode et al., 1991); se basa en la hidrólisis del sustrato artificial p-nitrofenil timidilato, catalizada por este enzima, y la valoración consecuente del p-nitrofenol liberado sobre una curva patrón confeccionada con este producto. La 5'- Nucleotidasa se valoró a partir del fosfato inorgánico liberado por el enzima, utilizando AMP como sustrato (Aronson y Touster, 1974). El fosfato se determinó mediante una colorimetría, por el método clásico de Fiske y SubbaRow (1925).

### **8.- Desarrollo del procedimiento del “Western Blotting”**

#### **8.1.- Preparación de las muestras**

Un volumen de muestra conteniendo entre 5-150  $\mu\text{g}$  de proteínas se mezcló en proporción 1:1 con el tampón de Laemmli (Laemmli, 1970): Tris 72 mM, pH 7.6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0.002% (p/v), y DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol 2mM; se calentó a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, antes de cargarlo en el gel. Para el análisis de los GLUTs las muestras se trataron con el tampón pero sin el reductor y no se calentaron; en lugar de ello se mantuvieron 30 minutos a temperatura ambiente.

## **8.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membranas de PVDF**

Se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 5% para el gel concentrante y 7-12% para el gel separador. El primero, que contiene los pocillos de depósito, sirve para alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas. La concentración de poliacrilamida utilizada varió en función del peso molecular de la proteína a analizar.

El tampón utilizado en el desarrollo de la electroforesis fue el siguiente: Tris 0.25M, glicocola 1.9M y SDS 1%.

La electrotransferencia se llevó a cabo en una membrana Immobilon-P (PVDF: Fluoruro de polivinilideno) a 100V, durante 2 horas, en frío, con el siguiente tampón: Tris 0.025M pH 8.3, glicocola 0.19M, metanol al 20%.

## **8.3.- Inmunodetección de las proteínas**

Finalizada la transferencia, se bloquearon todos los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Para ello, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación, en la siguiente solución de bloqueo: tampón PBS (ClNa 0.68M, ClK 13.4mM, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 7,3mM, PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> 40mM) suplementado con leche en polvo desnatada al 5%, en la mayoría de los casos; en otros, el bloqueo se realizó con una solución de BSA (albúmina bovina sérica) al 3% en PBS. Posteriormente se eliminó este tampón y se sustituyó por una solución del anticuerpo primario disuelto en PBS, o bien en PBS conteniendo BSA al 3% y azida sódica al 0.02%, dejándose a 4 °C durante toda la noche.

Los anticuerpos que se han utilizado, así como las diluciones empleadas están representados en la tabla 4.

Tras la incubación con el primer anticuerpo se realizaron 4 lavados de 10 minutos con agitación, con la solución lavadora (PBS con Tween-20 al 0.1%). A continuación las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo, dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón, cabra o conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma, San Luis, USA). La incubación se

efectuó durante 1 hora, tras la cual se realizó otra serie de lavados con la misma solución anterior.

La detección de los inmunocomplejos se efectuó por quimioluminiscencia (BM Chemiluminescence, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). La absorbancia de las bandas se determinó, tras el correspondiente revelado, en un densitómetro (Molecular Dynamics) o bien usando un escáner y aplicando el programa informático Total Lab Image Master 1.0.

#### **8.4.- Borrado de las membranas de PVDF previamente transferidas**

Una vez reveladas las membranas, se trataron un minuto con metanol y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para realizar sucesivos análisis de otras proteínas en estas mismas membranas, se sometieron a un proceso de borrado (“stripping”), consistente en el tratamiento durante 20 minutos a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  con la siguiente solución: Tris 62.5 mM pH 6.8, SDS 0.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS (Tris 0.01M, ClNa 0.15M, pH 8.0) enriquecido con Tween-20 al 0.05% (T-TBS). Finalmente, las membranas se bloquearon siguiendo los mismos pasos indicados en el apartado anterior.

#### **9.- Obtención de lisados tisulares**

Se partió de unos 100 mg de tejido (muscular, cardíaco o hepático) que se homogeneizaron con el Polytron, a velocidad máxima durante 20-30 segundos, en 1.5 ml de un tampón de lisis cuya composición era: Hepes 50 mM, ClNa 150 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1 mM,  $\text{P}_2\text{O}_7\text{Na}_4$  10 mM, FNa 10 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, Nonidet P40 1%, pH 7.5. Extemporáneamente, se añadió: PMSF 2 mM, Leupeptina 10  $\mu\text{M}$ , o-Vanadato 2 mM, Benzamidina 2 mM y Aprotinina 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Los homogeneizados se mantuvieron en agitación orbital a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 hora y a continuación se centrifugaron a 100000g durante 1 hora, recogiendo el sobrenadante, que se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **10.- Inmunoprecipitaciones**

Se llevaron a cabo en un volumen tisular que contenía de 500 a 2000  $\mu\text{g}$  de proteínas, completado a 500  $\mu\text{l}$  con el tampón de lisis; sobre ese volumen se añadió de 0.5 a 1  $\mu\text{g}$  del anticuerpo primario y la mezcla se mantuvo en agitación orbital a 4 °C, durante 16 horas.

Transcurrido este tiempo, los inmunocomplejos se recogieron introduciendo 20  $\mu\text{l}$  de la siguiente suspensión de agarosa:

- proteína A-agarosa (Roche), cuando el anticuerpo procedía de conejo.
- IgG-agarosa (Sigma), cuando el anticuerpo era monoclonal.
- “Gamma Bind Plus Sepharose” (una forma recombinante de la proteína G) (Amersham) cuando el anticuerpo procedía de cabra.

Se incubó a 4 °C, con agitación orbital, durante 2 horas; los inmunocomplejos ligados se separaron del sobrenadante mediante una breve centrifugación. A continuación se procedió a su lavado, aplicando uno de los siguientes procedimientos:

- a) cuando se destinaron al análisis de las proteínas mediante Western, se efectuaron tres lavados con el mismo tampón de lisis y uno con PBS; finalmente se eluyó con el tampón de carga descrito en el apartado 3.7.1. (con DTT) calentando 5 minutos a 95 °C.
- b) cuando se destinaron a la valoración de la PI 3-kinasa, se lavaron del siguiente modo: dos veces con PBS con Tritón X-100 al 1%; una vez con Tris 100 mM, EDTA 1 mM y ClLi 0.5 M (pH 7.5); una vez con Tris 25 mM, EDTA 10 mM, ClNa 10 mM (pH 7.5). Finalmente, tras descartar el sobrenadante mediante centrifugación, los inmunocomplejos ligados a la agarosa se conservaron a -80 °C, hasta el momento de la valoración enzimática.

### **11.- Determinación de la actividad de la PI 3-kinasa en músculo y corazón**

La actividad de esta enzima se valoró en estado basal y bajo estímulo insulínico. Para esta última condición, las ratas adultas fueron anestesiadas con pentobarbital (4 mg/ 100 g peso) y se les abrió su cavidad abdominal, para inyectarles 5 UI de insulina (Novo, Actrapid) o un volumen equivalente de ClNa 0.9% a través de la vena porta. A los 90 segundos, se les extrajo el gastrocnemius y el corazón, que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido; fueron almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la valoración de la actividad enzimática.

Las ratas lactantes no se anestesiaron; recibieron 4U/100g de insulina (Novo, Actrapid) por vía intraperitoneal y fueron decapitadas a los 5, 10 ó 20 minutos, obteniéndose el músculo de las patas traseras, que fue congelado en nitrógeno líquido y mantenido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis enzimático. La actividad basal se determinó en ratas tratadas paralelamente con ClNa al 0.9%.

Antes de valorar la actividad enzimática, se obtuvieron los lisados tisulares, aplicando el procedimiento descrito previamente (apartado 9).

Después se llevaron a cabo las inmunoprecipitaciones, con anti-fosfotirosina, anti-IRS-1 o anti-IRS-2 (apartado 10), según se indicará en los resultados correspondientes. Para la valoración enzimática la pauta analítica fue la siguiente: sobre los inmunocomplejos ligados a la agarosa se añadieron, directamente, 50  $\mu\text{l}$  de sustrato, consistente en una mezcla de  $\alpha$ -fosfatidilinositol/L- $\alpha$ -fosfatidil-L-serina, suspendidos mediante sonicación en Hepes 25 mM con EDTA 1 mM (pH 7.5). La reacción se inició añadiendo 25  $\mu\text{l}$  de la siguiente solución: 10  $\mu\text{Ci}$  de [ $\gamma^{32}$  ATP] 100 nM con ATP 300  $\mu\text{M}$ , disueltos en Hepes 25 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, EGTA 0.5 mM (pH 7.4). Después de incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 400  $\mu\text{l}$  de una mezcla de cloroformo/metanol (1:2, vol/vol) y ClH al 1%, 150  $\mu\text{l}$  de cloroformo y 150  $\mu\text{l}$  de ClH 10 mM. Se centrifugó y se recogió la fase inferior que fue lavada con 500  $\mu\text{l}$  de una mezcla de metanol, ClH 100 mM y EDTA 2 mM. Después de una nueva centrifugación, la fase orgánica se dejó secar en una campana de extracción, disolviéndola en 30  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Esta solución

fue transferida a placas de silica gel (Merck), para desarrollar una cromatografía en 1-propanol/agua/acético (65:35, vol/vol; 2M). Efectuada la separación, la placa se secó y se puso en contacto con una película sensible durante varias horas, a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se procedió a su revelado y cuantificación densitométrica (apartado 8.3).

## **12.- Aislamiento del RNA y análisis del mRNA por “Northern Blotting”**

### **12.1.- Extracción del RNA**

El RNA total se obtuvo utilizando el método de extracción con Tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, descrito por Chomczynski y Sacchi, (1987).

Se partió de unos 500 mg de tejido congelado que se homogeneizaron con 4 ml de solución D (Tiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 0.75 M, Lauril Sarcosina 20% y  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC) y 2-mercaptoetanol; (mezcla extemporánea de 30 ml de solución D y 216  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol) con el Polytron a  $V = 20$  durante 60 segundos; tras un breve reposo, se le añadió:

- 256  $\mu\text{l}$  de Acetato sódico 3 M.
- 4.096 ml de Fenol.
- 800  $\mu\text{l}$  de CIA ( Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1)

Se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos. En el tubo se formaron dos fases:

- fase superior acuosa: en ella se encuentra el RNA.
- interfase y fase inferior de fenol-cloroformo: contiene el DNA y las proteínas.

Se recogió la fase acuosa, se le añadió isopropanol y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, centrifugándola después en las mismas condiciones anteriores. Eliminado el sobrenadante se añadió sobre el pellet 400  $\mu\text{l}$  de Solución D y 2- mercaptoetanol. Una vez resuspendido se añadió 400  $\mu\text{l}$  de Isopropanol y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. A continuación se



centrifugó a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró con cuidado; el pellet fue lavado con etanol frío al 75%. Se centrifugó otra vez en las mismas condiciones anteriores y se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido finalmente contenía el RNA. Para su resuspensión, se añadió 100 µl de EDTA 5mM y se dejó reposar en hielo durante 30-60 minutos.

### **12.2.- Conservación de las muestras de RNA y recuperación posterior**

Las soluciones de RNA se conservaron añadiendo 3 volúmenes de etanol al 75 % y manteniéndolas a -80 °C.

Para su recuperación, se descongelaron y se les añadió un volumen de acetato sódico suficiente para que su concentración final fuera de 0.3 M. Se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Finalmente, el pellet se resuspendió tratándolo con EDTA 5 mM, durante 45 minutos.

### **12.3.- Valoración de las muestras de RNA**

Para la determinación de la cantidad y calidad del RNA una alícuota de la solución de éste se diluyó en agua tratada con dietilpirocarbonato y se midió su absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 310 nm; los valores de absorbancia obtenidos se relacionan con las cantidades de RNA, proteínas e impurezas, respectivamente.

La concentración de RNA se calculó teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm se corresponde con 40 µg de RNA de cadena sencilla. La relación  $A_{260}/A_{280}$  es un índice de la calidad del RNA y se consideró adecuada cuando estuvo comprendida entre 1.9 y 2.

### **12.4.- Electroforesis del RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membranas de Nylon**

El gel de agarosa se preparó al 0.9%, ya que esta proporción es la adecuada para moléculas de RNA de 0.5-10 Kb. Las condiciones desnaturalizantes se consiguieron mediante la adición de formaldehído. Para confeccionar el gel se pesaron 2 g de agarosa, a los que se añadieron 20 ml de MOPS 10X (MOPS 0.2 M, AcNa 0.05 M, EDTA 0.5 M en H<sub>2</sub>O DEPC, pH 7.4) y 150 ml de agua destilada, calentando hasta ebullición.

Tras enfriar, se añadieron 32 ml de formaldehído y la mezcla se dispuso en una cubeta.

Las muestras de RNA fueron tratadas con Bromuro de etidio y calentadas durante 10 minutos a 65 °C, antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V. Tras la migración, el RNA se visualizó bajo luz UV. No fue necesario el uso de marcadores, ya que en las células de mamíferos aparecen dos bandas de 28S y 18S, correspondientes al RNA ribosomal, de 4718 y 1874 nucleótidos, respectivamente.

### **13.- Obtención del DNA plasmídico para transfección de las sondas de cDNA**

#### **13.1.- Procedencia y características de las sondas y plásmidos**

El cDNA de GLUT-4, de 2.47 Kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI en el plásmido pBluescript KS+ (Stratagene, Merck Farma y Química, Barcelona).

El cDNA de GLUT-1, de 2.6 Kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Eco RI y subclonado a partir del plásmido pGT3 en el plásmido pBluescript KS-(Promega Inmogenetics Diagnóstica y Tecnología, Barcelona).

El cDNA de GLUT-3, de 0.6 kb se encontraba insertado en un lugar de corte para Hinc II en el plásmido pGEM4Z (Promega Inmogenetics Diagnóstica y Tecnología, Barcelona).

Dichos plásmidos fueron cedidos generosamente por el Dr. A. Zorzano (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona).

El cDNA correspondiente a la sonda ribosomal 18 S, de tamaño 200 pares de bases, fue sintetizado en el Imperial Cancer Research Fund (Londres) y cedido por la Dra. Paloma Navarro (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid).

### **13.2.- Preparación de bacterias competentes**

Se trata de crear un estado de competencia en las bacterias que facilite la incorporación del DNA plasmídico, para lo cual se siguió el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Se seleccionó una colonia de bacterias de una placa crecida durante 16-20 horas a 37 °C, y con ella se sembraron 100 ml de medio LB (10 g de ClNa, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura por litro, esterilizado en autoclave). Después, el volumen total se distribuyó en tubos Falcon estériles de 50 ml, que se dejaron en hielo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron ligeramente, a 4 °C, durante 10 minutos. El precipitado resultante fue resuspendido en 10 ml de Cl<sub>2</sub>Ca 0.1 M y mantenido en hielo 10-30 minutos, para permeabilizar las membranas. Después de centrifugar nuevamente, se eliminó sobrenadante por decantación y por último se resuspendió el precipitado en 2 ml de Cl<sub>2</sub>Ca 0.1 M frío. Las bacterias así tratadas se consideran ya competentes, y se guardaron a -80 °C para su posterior utilización.

### **13.3.- Transformación de bacterias competentes.**

Se transfirieron 50 µl de la suspensión de células competentes a un tubo eppendorf y se añadió el DNA plasmídico (100 ng); una vez mezclados, se dejó en hielo durante 30 minutos. A continuación se calentaron en un termoblock a 42 °C durante 90 segundos, y rápidamente se introdujeron en hielo. A los 2 minutos, cada muestra fue tratada con 900 µl de medio LB precalentado: triptona (10g/l), ClNa (10g/l) y extracto de levadura (5g/l); a continuación se incubaron a 37 °C en un baño con agitación durante 1 hora. Las bacterias fueron recogidas mediante una ligera centrifugación y resuspendidas con 50 µl de LB; se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y por último fueron transferidas a placas de cultivo con LB-Agar (medio LB al 1.5% de agar) suplementado con ampicilina y se dejaron crecer a 37 °C durante 12-16 horas. Pasado este tiempo, se obtuvieron las bacterias transformadas con el DNA exógeno.

### **13.4.- Crecimiento bacteriano, extracción del DNA plasmídico y purificación del cDNA.**

Para la obtención de los DNAs plasmídicos a partir de los glicerolizados o de las colonias bacterianas se procedió al crecimiento de dichas bacterias en medio LB. En primer lugar, se realizó un preinóculo a partir del glicerolizado o de la colonia, en un tubo Falcon estéril con 12 ml del medio LB suplementado con ampicilina. Se mantuvo a 37 °C con agitación circular y, al cabo de unas horas, el contenido de ese tubo fue transferido a un matraz estéril de 500 ml que contenía 200 ml de medio LB y 100 µl de ampicilina. Se dejó crecer toda la noche en las mismas condiciones anteriores.

Las bacterias se recogieron mediante una breve centrifugación, se trataron con lizozima y fueron sometidas a una lisis alcalina para extraer así los DNAs plasmídicos (Sambrook J et al., 1989). Posteriormente se purificó precipitando con acetato sódico 5 M e isopropanol, se resuspendió con etanol 75% y se centrifugó. El pellet resultante fue resuspendido en 1 ml de medio TE (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, autoclavado, pH 8.0), añadiendo 12.5 µl de solución de RNAsa (10 mg de RNAsa/ml de agua DEPC). Tras calentar en termoblock durante 30 minutos a 37 °C, fue tratado con 12.5 µl de una solución de Proteinasa K (5 mg de Proteinasa K/ml de agua DEPC) y se dejó 2 horas en el termoblock a 37 °C.

Posteriormente se añadió PMSF y se realizaron tres fenolizaciones con fenol y CIA (cloroformo/alcohol isoamílico, 24:1), centrifugando brevemente en cada una de ellas. Los sobrenadantes finales se trataron con acetato sódico 5M y etanol al 75% y se dejaron a -20 °C durante toda la noche para que precipitara el DNA plasmídico purificado. Este DNA fue resuspendido en tampón TE (Tris-CIH 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0), y quedó dispuesto para su utilización en transfecciones, previa cuantificación espectrofotométrica, efectuada del mismo modo descrito para el RNA.

Una vez aislado el DNA plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas para obtener el inserto de interés. La reacción se llevó a cabo durante 2-3 horas con el tampón de digestión adecuado. Para comprobar si el proceso había sido completo, alícuotas de las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa usando como tampón TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), al que

se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/ml). El tamaño del inserto se evaluó cargando simultáneamente en el gel un marcador (por ejemplo el cromosoma del fago λ digerido con el enzima Hind III). Exponiendo el gel a la luz UV, se pudo visualizar y fotografiar los distintos fragmentos de DNA.

Para purificar el inserto del cDNA que posteriormente serviría como sonda, el DNA plasmídico fue recuperado mediante una fenolización con fenol y CIA, manteniéndolo 3 minutos en hielo y centrifugando; el proceso se repitió pero ya solo con CIA. Después de la extracción, el sobrenadante se precipitó con acetato sódico 5 M y etanol al 75% manteniéndolo de 1-24 horas a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 45 minutos y el pellet resultante se resuspendió en medio TE. El cDNA ya purificado se guardó a -80 °C.

#### **14.- Marcaje radioactivo de las sondas**

Para marcar el DNA se diluyó previamente a una concentración de 2.5-25 ng en 45 µl de tampón TE y se desnaturalizó calentando 5 minutos a 95-100 °C en un baño y enfriando en hielo 5 minutos. Se centrifugó brevemente y el DNA se añadió al tubito de un Kit que contenía el tampón con dATP, dGTP y dTTP, enzima Klenow y los cebadores ("ryom primers"). Se añadieron a la mezcla anterior 5 µl de [<sup>32</sup>P]-dCTP, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente 1-2 horas ó 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 5 µl de EDTA 0.2M. Para realizar la "spun-column", tanto el Sephadex G-50 como la solución tampón (ClNa 150 mM, EDTA 10 mM, SDS 10%, Tris-ClH) fueron atemperados. Se pusieron 0.5 cm de lana de vidrio en la jeringuilla y con el Sephadex se completó hasta arriba. Tras empaquetar bien la columna mediante una breve centrifugación, se añadieron 100 µl de solución tampón y volvió a centrifugarse ligeramente.

A 50 µl del cDNA marcado se le añadieron 50 µl del tampón y el total resultante fue pasado por la columna, para eliminar el exceso de dCTP. Se centrifugó ligeramente durante 5 minutos; los 100 µl eluidos constituían la sonda marcada. El <sup>32</sup>P que no se había unido quedó retenido en la columna. La radioactividad del cDNA marcado se evaluó en 1 µl del eluido.

## **15.- Hibridaciones**

Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron siguiendo el método de Amasino (Amasino, 1986), con algunas modificaciones.

### **15.1.- Prehibridación**

Antes de realizar el marcaje la membrana se prehibridó con DNA de esperma de salmón para bloquear los sitios inespecíficos de unión. El procedimiento fue el siguiente:

- se preparó una solución de prehibridación que estaba formada por:
  - formamida (50%): 25 ml
  - ClNa 5M (0.25 M): 2.5 ml
  - PO<sub>4</sub>HNa 0.5 M pH 7.2 (0.1 M): 10 ml
  - Esperma de Salmón (10 mg/ml): 0.5 ml, calentados 10 min a 95 °C
  - SDS (7%): 3.5 g
  - Agua DEPC, hasta 50 ml
- Para cada membrana de 11 x 15 cm se utilizaron 15-20 ml de esta solución; ambas se dispusieron en el cartucho, durante un mínimo de 4-6 horas.

### **15.2.- Hibridación de la membrana con las sondas**

Tras la prehibridación, se añadió a las membranas la sonda marcada, a razón de  $3-6 \times 10^6$  cpm/ml de solución. La sonda había sido previamente desnaturalizada, calentándola a 95-100 °C durante 10 minutos y enfriándola en hielo. Una vez añadida la sonda, la membrana se incubó de nuevo en el horno de hibridación a 42 °C durante 24 horas.

### **15.3.- Lavado y detección de los híbridos radioactivos**

Tras la hibridación, la membrana se lavó una vez a temperatura ambiente con SSC 2 X y SDS 0.1 % durante 10 minutos, y una o dos veces a 42 °C durante 30 minutos con ese mismo medio. Finalmente, la membrana fue expuesta a una película Hyperfilm-MP.

La señal obtenida en la autorradiografía se cuantificó en un densitómetro láser.

#### **15.4.- Rehibridación de las membranas de nylon**

Después de revelar la membrana, ésta puede volver a hibridarse con otro cDNA diferente, eliminando previamente la sonda anterior. Para ello, se utilizó una solución que contenía Tris 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7.5-8) y SDS 1% (p/v), en la cual se hirvió la membrana durante 20-30 minutos. Después de comprobar que la señal radioactiva había desaparecido, la membrana pudo ser tratada con una nueva sonda; en caso contrario, se hirvió otra vez en una solución con mayor contenido de SDS (3-5 %).

#### **16.- Expresión de los resultados**

Los valores presentados constituyen la media  $\pm$  SEM de los datos obtenidos a partir de un número suficiente de experimentos, que está indicado en los resultados correspondientes.

La significación estadística de la diferencia entre las medias fue determinada mediante la t de Student's o bien aplicando el análisis de varianza (ANOVA), cuando se trataba de comparaciones múltiples. Dicha significación la hemos expresado del siguiente modo:

\* cuando  $P < 0.05$

\*\* cuando  $P < 0.01$

\*\*\* cuando  $P < 0.001$ .

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Dilución
GLUT-1	Chemicon	AB-1341	1:3000
GLUT-4	Biogenesis	4670-1704	1:1000
GLUT-2	Biogenesis	4670-1655	1:1000
GLUT-3	Chemicon	AB-1344	1:2500
GLUT-5	Chemicon	AB-1348	1:2500
IRS-1	Upstate	# 06-248	1:1000
IRS-1	Santa Cruz	SC-559	1:500
IRS-2	Upstate	# 06-506	1:1000
IRS-2	Santa Cruz	SC-8299	1:500
IR (subunidad $\beta$ )	Upstate	# 06-492	1:250-1:500
Fosfo-tirosina	Santa Cruz	SC-508	1:500
Fosfo-tirosina	Upstate	# 05-321	1:1000
Akt	Cell Signaling	# 9272	1:1000
Fosfo-Akt Ser 473	Cell Signaling	# 9271 S	1:1000
PI 3-kinasa p85	Upstate	# 06-195	1:2000
PI 3-kinasa p85 $\alpha$	Santa Cruz	SC-423	1:1000
PI 3-kinasa p85 $\alpha$	Abcam	Ab 250	1:50
PI 3-kinasa p85 $\beta$	Abcam	Ab 252	1:250
PI 3-kinasa p110 $\alpha$	Santa Cruz	SC-1331	1:500
PI 3-kinasa p110 $\beta$	Santa Cruz	SC-7175	1:500
p70S6kinasa	Cell Signaling	# 9202	1:500
Fosfo-p70S6kinasa (Tre421/ Ser424)	Cell Signaling	# 9204	1:500



---

nPKC $\zeta$	Santa Cruz	SC-216	1:500
PTP1B	Santa Cruz	SC-1718	1:500
PTEN	Cell Signaling	# 9552	1:500
Fosfo-GSK3 $\alpha/\beta$ (Ser 21/9)	Cell Signaling	# 9331	1:500
p38	Santa Cruz	SC-535	1:1000
Fosfo-p38 (Tre180/Tir 182)	Cell Signaling	#9216S	1:1000
Na-K-ATPasa $\alpha_1$	Upstate	# 06-520	1:250

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en este trabajo.

**IV**

---

**RESULTADOS**



## 1.- ESTUDIO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA ADULTA

### 1.1.- Efecto de la subnutrición sobre el crecimiento:

La restricción nutricional redujo notablemente el crecimiento de las ratas. Como se observa en la Fig. 14, los animales subnutridos presentaron a los 4 días de vida un peso corporal inferior en un 30% al de sus controles ( $6.5 \pm 1.7$  g y  $9.2 \pm 2.7$  g respectivamente); esta diferencia fue incrementándose a lo largo de la lactancia y se mantuvo después del destete. En concreto, el peso medio de las ratas adultas subnutridas (a los 70 días) fue de  $93.5 \pm 7.4$  g, un 50% inferior al de sus controles, que fue de  $188 \pm 11.2$  g. En la fotografía (Fig. 15) se observa directamente la diferencia de tamaño entre los dos tipos de animales a los 10 días de vida.

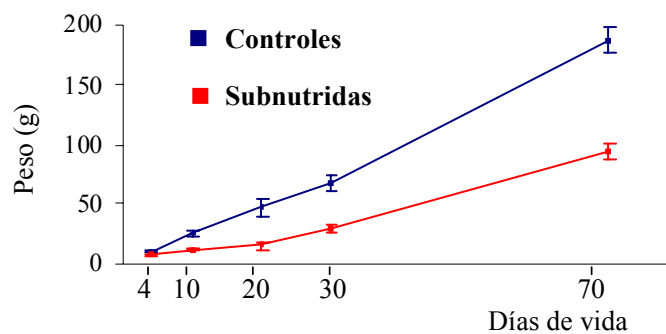


Figura 14: Pesos del cuerpo según la edad de los animales. Valores medios  $\pm$  SEM de 20-25 ratas. En todos los días presentados las diferencias de peso entre controles y subnutridas fueron estadísticamente significativas, siendo  $P < 0.001$ .

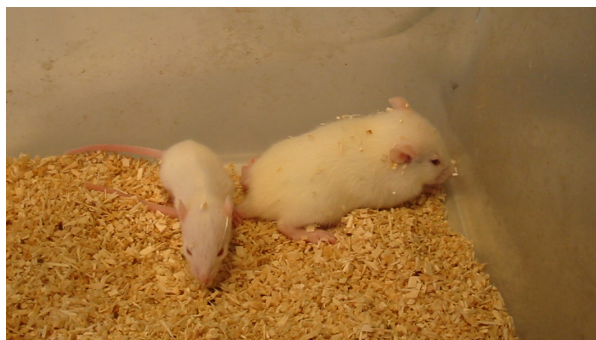


Fig. 15: Fotografía comparativa del tamaño de dos ratas, una de ellas control (a la derecha de la foto) y la otra subnutrida (situada a la izquierda) a los 10 días de vida.

### **1.2.- Efecto de la subnutrición sobre la glucemia, insulinemia y captación muscular de glucosa:**

	Basal		Clamp (5.0 UI insulina/h/Kg)	
	Controles	Subnutridas	Controles	Subnutridas
<b>Glucemia (mg/100 ml)</b>	93 ± 4	89 ± 2	100 ± 7	89 ± 5
<b>Insulinemia (μU/ml)</b>	24.9 ± 3.4	16.8 ± 2.4 *	3720 ± 230	4089 ± 293
<b>Tasa de infusión de glucosa (mg/min/Kg)</b>			26.3 ± 4.9	42.5 ± 3.0**

Tabla 5: Valores de glucemia e insulinemia y tasas de infusión de glucosa, en las condiciones basal e hiperinsulinémica. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8-12 experimentos. La significación estadística de las diferencias entre controles y subnutridas se indican como \*p< 0.05 y \*\* P<0.01.

Como se observa en la tabla 5, las ratas subnutridas presentaron una glucemia basal similar a la de sus controles; este parámetro se mantuvo sin cambios significativos en las dos poblaciones de ratas durante la condición hiperinsulinémica lograda mediante el “clamp”. La restricción nutricional, sin embargo, condujo a un déficit notable en el nivel plasmático basal de insulina.

La administración sostenida de esta hormona elevó su concentración hasta un máximo similar en ambos tipos de animales; en esa condición, para contrarrestar el efecto hipoglucemiante de la insulina fue necesario administrar la glucosa en una proporción 1.6 veces más alta en las ratas subnutridas que en sus controles.

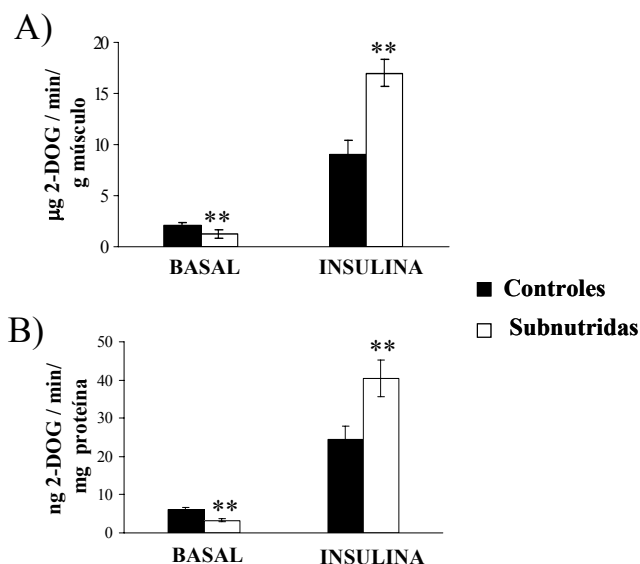


Fig. 16: Tasas de captación de 2-desoxi Glucosa por el gastrocnemius de ratas subnutridas y controles, expresada (A) por gramo de peso tisular y (B) en función del contenido en proteínas. Los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y corresponden a 6-8 determinaciones para cada condición. Las diferencias significativas se indican como: \*\*P < 0.01.

La captación basal de glucosa por el gastrocnemius se evaluó como se ha indicado en la sección 4.1. En dicho estado, el músculo de las ratas subnutridas captó solamente el 50% del valor de las controles, expresado

tanto en función del peso (Fig. 16A) como en base al contenido tisular de proteínas (Fig. 16B). Para evaluar la captación bajo estímulo insulínico, la 2-DOG se inyectó una vez alcanzado el estado estacionario en el “clamp” (véase la sección 4.1). En esa condición, la captación se incrementó en ambas poblaciones de ratas aunque en diferente proporción con respecto al estado basal: 4 y 12 veces en las controles y subnutridas, respectivamente; por ello, dicha captación se mantuvo en estas últimas significativamente por encima del valor control ( Fig. 16).

### **1.3.- Fraccionamiento del músculo gastrocnemius:**

Según se ha descrito en la sección 5 de Material y Métodos, el “extracto crudo” de membranas, que incluye todas las membranas del gastrocnemius, fue fraccionado utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa a las concentraciones de 25%, 30% y 35%. Las diferentes membranas se recogieron en las interfases del gradiente. Como se ve en la tabla 6, la cantidad de proteínas recogidas en cada una de las fracciones fue similar en las ratas subnutridas y sus controles; además, no se afectó por el tratamiento con insulina. Dicha cantidad fue mucho mayor en el extracto crudo (fracción MC) y en el sedimento situado en el fondo del tubo (fracción 35P) que en las interfases.

Para caracterizar las distintas fracciones se aplicaron tres criterios: 1) actividad de fosfodiesterasa I (PD-I); 2) contenido de la ATPasa típica de la membrana plasmática ( $\alpha_1$ -ATPasa); 3) distribución del GLUT-1.

1) La actividad específica de la PD-I fue mucho más alta en la fracción 25 que en la 35, mientras que en la 30 presentó un valor intermedio. El tratamiento con insulina no modificó esta actividad; sin embargo, la enzima se vio afectada por la condición nutricional, ya que la subnutrición indujo un aumento significativo de su actividad, observado en todas las fracciones (tabla 6).

2) En concordancia con la localización prioritaria de la PD-I, la subunidad  $\alpha_1$  de la ATPasa fue mucho más abundante en la fracción 25% que en las otras dos, como se observa en la Fig. 17.

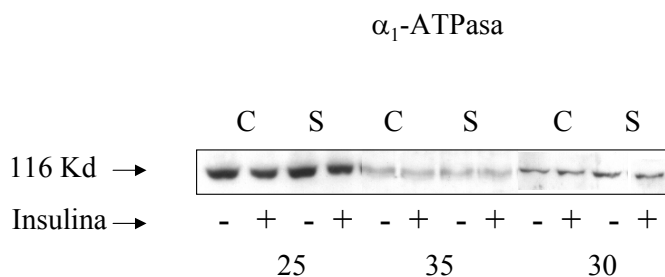


Figura 17: Representación mediante inmunoblots de la distribución de  $\alpha_1$ -ATPasa en las diferentes fracciones de gastrocnemius de ratas controles (C) y subnutridas (S). Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína.

3) La mayoría del GLUT-1 se situó en la fracción 25, en ambos tipos de ratas. La Fig. 18, en donde se observa este hecho, corresponde a un resultado representativo obtenido en animales control. Por otra parte, el GLUT-4 se distribuyó por las tres interfases de los gradientes (Fig. 18). Si se tiene en cuenta que el contenido en proteínas fue mucho más alto en la fracción de membranas internas (tabla 6), hay que deducir que este transportador se encuentra mayoritariamente situado en el compartimento membranoso intracelular; se trata de un hecho ya bien conocido y que supone una diferencia importante con respecto a la localización del GLUT-1.

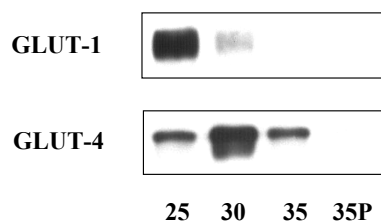


Figura 18: Distribución de GLUT-4 y GLUT-1 en las distintas fracciones de membrana muscular. Ratas controles.



Fracción	MC	25%	30%	35%	35 P					
<b>Proteínas</b>										
Controles	16.9 ± 0.6	50 ± 3	165 ± 8	602 ± 64	6.7 ± 0.3					
Subnutridas	15.7 ± 0.3	49 ± 3	172 ± 9	510 ± 64	5.8 ± 0.2					
<b>Actividad de fosfodiesterasa I</b>										
Insulina	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Controles	23 ± 3	24 ± 3	338 ± 42	334 ± 35	267 ± 40	261 ± 72	47 ± 13	42 ± 6	11 ± 1	12 ± 2
Subnutridas	37 ± 7 <sup>b</sup>	36 ± 7 <sup>b</sup>	453 ± 92 <sup>b</sup>	429 ± 90 <sup>b</sup>	390 ± 72 <sup>b</sup>	343 ± 61 <sup>a</sup>	66 ± 12 <sup>a</sup>	70 ± 19 <sup>b</sup>	19 ± 5 <sup>b</sup>	18 ± 4 <sup>b</sup>

Tabla 6.-Proteínas y actividad de Fosfodiesterasa-I (PD-I) en fracciones de gastrocnemius obtenidas en gradientes de sacarosa. Los datos de proteínas son la media ± SEM de 8-12 experimentos. MC: membranas crudas. Los datos corresponden a: mg/g (MC y 35P) o bien µg/g (25%, 30%, 35%) de músculo. Actividad de Fosfodiesterasa I: Los datos corresponden a: nmoles de p-Nitrofenol liberados/min/mg de proteína. Media ± SEM de 6 experimentos. Las diferencias significativas entre controles y subnutridas se expresan como: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01.

Estos datos, considerados en su conjunto, indican lo siguiente: a) la fracción correspondiente a la concentración de sacarosa del 25% estaba muy enriquecida en membrana plasmática; b) la fracción 35% era muy pobre en dicha membrana y, por lo tanto, concernía fundamentalmente al conjunto de las intracelulares; c) la fracción intermedia, 30% de sacarosa, contenía una mezcla de ambos tipos de membrana, mezcla que no puede resolverse adecuadamente aplicando esta técnica.

#### **1.4.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de GLUT-4 y GLUT-1 en el gastrocnemius:**

El contenido muscular de GLUT-4 experimentó una marcada reducción en las ratas subnutridas, que presentaron solo un 30% del valor control al analizarlo en la preparación correspondiente a las membranas no fraccionadas (Fig. 19, B); esa diferencia de contenido también fue patente en la membrana plasmática, así como en las situadas en el interior celular, tanto en estado basal como tras estímulo insulínico (Fig. 21). En cambio, la subnutrición indujo un incremento de 2 a 3.5 veces sobre la proporción

muscular de GLUT-1, que fue analizado exclusivamente en la membrana plasmática (Fig. 19, A).

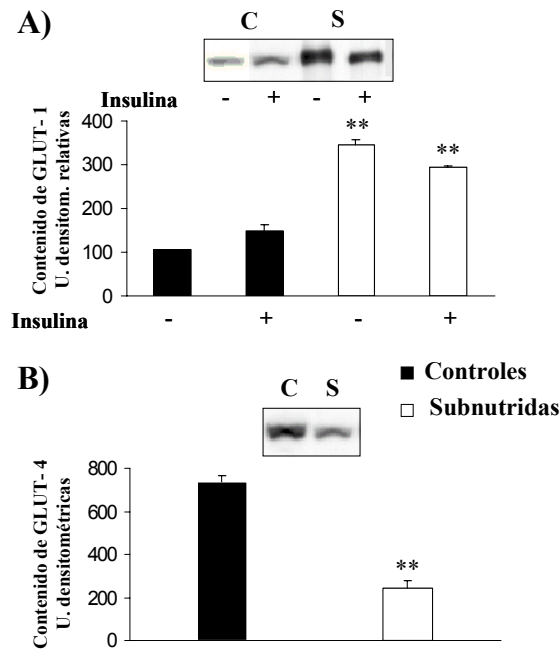


Figura 19: A) Contenido de GLUT-1 en membrana plasmática de gastrocnemius de ratas controles (C) y subnutridas (S) en estado basal (-) y tras estímulo insulínico (+). Las barras corresponden a las densidades ópticas normalizadas según el valor obtenido en las ratas controles en estado basal. B) Contenido de GLUT-4 en extracto crudo de membrana procedente de músculo gastrocnemius de ratas controles y subnutridas en estado basal. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos. Las diferencias entre los valores de las ratas controles y las subnutridas se representan por: \*\*P < 0.01.

### 1.5.- Contenido del mRNA para GLUT-4 y GLUT-1 en el gastrocnemius:

La restricción nutricional no alteró el contenido total de RNA en el gastrocnemius:  $590 \pm 19$  y  $579 \pm 26$   $\mu\text{g/g}$  para las ratas controles y subnutridas, respectivamente. Los resultados obtenidos en el análisis de los mRNA específicos para el GLUT-4 y el GLUT-1 se presentan en la Fig. 20.

Como se observa en ella, la restricción nutricional redujo de un modo considerable los niveles de mensajero correspondientes al GLUT-4, hasta un 50% del valor control. En cambio, no se observaron diferencias en los niveles del mRNA de GLUT-1. Los resultados se normalizaron con el mRNA de la  $\beta$ -actina.

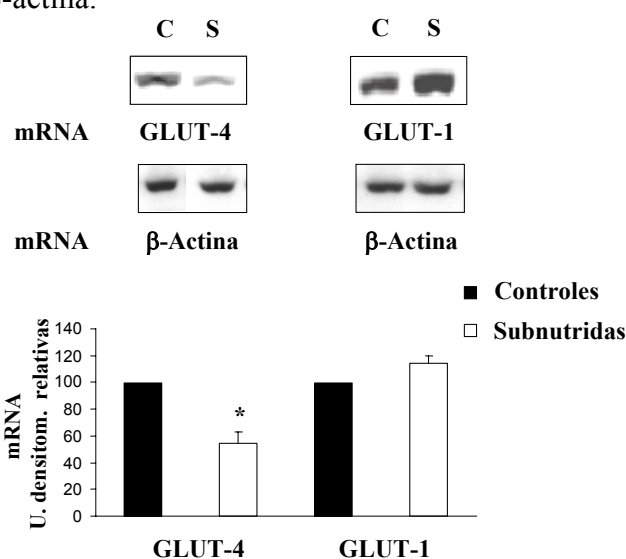


Figura 20: Northern Blot representativo de los mRNA de GLUT-4 y GLUT-1 de ratas controles (C) y subnutritas (S). Se depositaron 20  $\mu$ g de RNA total para cada muestra. Para la normalización de la carga se usó el mRNA de  $\beta$ -actina. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 5 determinaciones y las diferencias entre ratas controles y subnutritas se representan por: \*P < 0.05.

### **1.6.- Efecto de la subnutrición sobre la capacidad de translocación del GLUT-4**

En la condición hiperinsulinémica inducida mediante el clamp, el contenido de GLUT-4 experimentó un incremento en la membrana plasmática, así como un descenso en las membranas intracelulares. Esta translocación se produjo tanto en el músculo de las ratas subnutritas como en el de sus controles; sin embargo, la intensidad de este cambio de localización subcelular del GLUT-4 (con respecto a la cantidad de transportador observado en la condición basal) fue distinta al comparar ambas poblaciones de animales: 1.5 veces, aproximadamente, en las ratas

controles y unas 3 veces en las subnutridas. Es destacable el hecho de que, a pesar de esta diferencia, la cantidad de GLUT-4 presente en la membrana plasmática de las ratas subnutridas permaneció, tras el estímulo insulínico, por debajo del valor control (Fig. 21).

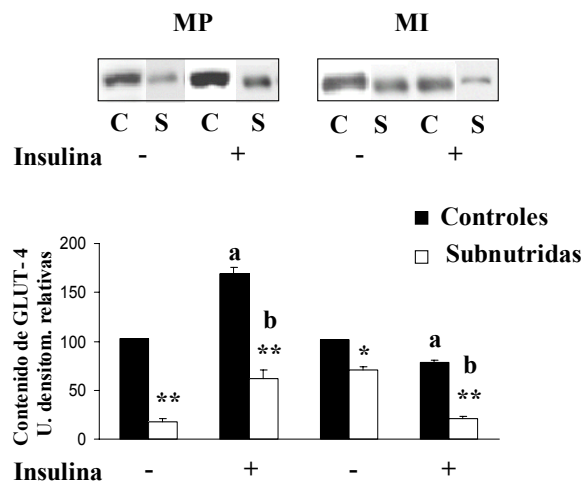


Figura 21: Contenido de GLUT-4 en membrana plasmática (MP) y membranas intracelulares (MI) procedentes del gastrocnemius de ratas controles (C) y subnutridas (S), en condiciones basales (-) o tras la estimulación con insulina (+). Se analizaron 5  $\mu$ g de proteínas. Las manchas que se muestran proceden de un experimento representativo y las barras corresponden a los resultados obtenidos en 6 experimentos independientes, presentando las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias de valores entre ratas controles vs. subnutridas se representan por: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  y las diferencias entre basales vs. estimuladas con insulina dentro del mismo grupo: <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

### 1.7.- Análisis del contenido de GLUT-3 y GLUT-5 en el músculo gastrocnemius:

Estos transportadores de glucosa, aunque minoritarios en el tejido muscular, experimentaron un gran incremento tras la restricción nutricional, que fue de 3 veces en el caso de GLUT-3, y de 6 veces en el de GLUT-5, con respecto al valor control.

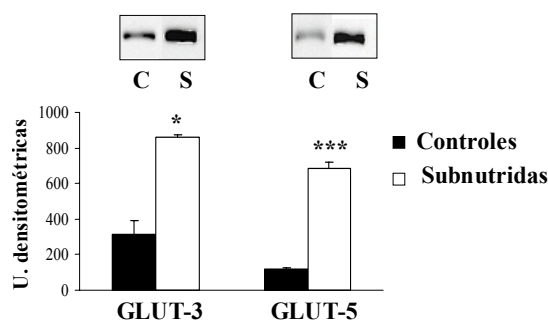


Figura 22: GLUT-3 y GLUT-5 en el gastrocnemius de ratas controles (C) y subnutridas (S). Se analizaron 80  $\mu$ g de proteínas de extracto crudo de membranas. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM de 5 determinaciones independientes. Las diferencias de valores entre ratas controles vs. subnutridas se representan por: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### **1.8.-Análisis de la vía de señales insulínica en el músculo esquelético:**

En la Fig. 23 se presentan los resultados del análisis de la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina y de uno de sus sustratos, el IRS-1, en el gastrocnemius de las ratas subnutridas y de sus controles. El contenido del receptor fue analizado tanto en el extracto membranoso crudo como en la fracción correspondiente a la membrana plasmática y se observó un incremento significativo en la población de ratas subnutridas. En cambio, la subnutrición no afectó al contenido de IRS-1.

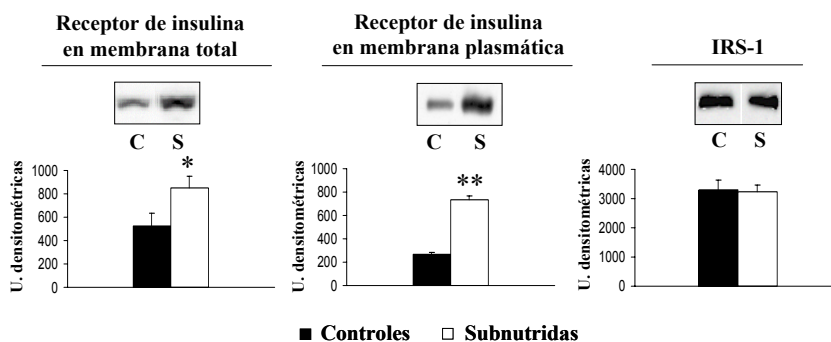


Figura 23: Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular del receptor de insulina (subunidad  $\beta$ ) en membrana total (20 $\mu$ g) y plasmática (10 $\mu$ g) y del sustrato del receptor de insulina (IRS-1). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos y representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias entre ratas controles (C) y subnutridas (S) son: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### 1.9.- Actividad de la fosfatidilinositol 3-kinasa:

En la Fig. 24 se presenta la actividad de PI 3-kinasa en músculo, determinada a partir de los inmunoprecipitados con anti-fosfotirosina. Las ratas, anestesiadas, se trataron con suero fisiológico (estado basal) o con 5 UI de insulina, administrados a través de la vena porta y se sacrificaron 90 segundos después; el dato correspondiente a los 60 minutos de tratamiento se refiere al que se obtuvo aplicando el “clamp”. Como se ve en la figura, la actividad enzimática basal fue similar en los dos grupos de animales; la insulina produjo un elevado incremento a los 90 segundos, pero el pico de actividad fue significativamente más bajo en las ratas subnutridas. A los 60 minutos de hiperinsulinemia sostenida (clamp) la actividad disminuyó frente al dato obtenido con la dosis única, permaneciendo todavía más bajo en las ratas subnutridas.

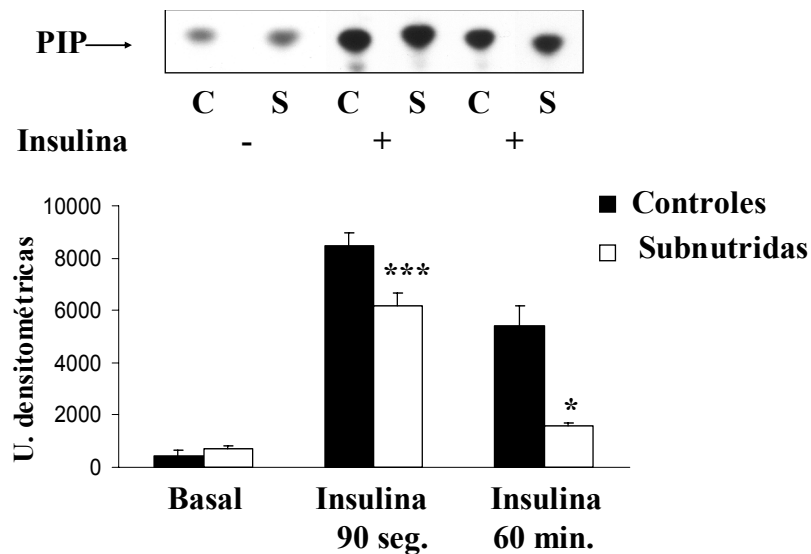


Figura 24: Actividad PI 3-kinasa en el gastrocnemius de ratas controles (C) y subnutridas (S) en condiciones basales (-) y tras la estimulación con insulina (+). Se inmunoprecipitó previamente con anti-fosfotirosina. Las manchas corresponden a la migración del fosfatidilinositol 3-fosfato en un experimento representativo. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de 6 experimentos. Las diferencias significativas entre los valores controles vs. subnutridas están indicadas como: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



## 2.-ESTUDIO EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE LA RATA ADULTA

### 2.1.- Efecto de la restricción nutricional sobre el peso del corazón:

En concordancia con la disminución en el crecimiento y en el tamaño experimentado por las ratas subnutridas (descrito en la sección 1.1), el peso de su corazón fue inferior al de las ratas alimentadas *ad libitum*, como se ve en la Fig. 25, correspondiente a los 70 días de vida. Sin embargo, la relación entre los pesos del corazón y cuerpo resultó ser ligera, pero significativamente, más alta en las subnutridas, en esa edad adulta. Aunque la etapa intrauterina no sea objeto de estudio en esta Tesis, es interesante destacar que en los fetos a término la subnutrición materna ya condujo a un menor peso del corazón:  $16 \pm 1$  mg, frente al valor obtenido en los fetos controles,  $18 \pm 2$  mg ( $P < 0.05$ ).

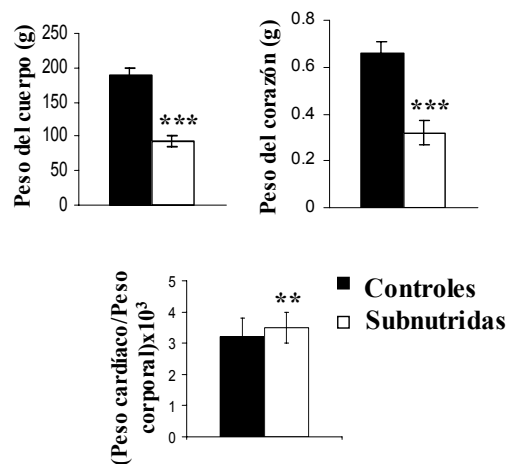


Figura 25: Pesos del cuerpo y corazón y relación entre ambos parámetros en ratas subnutridas y sus controles de 70 días de vida. Valores medios  $\pm$  SEM de 20-25 animales. La significación estadística de la diferencia entre las medias es: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .



## **2.2.- Efecto de la subnutrición sobre la captación de glucosa por el corazón:**

La captación de glucosa por el corazón fue evaluada tanto en la condición insulinémica basal como bajo el estímulo máximo alcanzado mediante la técnica del “clamp”, en la que se aplicó una dosis continua de 5.0 UI/h/kg de hormona. Los valores de glucemia e insulina plasmática característicos de las dos situaciones ya se han descrito previamente, en la sección 1.2 y en la Tabla 5, en relación con el gastrocnemius; lo que se presenta aquí, en la Fig. 26, son los datos de captación correspondientes al músculo cardíaco, expresados en función del peso (A) y del contenido de proteínas (B).

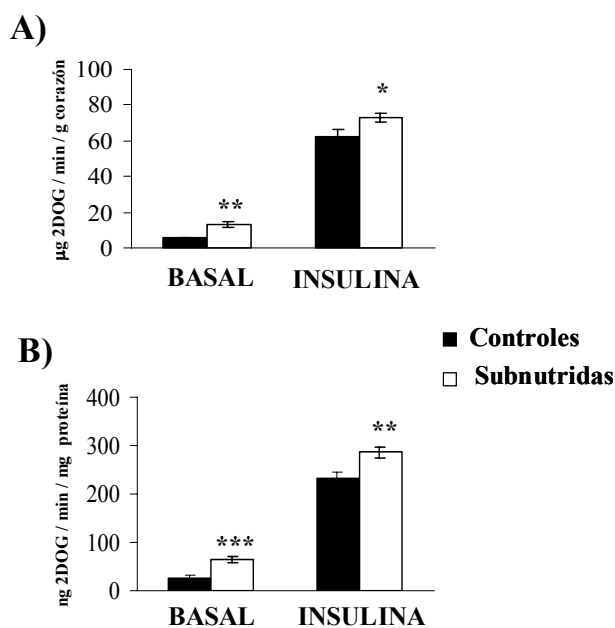


Figura 26: Tasas de captación de 2-desoxi Glucosa por el corazón de ratas subnutridas y controles, calculada (A) por gramo de peso tisular y (B) en función del contenido en proteínas. Los datos están expresados como media  $\pm$  SEM y corresponden a 6-8 determinaciones para cada condición. Las diferencias significativas se indican como: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

En el estado basal, la captación de glucosa fue 2.5 veces más alta en el corazón de los animales que estuvieron sometidos a la restricción nutricional; el tratamiento con insulina activó dicho proceso en los dos grupos de ratas: 10 veces en las controles y 5 en las subnutridas, con respecto a los valores basales; sin embargo, la captación de glucosa efectuada por el corazón de estas últimas en la condición hiperinsulinémica todavía se mantuvo por encima de los valores controles.

### **2.3.- Fraccionamiento de las membranas del músculo cardíaco:**

El fraccionamiento del corazón para obtener preparaciones enriquecidas con la membrana plasmática o internas se llevó a cabo por el mismo método aplicado en el caso del gastrocnemius, descrito en la sección 5 de Material y Métodos. En la tabla 7 se presentan los datos referentes al contenido proteico de cada fracción y a la actividad de Fosfodiesterasa-I (PD-I), una enzima utilizada habitualmente como marcador de la membrana plasmática, como ya se ha indicado antes. Las proteínas fueron más abundantes en el extracto crudo (MC) y en el sedimento final (35P) que en las otras fracciones y, además, no hubo diferencias en la cantidad recogida en cada una de ellas al comparar las ratas controles y las subnutridas; la insulina tampoco alteró ese contenido. Son resultados análogos a los que se obtuvieron en el fraccionamiento del tejido muscular esquelético (sección 1.3).

De modo similar a lo que se ha indicado para el citado tejido, la calidad del fraccionamiento efectuado a partir del músculo cardíaco se dedujo considerando la localización preferente de la PD-I y la  $\alpha_1$ -ATPasa.

Fracción	MC		25%		30%		35%		35 P	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Insulina</b>										
<b>Proteínas</b>										
<b>Controles</b>	35.2 ± 2.2	36.1 ± 2.3	53 ± 9	61 ± 10	296 ± 32	350 ± 67	832 ± 63	633 ± 56	16.7 ± 1.9	17 ± 1.8
<b>Subnutridas</b>	36.7 ± 4.5	37.4 ± 4.2	52 ± 6	55 ± 6	316 ± 53	335 ± 51	734 ± 65	725 ± 60	16.7 ± 0.9	16.2 ± 1.2
<b>Actividad de Fosfodiesterasa I</b>										
<b>Controles</b>	19.3 ± 2.1	20.1 ± 1.2	249 ± 17	298 ± 15	169 ± 14	126 ± 36	81 ± 7	96 ± 8	10.3 ± 1.0	9.8 ± 0.8
<b>Subnutridas</b>	24.8 ± 1.9	20.6 ± 1.2	368 ± 41 <sup>a</sup>	366 ± 24 <sup>a</sup>	254 ± 14 <sup>b</sup>	218 ± 3 <sup>a</sup>	99 ± 8	91 ± 8	12.2 ± 0.8	11.2 ± 0.8

Tabla 7.- Proteínas y actividad de Fosfodiesterasa-I (PD-I) en fracciones de corazón obtenidas en gradientes de sacarosa.

Los datos de proteínas son la media ± SEM de 8-12 experimentos.

MC: membranas crudas. Los datos corresponden a mg/g (MC y 35P) y µg/g (25%, 30%, 35%) de músculo cardíaco.

Actividad de Fosfodiesterasa I: Los datos corresponden a nmoles de p-Nitrofenol liberados/min/mg de proteína.

Media ± SEM de 6 experimentos. Las diferencias significativas entre controles y subnutridas se expresan como: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01.

La primera de ellas presentó la actividad más alta en la fracción 25, en ambos grupos de ratas; inesperadamente, la subnutrición indujo un incremento de esa actividad, estadísticamente significativo en las fracciones 25 (que es la de mayor contenido en membrana plasmática) y 30. La  $\alpha_1$ -ATPasa se encontró principalmente en la fracción 25 ya que las otras fracciones analizadas, contenían una cantidad relativamente escasa de este marcador (Fig. 27).

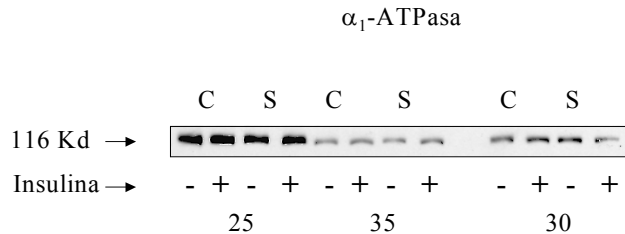


Figura 27: Representación mediante inmunoblots de la distribución de  $\alpha_1$ -ATPasa en las diferentes fracciones de corazón de ratas controles (C) y subnutridas (S). Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína.

En su conjunto, estos datos permitieron llegar a la misma conclusión obtenida con relación al fraccionamiento del gastrocnemius (sección 1.3): la fracción 25 constituyó la preparación más enriquecida en la membrana plasmática, mientras que la 35 estaba formada, sobre todo, por membranas intracelulares. Sin embargo, con esta técnica, no puede alcanzarse un grado absoluto de purificación de estos tipos de estructura celular.

#### **2.4.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3 en el músculo cardíaco:**

El contenido cardíaco de GLUT-4 experimentó una marcada reducción en las ratas subnutridas, que presentaron solo un 55% del valor control, al analizarlo en la preparación correspondiente a las membranas no fraccionadas (Fig. 28). Esa disminución también fue patente en la membrana plasmática, así como en las situadas en el interior celular (Fig. 30A). Asimismo, el GLUT-1 cardíaco estuvo reducido en las ratas subnutridas, en una proporción similar a la indicada para el GLUT-4, como fue patente en la preparación membranosa no fraccionada (Fig. 28). En concordancia con esa deficiencia, la cantidad de GLUT-1 estuvo fuertemente disminuida en la fracción de membranas internas obtenidas de las ratas subnutridas; sin embargo, en las membranas plasmáticas de dichas ratas la proporción de GLUT-1 fue marcadamente superior al valor control (Fig. 30B). La cantidad global presente del otro transportador analizado, GLUT-3, también se redujo en el músculo cardíaco como consecuencia de la subnutrición (Fig. 28).

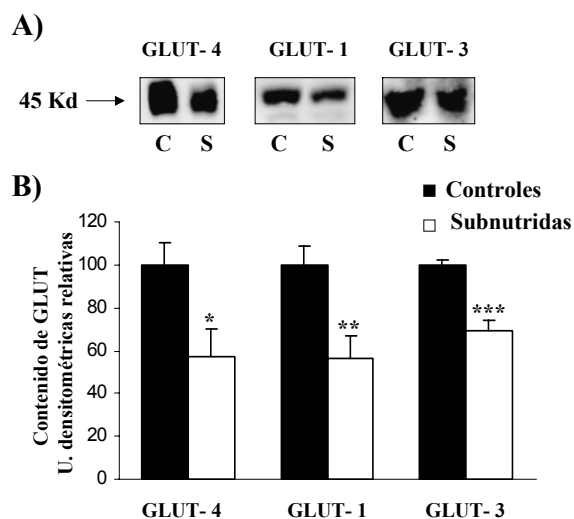


Figura 28: Contenido de GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3 en extracto crudo de membrana procedente de músculo cardíaco de ratas controles (C) y subnutridas (S). A) Las manchas que se muestran proceden de un experimento representativo. B) Las barras corresponden a las densidades ópticas normalizadas según el valor obtenido en las ratas controles. En los geles se cargaron 15, 20 y 90  $\mu\text{g}$  de proteína para GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3, respectivamente. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6 determinaciones. Las diferencias entre los valores de las ratas controles y las subnutridas se representan por: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### **2.5.- Contenido cardíaco del mRNA para GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3**

La restricción nutricional no alteró el contenido total de RNA en el músculo cardíaco; los valores determinados fueron de  $873 \pm 103$  y  $992 \pm 113$   $\mu\text{g/g}$  para las ratas controles y subnutridas, respectivamente. Los resultados obtenidos en el análisis de los mRNA específicos para el GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3 se presentan en la Fig. 29. Como se observa en ella, la restricción nutricional redujo de un modo considerable los niveles de mensajero correspondientes a ambos transportadores, hasta un 30-40% del valor control. En cambio, el mRNA del GLUT-3 no se alteró. Los datos fueron normalizados con el RNA de la subunidad ribosomal 18S.

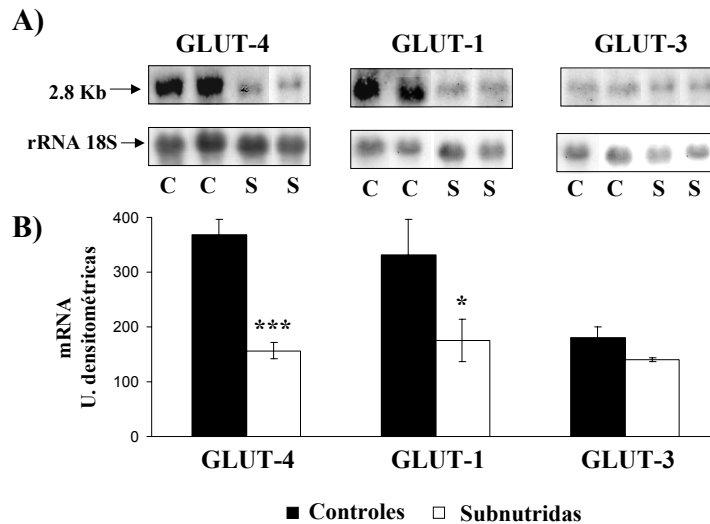


Figura 29: A) Northern Blot representativo de los mRNA de GLUT-4, GLUT-1 y GLUT-3 y también del rRNA correspondiente a la subunidad ribosomal 18S de ratas controles (C) y subnutridas (S). Se cargaron 20  $\mu$ g de RNA total en cada uno. B) Análisis densitométrico de los resultados del Northern Blot tras la corrección de la carga con el rRNA 18S. Los datos representados son la media  $\pm$  SEM de 5-6 determinaciones independientes y las diferencias entre ratas controles y subnutridas se representan por: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

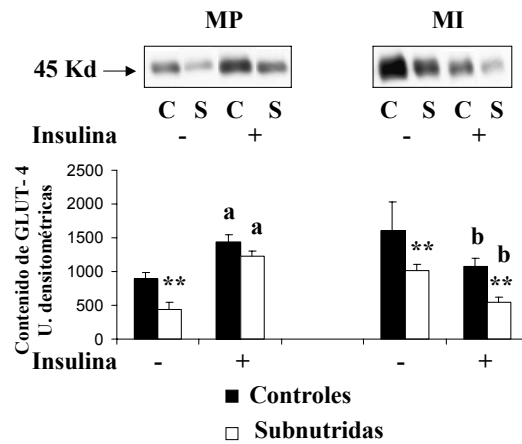
## **2.6.- Efectos de la insulina sobre la translocación del GLUT-4 y GLUT-1:**

Tanto en las ratas subnutridas como en las controles, la insulina administrada mediante el “clamp” provocó la translocación del GLUT-4: bajo el efecto hormonal, el contenido de este transportador se incrementó en la membrana plasmática y disminuyó en la fracción correspondiente a las membranas intracelulares. Las cantidades de GLUT-4 movilizadas fueron similares en los dos tipos de animales; por eso, en las ratas subnutridas, la proporción de GLUT-4 continuó siendo inferior a la de sus controles en ambas preparaciones membranosas en la condición estimulada, lo mismo que ocurrió en el estado basal (Fig. 30A).

La insulina también indujo una redistribución del GLUT-1 entre las dos fracciones de membrana obtenidas del corazón: provocó un incremento en la plasmática y el efecto contrario en las intracelulares. En el estado basal, el contenido de GLUT-1 en la membrana plasmática estuvo

incrementado en las ratas subnutridas, y disminuido en el interior celular, con respecto a las controles. Tras el estímulo hormonal, el GLUT-1 continuó presentando una concentración marcadamente mayor en la membrana superficial de las ratas subnutridas, pero, de nuevo, una concentración intracelular mucho más baja (Fig. 30B).

### A) GLUT-4



### B) GLUT-1

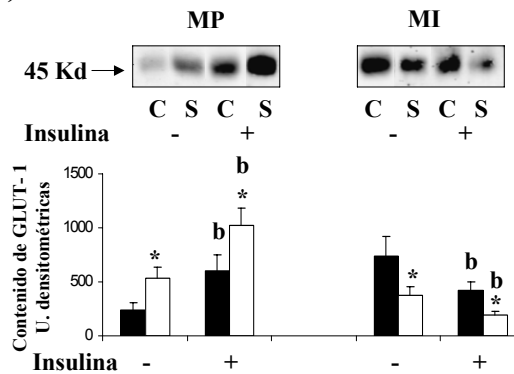


Figura 30: Contenido de GLUT-4 (A) y GLUT-1 (B) en membrana plasmática (MP) y membranas intracelulares (MI) procedentes del músculo cardíaco de ratas controles (C) y subnutridas (S), en condiciones basales (-) o tras la estimulación con insulina (+). Se analizaron 5 y 15  $\mu$ g de proteína para GLUT-4 y GLUT-1 respectivamente. Las manchas que se muestran proceden de un experimento representativo y las barras corresponden a las medias de los resultados obtenidos en 6 experimentos diferentes. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias de valores entre ratas controles vs. subnutridas se representan por: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  y las diferencias entre basales vs. estimuladas con insulina dentro de un mismo grupo: <sup>a</sup> $P < 0.001$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

### **2.7.-Análisis de la vía de señales insulínica:**

En la Fig. 31 se presentan los resultados del análisis del receptor de insulina y de varios componentes de la vía de señales de esta hormona, en el corazón de las ratas subnutridas y sus controles. En las primeras se observó una disminución del 30% de la subunidad  $\beta$  del receptor. En cambio, la subnutrición no afectó al contenido cardíaco de IRS-1. Se analizaron diferenciadamente las dos subunidades de la PI 3-kinasa, observándose que la subnutrición indujo un incremento muy marcado (8 veces) de la subunidad reguladora, p85; éste resultó del aumento producido en sus isoformas p85 $\alpha$  y p85 $\beta$ , similar en ambas. En cambio, la subunidad catalítica p110 $\alpha$  no se alteró por la restricción nutricional. Esa condición restrictiva condujo a un incremento del contenido cardíaco de Akt. La forma activa de ésta, fosforilada en la Ser 473, no fue detectable en el estado basal en ninguno de los dos tipos de ratas; sólo pudo analizarse 90 segundos después de la administración de una dosis de 5 UI de insulina por la vena porta (como se describe en la sección 11) y, en esa condición, el nivel de fosfo-Akt resultó ser muy superior en las ratas subnutridas.

### **2.8.- Actividad de la fosfatidilinositol 3 kinasa:**

La actividad basal de la PI3 Kinasa en el miocardio de las ratas subnutridas fue aproximadamente 3 veces más alta que la que presentaron sus controles alimentadas *ad libitum* (Fig. 32). A los 90 segundos de la administración intravenosa de insulina (efectuada como se ha indicado en el apartado 11 de Material y Métodos), esta enzima experimentó un marcado incremento en los dos grupos de ratas. El pico de actividad obtenido en esa condición estimulada fue muy superior en las ratas subnutridas que en sus controles (Fig. 32).



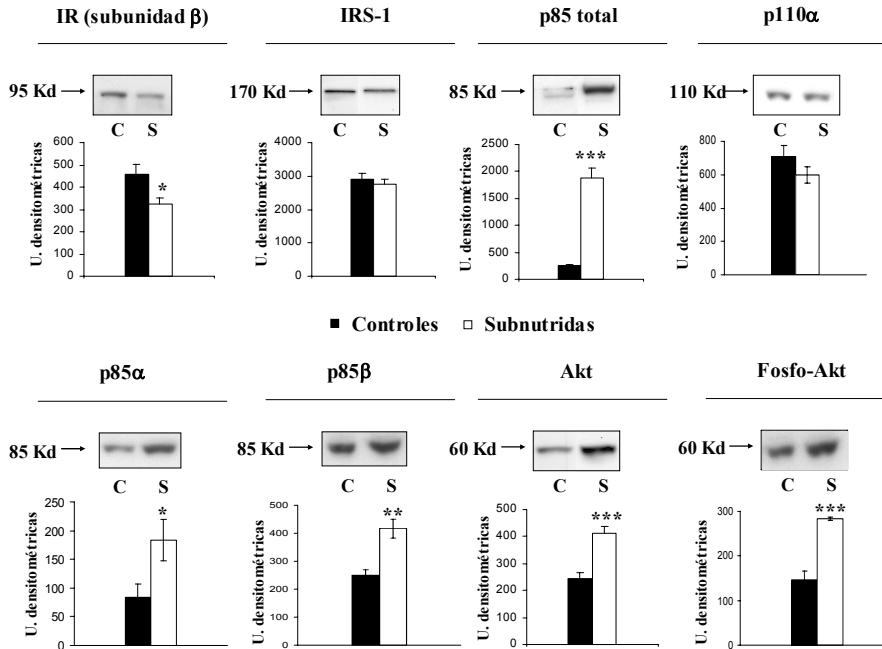


Figura 31: Efecto de la subnutrición en el contenido cardíaco de varias moléculas de la vía de señales insulínica. El receptor de insulina ha sido analizado en extractos crudos de membranas (70  $\mu$ g de proteína). En el resto de determinaciones, las muestras han sido preparadas e inmunoprecipitadas tal y como se ha descrito en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa y son las medias  $\pm$  SEM de 6 experimentos diferentes. Las diferencias entre ratas controles (C) y subnutridas (S) se indican como: \*P <0.05; \*\*P<0.01 y \*\*\*P < 0.001.

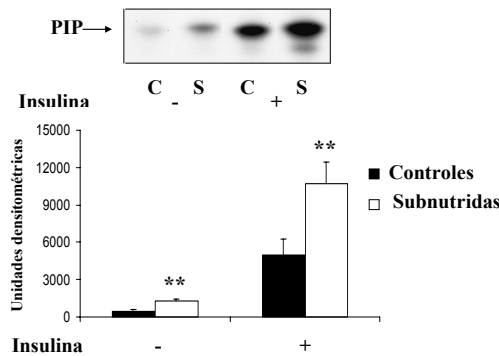


Figura 32: Actividad PI 3-quinasa en el músculo cardíaco de ratas controles (C) y subnutridas (S) en condiciones basales (-) y tras la estimulación con insulina (+). Se inmunoprecipitó previamente con anti-fosfotirosina. Las manchas corresponden a la migración del fosfatidilinositol 3-fosfato en un experimento representativo. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de 6 experimentos. Las diferencias significativas entre los valores controles vs. subnutridas: \*\*P<0.01.

### 3.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA LACTANTE

#### 3.1.- Efecto de la subnutrición sobre la tolerancia a la glucosa:

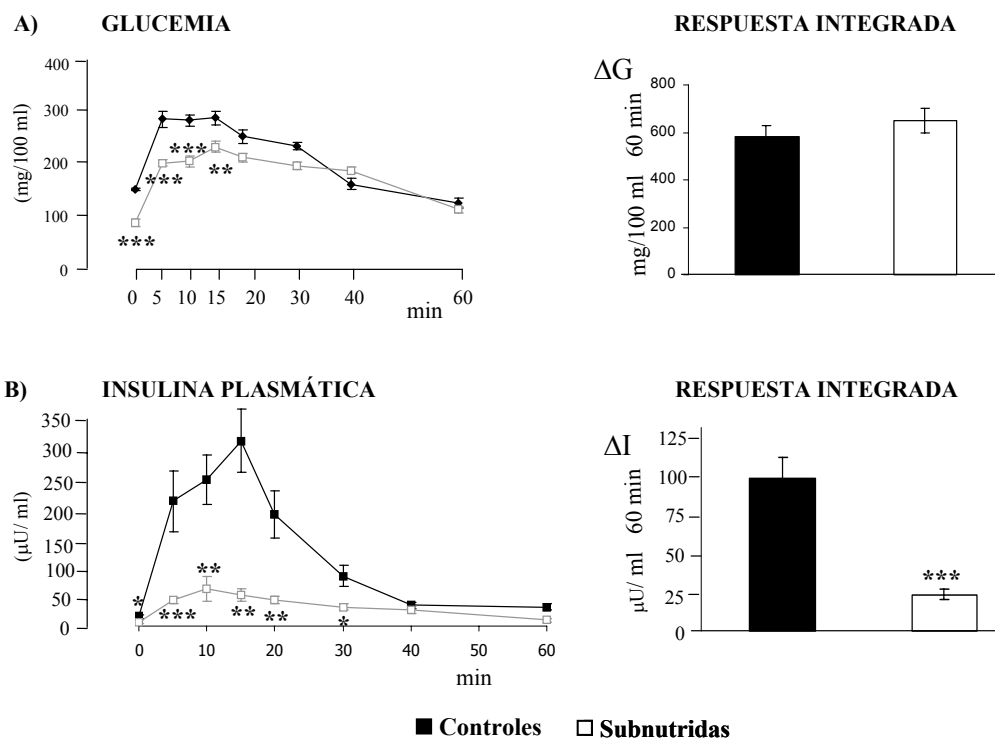


Fig. 33: Glucemia, insulinemia y respuestas integradas correspondientes al test de tolerancia a la glucosa en ratas lactantes. Cada dato representa la media  $\pm$  SEM de 6-7 determinaciones. Las diferencias entre controles y subnutridas se expresan como: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

A los 10 días de vida, el peso corporal de las ratas subnutridas ( $11.7 \pm 2.8$  g) fue significativamente más bajo que el de sus controles ( $24.7 \pm 3.1$  g) (ver Fig. 15). Dichas ratas presentaron una hipoglucemia basal relativa:  $111 \pm 13$  mg/100 ml, frente a  $160 \pm 5$  mg/100 ml para las controles ( $P < 0.001$ ). Los perfiles de las curvas de glucemia en el test de tolerancia fueron similares en los dos grupos de animales; por ello, ambos mantuvieron la misma respuesta integrada de glucosa (Fig. 33A).

La insulinemia basal de las ratas restringidas estuvo significativamente por debajo del valor control:  $5.7 \pm 2.4$   $\mu$ U/ml frente a  $13.2 \pm 2.4$   $\mu$ U/ml ( $P < 0.05$ ). La insulino secreción inducida por la administración de glucosa permaneció muy deprimida en los animales subnutridos a lo largo de la prueba, como se observa en la curva correspondiente a las insulinemias; en consecuencia, la respuesta hormonal integrada calculada para las ratas subnutridas fue cuatro veces más baja que el valor control (Fig. 33B).

### **3.2.- Efecto de la subnutrición sobre los transportadores musculares de glucosa**

El estudio efectuado en ratas adultas se basó en el gastrocnemius como tejido representativo del músculo esquelético; en el caso de las lactantes se han utilizado, mezclados, los músculos de las patas traseras, para disponer de una cantidad suficiente de material y minimizar el número de animales sacrificados. A partir de esa mezcla se prepararon tanto lisados completos (ver la sección 9 de Material y Métodos), como fracciones enriquecidas en membrana superficial o intracelular (ver la siguiente sección).

El principal transportador de glucosa en el músculo esquelético es el GLUT-4. En una primera valoración, esta proteína fue analizada en los lisados tisulares, comprobándose que la subnutrición no alteró su contenido global. También se determinó en ellos el GLUT-1, un transportador cuya proporción en el músculo esquelético es menor que la de GLUT-4; la subnutrición tampoco alteró la cantidad presente de esta proteína (Fig. 34).

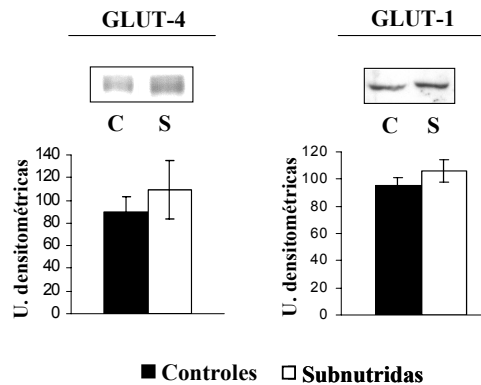


Figura 34: Contenido de GLUT-4 y GLUT-1 en lisado total de músculo esquelético de ratas controles (C) y subnutridas (S). Cada dato representa la media  $\pm$  SEM de 6-7 determinaciones.

### **3.3.- Fraccionamiento del músculo esquelético**

El procedimiento desarrollado para fraccionar el músculo de las ratas lactantes (descrito en la sección 6 de Material y Métodos), permitió obtener preparaciones de membrana con un enriquecimiento específico en la plasmática o en las intracelulares. En la tabla 8 se presentan los datos referentes al contenido proteico y actividad de la 5'- Nucleotidasa (enzima marcadora de la membrana plasmática) en las fracciones recogidas a partir de las interfases de la sacarosa al 25% y 40%.

No hubo diferencias significativas en la cantidad de proteínas que se obtuvieron en cada fracción, ni con respecto al tipo de ratas ni con relación al tratamiento insulínico (que se indica en la sección siguiente). La 5'- Nucleotidasa, presentó una actividad mucho mayor en la fracción 25 que en la 40, en los dos tipos de ratas; este dato permitió considerar a la fracción 25 como una preparación específicamente rica en membrana plasmática; en concordancia, se dedujo que la fracción 40 sólo estaba contaminada minoritariamente por este tipo de estructura y que se correspondía, por lo tanto, con las membranas situadas en el interior celular. El tratamiento con insulina no influyó sobre la actividad de esta enzima; sin embargo, es de destacar que la subnutrición provocó un incremento de la misma (Tabla 8).

Fracción	25%		40%	
	-	+	-	+
<b>Insulina</b>				
<b>Proteínas</b>				
<b>Controles</b>	95 ± 11	93 ± 2	130 ± 19	100 ± 14
<b>Subnutridas</b>	84 ± 12	81 ± 16	92 ± 20	98 ± 19
<b>5'-Nucleotidasa</b>				
<b>Controles</b>	16.4 ± 1.1	16.7 ± 0.4	2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.3
<b>Subnutridas</b>	23.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	19.1 ± 1.8 <sup>a</sup>	8.0 ± 2.2 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.7 <sup>b</sup>

Tabla 8: Proteínas y actividad de 5'-Nucleotidasa en las fracciones de músculo esquelético de ratas lactantes, obtenidas mediante gradientes de sacarosa.

Las proteínas están expresadas como µg/g de tejido.

La actividad de 5'-Nucleotidasa está expresada como nmol de fosfato liberados/min/mg de proteína.

Los datos constituyen la media ± SEM de 5 determinaciones independientes. Las diferencias significativas están indicadas como: <sup>a</sup>P<0.05 y <sup>b</sup>P<0.01.

### **3.4.- Efecto de la subnutrición sobre la translocación del GLUT-4**

Para evaluar el efecto de la insulina sobre la localización celular del GLUT-4, las ratas lactantes se inyectaron por vía intraperitoneal con 4 UI/100 g de hormona; a los 20 minutos fueron sacrificadas y se extrajeron los músculos de las patas posteriores. Los resultados obtenidos tras analizar el GLUT-4 en las fracciones de sacarosa del 25% y 40% se presentan en la Fig. 35.

Al comparar las ratas subnutridas con sus controles en el estado basal no se observaron diferencias en el contenido de GLUT-4 situado en la membrana plasmática (fracción 25, MP), ni tampoco en las intracelulares (fracción 40, MI). Es decir: en esa condición, el transportador presentó la misma distribución subcelular cuantitativa en los dos grupos. Hay que destacar que la cantidad de GLUT-4 fue mucho más alta en el reservorio intracelular que en la membrana superficial. La administración de insulina produjo un incremento significativo de la proporción de transportador situado en la membrana plasmática, así como una reducción en las membranas intracelulares. Sin embargo, después del tratamiento hormonal,

las cantidades de GLUT-4 presentes en los dos compartimentos ya fueron significativamente diferentes entre ambos grupos de ratas: en la membrana plasmática de las subnutridas la proporción fue mayor que en la procedente de ratas controles; en las membranas intracelulares, por el contrario, esa proporción fue inferior (Fig. 35).

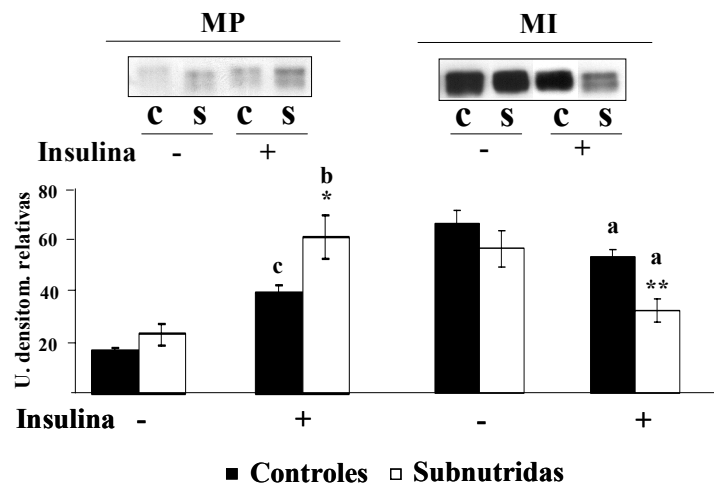


Fig. 35: GLUT-4 presente en las fracciones correspondientes a la membranas plasmática (MP) e intracelulares (MI) del músculo de ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S), tratadas (+) y no tratadas (-) con insulina. Se muestra la autorradiografía obtenida en un experimento representativo, así como la media  $\pm$  SEM de 5 determinaciones. La significación estadística de las diferencias se expresa como: <sup>a</sup>P<0.05; <sup>b</sup>P<0.01; <sup>c</sup>P<0.001 al comparar las basales con las tratadas con insulina dentro del mismo tipo de ratas; \*P<0.05 y \*\*P<0.01 al comparar las ratas controles y subnutridas bajo el tratamiento insulínico.

### 3.5.- Contenido y fosforilación del receptor de insulina

El contenido de receptores de insulina fue mucho mayor en el músculo esquelético de las ratas sometidas a restricción nutricional, aproximadamente 8 veces por encima del valor analizado en sus controles. Además, tras estímulo insulínico la fosforilación del receptor en tirosina (casi indetectable en estado basal) fue 2 veces superior en las ratas subnutridas (Fig. 36).

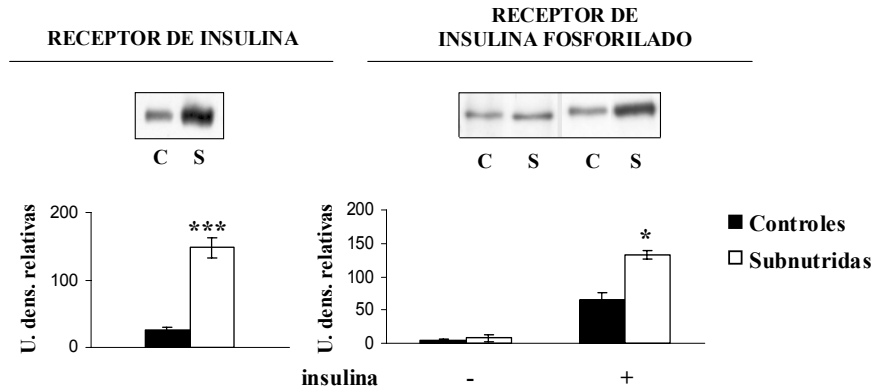


Figura 36: Contenido de receptores de insulina (subunidad  $\beta$ ) y su fosforilación en el músculo de ratas controles (C) y subnutridas (S) de 10 días de vida. El receptor se analizó previa inmunoprecipitación con anticuerpos contra su subunidad  $\beta$ . La fosforilación se analizó en esos inmunoprecipitados, reconociendo los complejos con anti-fosfotirosina y fue evaluada en estado basal (-) y a los 20 minutos de la inyección ip de 4 UI/100 g de insulina (+). Los manchas que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de 5-6 resultados independientes. Las diferencias entre ratas controles y subnutridas está expresada como: \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### **3.6.- Contenido y fosforilación del IRS-1:**

El contenido muscular total de IRS-1 no se alteró con la subnutrición. Sin embargo, tras estímulo insulínico la fosforilación de este sustrato por el receptor de insulina fue 2 veces superior en las ratas subnutridas (Fig. 37).

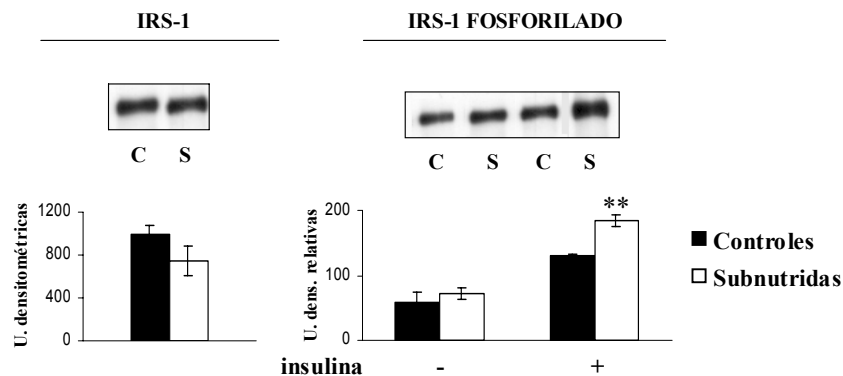


Figura 37: Contenido de IRS-1 y su fosforilación en tirosina en el músculo de ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S). La fosforilación se evaluó inmunoprecipitando los lisados con anti-IRS-1 y reconociendo con anti-fosfotirosina los complejos formados. Las condiciones del estímulo insulínico se indican en la Fig. 36. Las manchas que se muestran proceden de autorradiografías representativas y las barras indican la media  $\pm$  SEM de 5-6 resultados independientes. El grado de significación de las diferencias se expresa como: \*\* $P < 0.01$ .

### **3.7.- Contenido muscular de IRS-2**

Como se muestra en la Fig. 38, la subnutrición no modificó el contenido muscular de IRS-2.

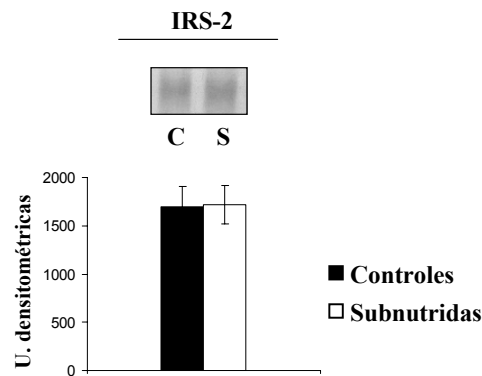


Figura 38: Contenido de IRS-2 en el músculo de ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S). Las manchas que se muestran proceden de una autorradiografía representativa y las barras indican la media  $\pm$  SEM de 6 determinaciones.

### **3.8.- Contenido muscular de la PI 3-kinasa y su asociación a IRS-1 e IRS-2**

Se analizó el contenido muscular total de la subunidad reguladora p85 de la PI 3-kinasa, así como su asociación a IRS-1 e IRS-2 tanto en estado basal como tras el tratamiento insulínico.

Dicho contenido estuvo significativamente incrementado por la subnutrición. Aunque no se encontraron diferencias en su asociación al IRS-1 en estado basal, a los 20 minutos de administrar insulina (en las condiciones señaladas en la Fig. 36) se observó una asociación dos veces superior en las ratas subnutridas, con respecto a sus controles. Sin embargo, ni en estado basal ni tras este intervalo de tiempo, encontramos cambios en la cantidad de IRS-2 asociado a la subunidad p85, en ninguno de los dos tipos de ratas (Fig. 39).



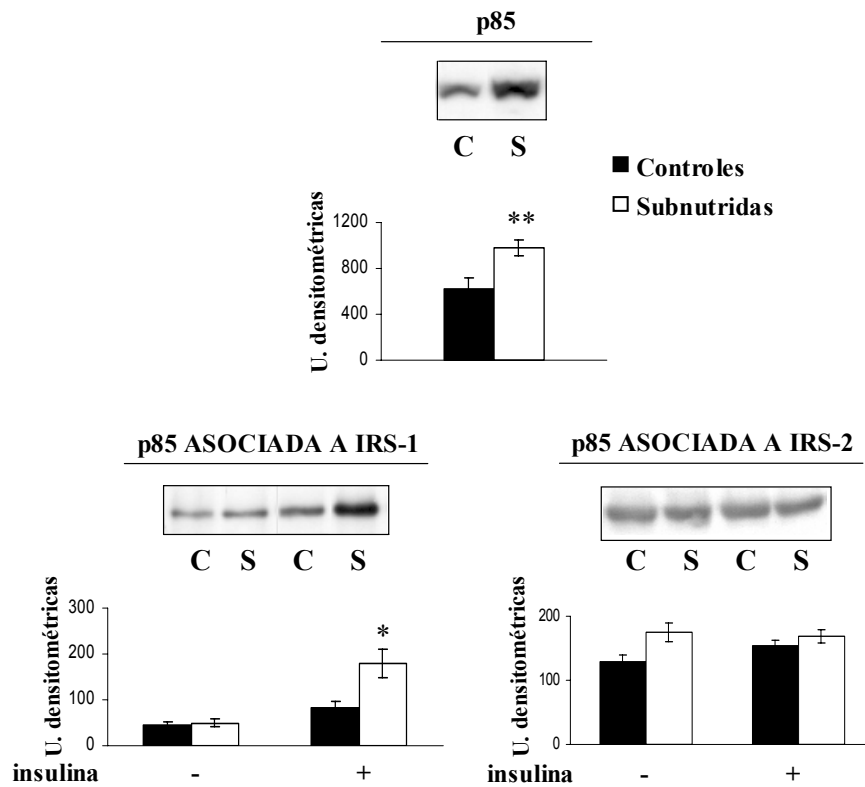


Fig. 39: Contenido de la subunidad p85 de la PI 3-kinasa y asociación al IRS-1 e IRS-2 en músculo de ratas lactantes subnutridas (S) y controles (C). Las asociaciones se analizaron en inmunoprecipitados obtenidos con anti-IRS-1 y anti-IRS-2, reconocidos posteriormente con anti-p85. El estímulo hormonal se efectuó como se indica en la Fig. 36. Aquí se muestran las manchas de resultados representativos, así como las medias  $\pm$  SEM de 6 determinaciones. El grado de significación de las diferencias se expresa como: \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$ .

El análisis específico de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la subunidad p85 puso de manifiesto que la subnutrición indujo un fuerte incremento del contenido muscular de ambas y lo mismo ocurrió con respecto a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la subunidad catalítica p110 (Fig. 40).

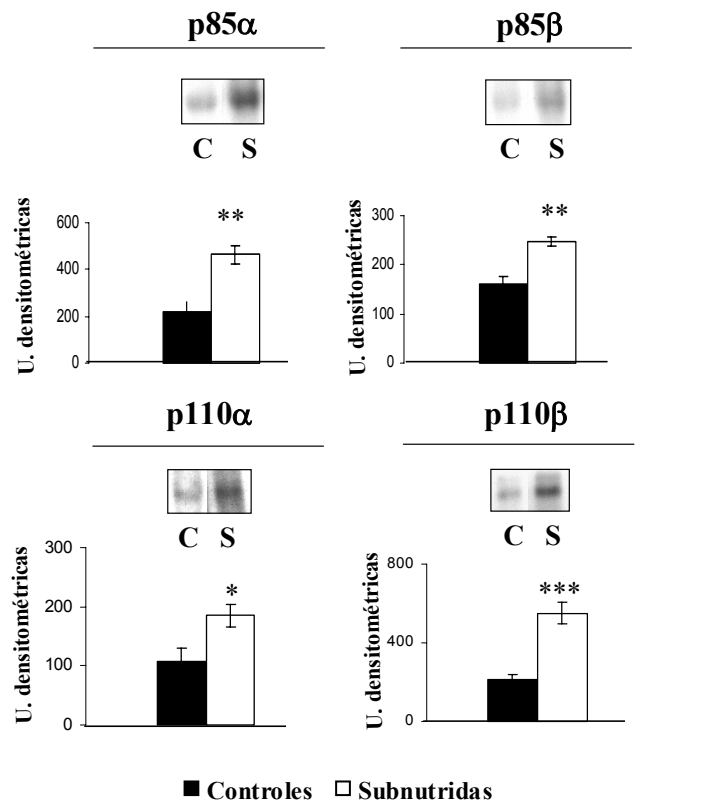


Figura 40: Análisis de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de las subunidades reguladora p85 y catalítica p110 de la enzima PI 3-quinasa en ratas controles (C) y subnutridas (S). Se muestran autorradiografías representativas. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 6 experimentos diferentes. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias entre ratas controles y subnutridas son: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.9.- Contenido muscular de las quinasas PKB (Akt) y PKC $\zeta/\lambda$

El análisis del contenido muscular de Akt mostró un incremento significativo de esta quinasa en las ratas sometidas a subnutrición, de 1.5 veces sobre el valor control. No se encontraron diferencias entre los dos grupos de ratas en cuanto a la PKC $\zeta/\lambda$  (Fig. 41).

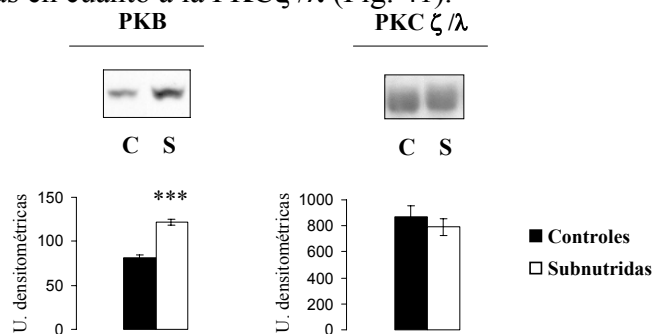


Figura 41: Análisis de las proteínas kinasas PKB y PKC  $\zeta/\lambda$  de ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 determinaciones y constituyen las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas se expresan como: \*\*\* $P < 0.001$ .

### **3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la actividad de la PI 3-kinasa:**

En las ratas lactantes esta actividad se determinó en el estado basal y a los 5, 10 y 20 minutos de una inyección ip de insulina (4 UI/100g). Los lisados musculares se inmunoprecipitaron con anti-IRS-1 antes de evaluar su actividad. Como se ve en la Fig. 42, en estado basal no había diferencias entre ambas poblaciones de animales. Sin embargo, a los 5 minutos del tratamiento la estimulación que se produjo en las ratas subnutridas fue aproximadamente el doble que la de sus controles y no aumentó posteriormente. La respuesta fue mas lenta en las ratas controles, en las cuales el mayor incremento se observó a los 20 minutos. En ese momento, la actividad todavía permaneció significativamente más alta en las ratas subnutridas.

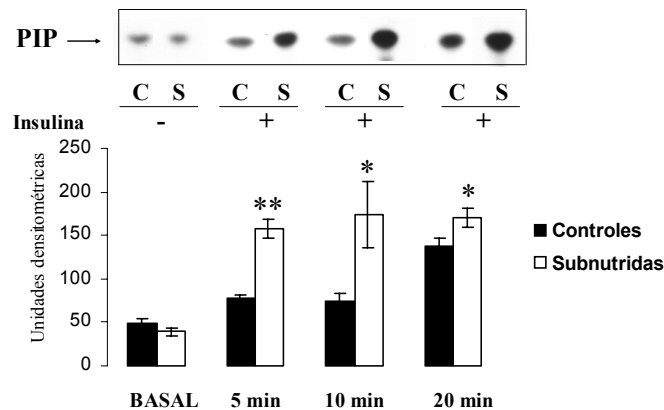


Figura 42: Actividad PI 3-kinasa en el músculo de ratas controles (C) y subnutridas (S) en condiciones basales (-) y tras la estimulación con insulina (+). Las manchas corresponden a la migración del fosfatidilinositol 3-fosfato en un experimento representativo. Las barras indican las medias  $\pm$  SEM de 6 determinaciones. Las diferencias significativas entre los valores controles vs. subnutridas son: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

### **3.11.- Contenido muscular de fosfo-GSK3 $\alpha$ y $\beta$ ; efecto de la subnutrición:**

Se analizó el contenido muscular de las isoformas fosforiladas  $\alpha$  y  $\beta$  de la GSK3, que contienen el resto fosfato en las Ser 21 y 9, respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 43. Como se ve, en el músculo de la rata lactante se encuentran las dos especies, siendo proporcionalmente mayoritaria la isoforma  $\beta$ . Los contenidos de una y otra fueron significativamente mayores en los animales subnutridos que en sus controles, tanto en la situación basal como a los 20 minutos de la administración intraperitoneal de 4 UI/100g de insulina.

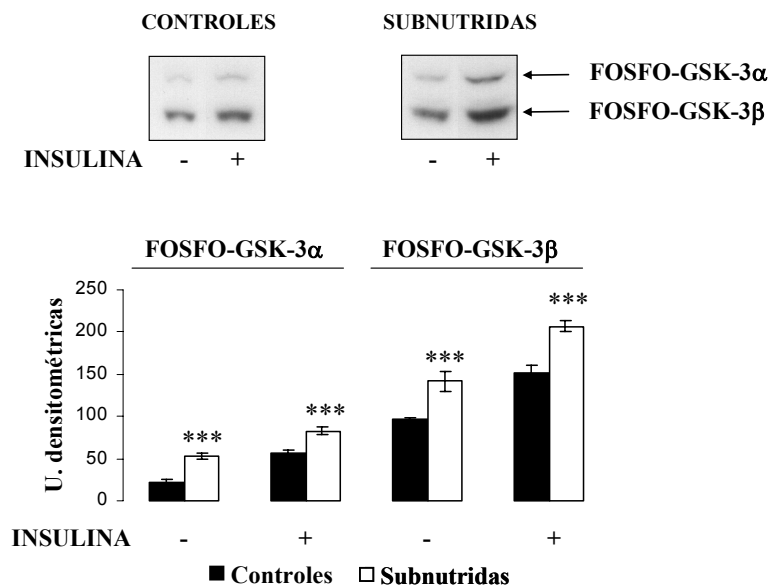


Figura 43: Análisis de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la fosfo-GSK3 de ratas controles (C) y subnutridas (S), en condición basal (-) y tras estímulo insulínico (+). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos diferentes y representan las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias entre ratas controles vs subnutridas son: \*\*\* $P < 0.001$ .

### **3.12.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de p70S6K:**

Antes de analizar esta kinasa, directamente implicada en la síntesis proteica, se valoró el contenido de proteínas en el músculo de las dos poblaciones de ratas. Dicho contenido fue significativamente más bajo en las subnutridas,  $175 \pm 4$  mg/g, que en las controles,  $212 \pm 11$  mg/g, ( $P < 0.001$ ). No se encontraron diferencias entre ambos tipos de ratas con respecto a la cantidad de p70S6K presente en el citado tejido. También se analizó su fosforilación (que se produce en la Tre 421 y la Ser 424); ésta, como era de esperar, fue relativamente baja en el estado basal y se incrementó al estimular con insulina (el tratamiento está indicado en la sección anterior); tampoco se vieron diferencias entre las ratas subnutridas y las controles en esa situación (Fig. 44).

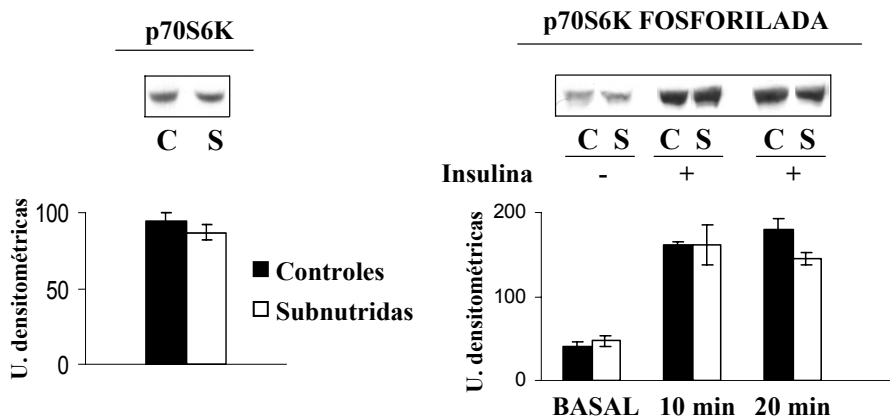


Figura 44: Análisis del contenido total de p70S6K y de su fosforilación en estado basal (-) y tras 10 y 20 minutos de estímulo insulínico (+) en ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos diferentes y se presentan como las medias  $\pm$  SEM.

### 3.13.- Contenido muscular de p38MAPK y efecto de la subnutrición:

Esta proteína, perteneciente a la familia de las MAPKinasas, experimentó un incremento significativo como consecuencia de la restricción nutricional: en el músculo de las ratas subnutridas su contenido fue casi dos veces superior al característico de las controles (Fig. 45). Paralelamente, se analizó la forma activada de esta proteína, que se encuentra fosforilada en los restos de Tre 180 y 182, comprobándose que su proporción también era mayor en las ratas subnutridas que en sus controles, tanto en el estado basal como 20 minutos después del estímulo hormonal (efectuado como se indica en la sección 3.10) (Fig.45).

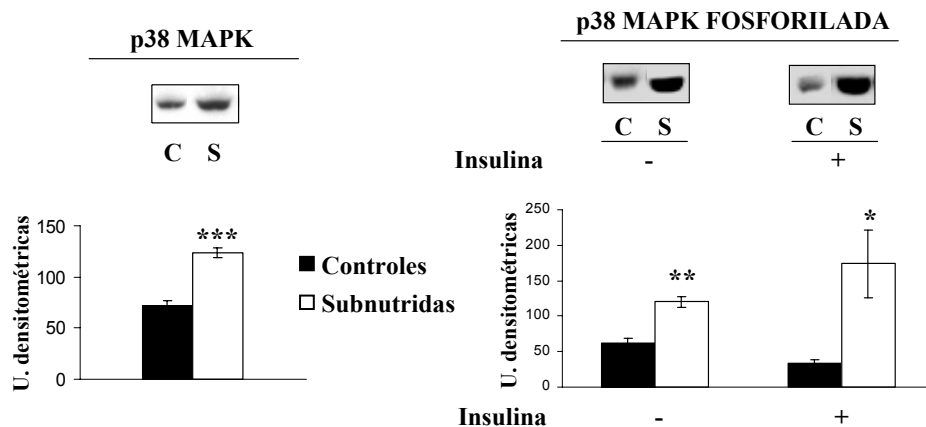


Figura 45: Análisis del contenido total de p38MAPK y de su fosforilación en estado basal (-) y a los 20 minutos de estímulo insulínico (+), en ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos diferentes. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias entre ratas controles y subnutridas están indicadas como: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

**3.14.- Cantidad total de PTP1B en el músculo de las ratas lactantes; asociaciones al receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2:**

La cantidad total de la fosfatasa PTP1B presente en el músculo de las ratas lactantes no experimentó cambios como consecuencia de la subnutrición (Fig. 46A). Sin embargo, la proporción asociada al receptor de insulina se modificó significativamente. Como se ve en la Fig. 46B, dicha proporción fue 3 veces más alta en las ratas subnutridas que en las controles en el estado insulinémico basal. El estímulo hormonal produjo un aumento de la asociación en los dos tipos de ratas, observado ya a los 5 minutos de la inyección. Para las controles, el aumento en ese punto constituyó la máxima asociación inducida ya que a continuación ésta permaneció sin cambios, a lo largo del periodo de 20 minutos estudiado. Sin embargo, en las ratas subnutridas la unión al receptor siguió incrementándose después de los 5 minutos y alcanzó un máximo a los 10 minutos. En todo momento, la proporción de PTP1B asociada al receptor de insulina fue significativamente mayor en las ratas subnutridas que en las controles.

Las cantidades de PTP1B asociadas al IRS-1 o al IRS-2 en el estado basal fueron las mismas en las dos poblaciones de ratas; a los 20 minutos del estímulo insulínico no se observaron cambios en la proporción de fosfatasa unida a estas proteínas, en ninguno de los dos grupos de animales (Fig. 46C y 46D).

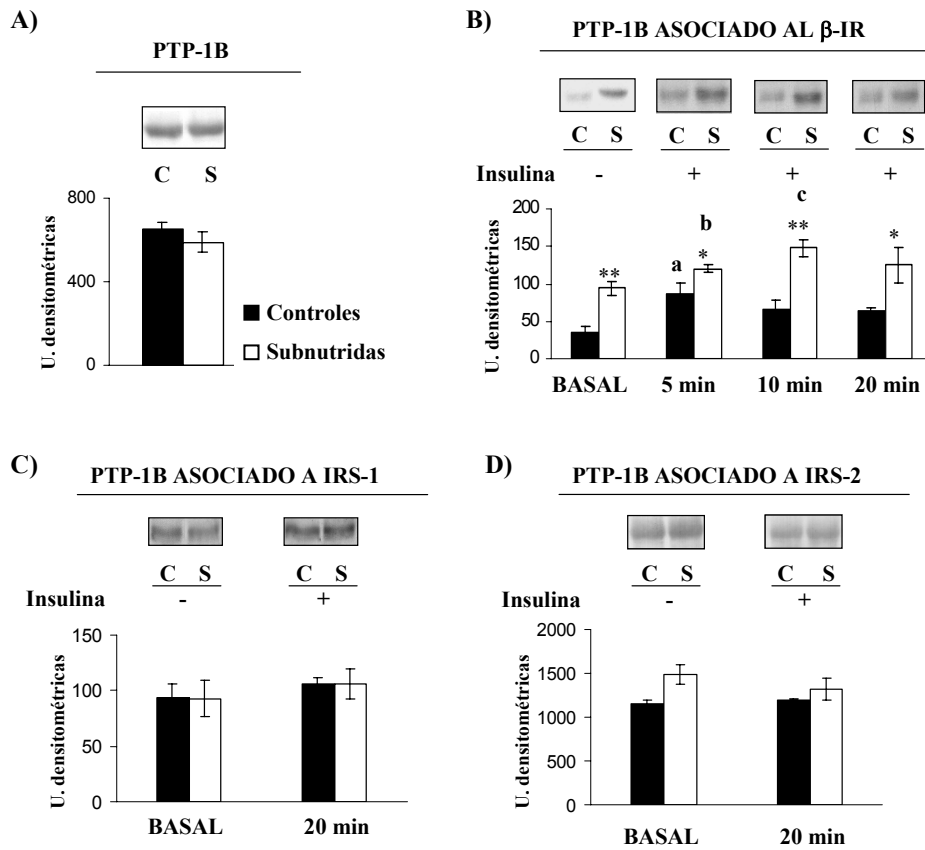


Figura 46 : A) Contenido de PTP1B en el músculo de ratas lactantes. B) PTP1B asociada al receptor de insulina. El análisis se efectuó en muestras de lisado tisular inmunoprecipitadas con anti-PTP1B, reconociendo posteriormente el complejo con anticuerpos contra el receptor de insulina (subunidad  $\beta$ ). El tratamiento hormonal es el mismo que se ha indicado en la Fig. 36. La significación estadística de las diferencias se representa como: \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  al comparar las ratas controles y subnutridas en una misma condición; <sup>a</sup> $P < 0.01$  entre las controles en estado basal y a los 5 minutos de la inyección de insulina, <sup>b</sup> $P < 0.05$  entre las subnutridas basales y a los 5 minutos del tratamiento; <sup>c</sup> $P < 0.01$ , al comparar entre los 5 y 10 minutos posteriores a la inyección en las ratas subnutridas. C) y D) PTP1B asociada al IRS-1 o al IRS-2. La determinación se efectuó en muestras de lisado tisular tratadas con anti-IRS-1, o anti-IRS-2, reconociendo posteriormente los complejos con anticuerpos contra PTP1B. En las figuras se presentan los resultados obtenidos para las ratas controles (C) y subnutridas (S); se muestran las autorradiografías obtenidas en un experimento típico, así como las medias  $\pm$  SEM de 5-6 análisis independientes.





#### **4.- ESTUDIO EN EL HÍGADO DE RATA LACTANTE**

##### **4.1- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de GLUT-2 y GLUT-1:**

La subnutrición indujo un incremento significativo del contenido de estos dos transportadores de glucosa en el hígado de las ratas lactantes, especialmente notable en el caso del GLUT-2, cuya proporción fue dos veces más alta en las ratas subnutridas que en sus controles (Fig. 47).

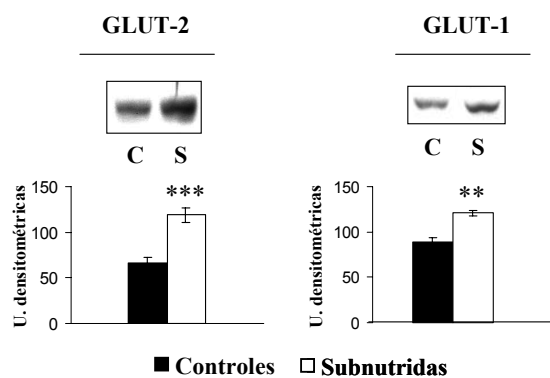


Fig. 47: GLUT-2 y GLUT-1 en hígado de ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S). Ambos transportadores se analizaron en lisados hepáticos. Se muestra una autorradiografía típica y la media  $\pm$  SEM resultante de 6 determinaciones. La significación de las diferencias se expresa como: \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

##### **4.2.- Efecto de la subnutrición sobre el receptor hepático de insulina:**

Como se ve en la Fig. 48, la subnutrición no alteró la proporción de receptores de insulina presentes en el hígado.

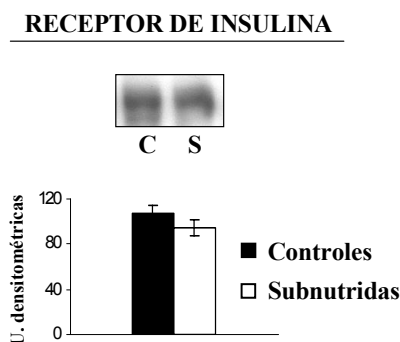


Figura 48: Contenido de receptores de insulina (subunidad  $\beta$ ) en lisado hepático de ratas controladas (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 determinaciones y representan las medias  $\pm$  SEM.

#### **4.3.- Contenido hepático de IRS-1 e IRS-2. Asociación del IRS-2 al receptor de insulina.**

La subnutrición no modificó el contenido hepático de IRS-1; sin embargo, indujo un incremento muy significativo del IRS-2. En concordancia con este resultado, la cantidad de IRS-2 asociada al receptor de insulina fue muy superior en las ratas subnutridas que en sus controles; esta asociación fue analizada bajo estímulo insulínico, 20 minutos después de la administración de la hormona (4 UI/100g, vía intraperitoneal) (Fig. 49).

#### **4.4.- Contenido hepático de la subunidad p85 de la PI 3-kinasa:**

Como se ve en la Fig. 50, la subnutrición condujo a un incremento de los niveles hepáticos de la subunidad p85 de la PI 3-kinasa.

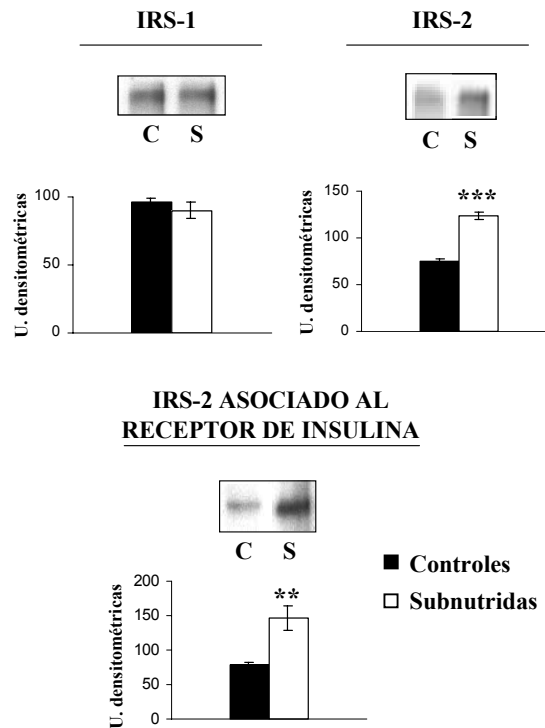


Figura 49: Contenido de IRS-1 e IRS-2 y asociación entre el IRS-2 y el receptor de insulina tras estímulo insulínico. La asociación se determinó en lisados inmunoprecipitados con anticuerpos contra la subunidad  $\beta$  del receptor, tratados posteriormente con anti-IRS-2. Ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 determinaciones e indican las medias  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas entre ratas controles y subnutridas se indican como: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

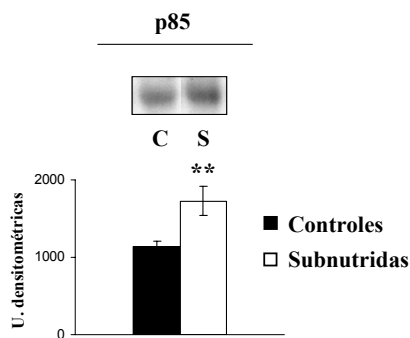


Figura 50: Contenido de p85 en el hígado de las ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S). Autorradiografía obtenida en un análisis representativo y media  $\pm$  SEM de 6 determinaciones. La diferencia entre controles y subnutridas se indica como: \*\* $P < 0.01$ .

#### **4.5.-Contenido hepático de PKB:**

La subnutrición ocasionó un incremento en el contenido total de esta kinasa, presente en el hígado de las ratas lactantes, como se muestra en la Fig. 51.

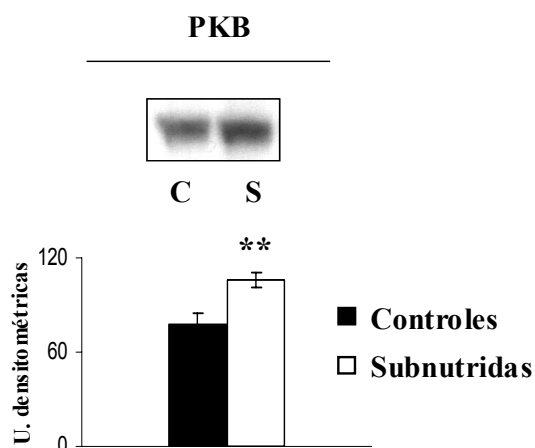


Figura 51: Análisis del contenido total de PKB en el hígado de ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos. Los resultados son las medias  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ , representa el grado de significación estadística de la diferencia.

#### **4.6.- Efecto de la subnutrición sobre la fosfo-GSK3 hepática:**

En el hígado de la rata lactante, la isoforma  $\alpha$  de la GSK-3 es prácticamente indetectable (resultado que no mostramos); la que se encuentra mayoritariamente es la especie GSK-3 $\beta$ . En el estado basal, la proporción de esta isoforma fosforilada en la Ser 9 fue similar en los dos tipos de ratas, controles y subnutridas. Con el tratamiento insulínico (ver sección 4.3), esa proporción se incrementó en ambos casos, pero la respuesta fue más intensa en las ratas subnutridas (Fig. 49).

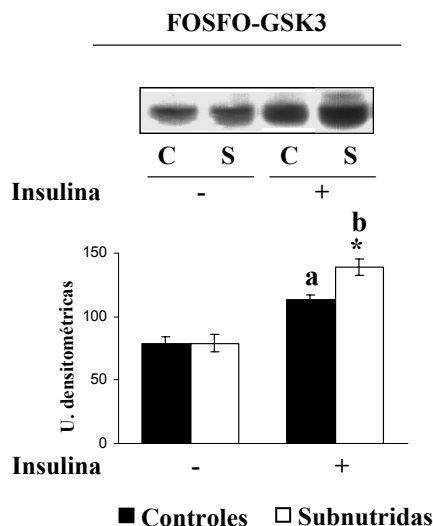


Figura 52: Contenido de fosfo-GSK3 $\beta$  en el hígado de ratas lactantes, controles (C) y subnutridas (S). El tratamiento insulínico (+) se indica en la sección 4.3. Autorradiografía representativa y media  $\pm$  SEM de 6 determinaciones. La significación estadística de las diferencias está expresada como: \* $P < 0.05$  entre C y S bajo el estímulo insulínico; <sup>a</sup> $P < 0.01$  y <sup>b</sup> $P < 0.001$  comparyo basales y estimuladas dentro del mismo tipo de ratas.

#### **4.7.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de p70S6K:**

Como se ha indicado previamente (sección 6.4 de la Introducción), esta kinasa participa en la regulación de la biosíntesis proteica. Con la restricción de alimentos se produjo un descenso ligero, pero significativo, del contenido de proteínas en el hígado:  $380 \pm 5$  mg/g (controles) y  $361 \pm 5$  mg/g (subnutridas). Sin embargo, esa condición nutricional restrictiva causó un incremento notable del contenido de p70S6K en dicho órgano. La insulina indujo la fosforilación de esta proteína, en Tre 421 y Ser 424. En el estado basal, la proporción de fosfo-p70S6K fue superior en las ratas subnutridas que en sus controles; el tratamiento hormonal indujo un incremento de la fosfo-p70S6K, que resultó ser solamente significativo en

estas últimas, de modo que en esa condición estimulada ya no se observaron diferencias entre los dos grupos de ratas (Fig. 53).

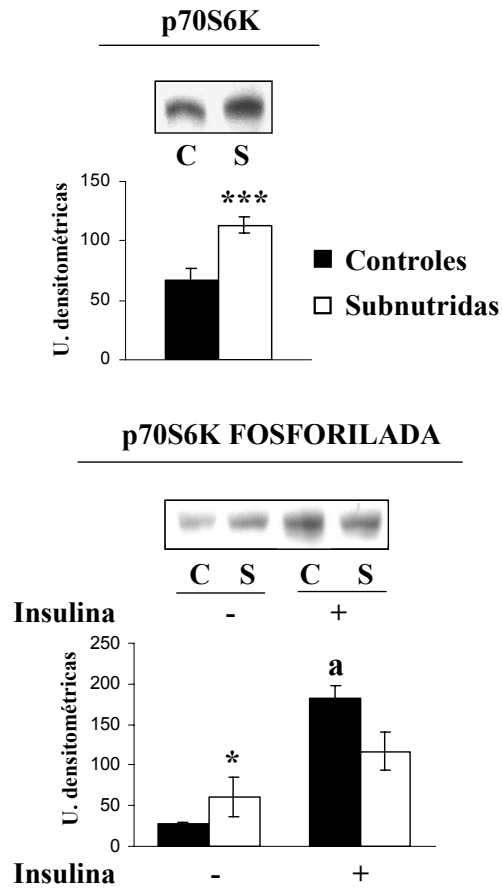


Figura 53: Análisis del contenido hepático de p70S6K y de su forma fosforilada en estado basal (-) y a los 20 minutos de estímulo insulínico (+) (4 UI/100 g, vía intraperitoneal) en ratas controles (C) y subnutridas (S). Se muestran autorradiografías representativas y los resultados de 5-6 determinaciones, expresados como las medias  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , entre controles y subnutridas en estado basal; <sup>a</sup> $P < 0.001$ , entre las ratas controles en condición basal y estimulada.

#### **4.8.- Análisis de las fosfatasas PTP1B y PTEN hepáticas:**

El contenido total de PTP1B no fue modificado por la subnutrición. Sin embargo, ésta sí que repercutió sobre la fosfatasa PTEN, que se incrementó significativamente, más de 2 veces por encima del valor control (Fig. 54).

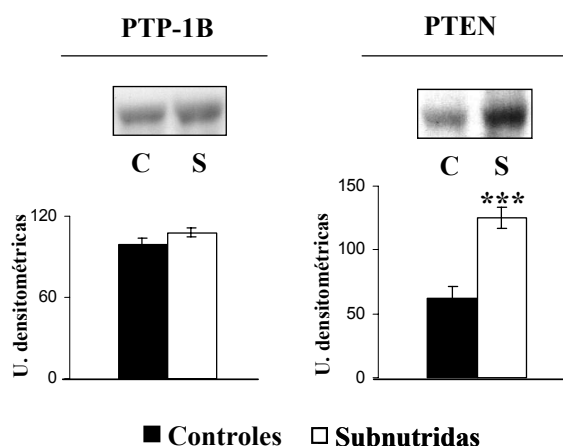


Figura 54: Análisis del contenido hepático de PTP1B y PTEN en ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos y son las medias  $\pm$  SEM. La diferencia entre ratas controles y subnutridas se indica como: \*\*\* $P < 0.001$ .

#### **4.9.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de SOCS-1 y SOCS-3:**

El contenido total de SOCS-1 experimentó un ligero aunque significativo incremento en las ratas subnutridas; sin embargo, la subnutrición no repercutió sobre el contenido de SOCS-3.



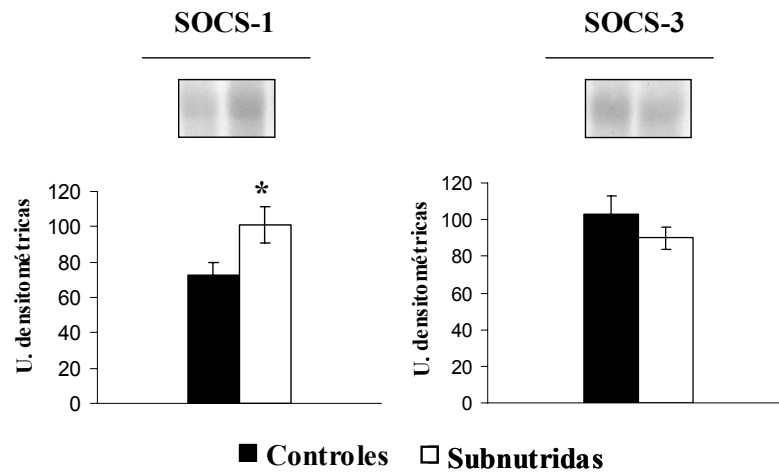


Figura 55: Análisis del contenido hepático de SOCS-1 y SOCS-3 en ratas controles (C) y subnutridas (S). Los resultados que se muestran proceden de una autorradiografía representativa. Las barras corresponden a la cuantificación densitométrica de 5-6 experimentos y son las medias  $\pm$  SEM. La diferencia entre ratas controles y subnutridas se indica como: \*P < 0.05.

**V**

---

**DISCUSIÓN**



## **1.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA ADULTA**

*El objetivo de la mayoría de los estudios sobre la relación entre el estado nutricional y la homeostasis glucídica es comprender el modo por el que un exceso de ingesta, que suele causar obesidad, repercute negativamente sobre el organismo y origina patologías, entre las que destacan la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2; la elevada prevalencia de esta enfermedad en las sociedades avanzadas justifica el interés de esos estudios. No obstante, en el mundo existe una fracción importante de seres humanos cuya disponibilidad de alimentos es muy limitada, bien en etapas concretas de su vida o bien con carácter crónico; esa condición deficitaria también está ligada al desarrollo de graves patologías. Como se ha indicado en la Introducción de esta Tesis, cuyo la falta de nutrientes se produce en etapas de desarrollo aparecen con frecuencia alteraciones en la homeostasis glucídica. Sin embargo, también se sabe que la restricción nutricional puede tener efectos positivos; por ejemplo, favorece el control de la glucemia en los pacientes diabéticos de tipo 2; de hecho, la pérdida de peso constituye una de las estrategias aplicadas en el tratamiento de estos enfermos.*

*En línea con lo anterior, hay que destacar que la restricción calórica impuesta durante periodos de tiempo limitados incrementa la acción de la insulina en varias especies de animales, como ratas, ratones y monos Rhesus. Se han estudiado menos las repercusiones de esa restricción sobre la homeostasis glucídica cuyo el déficit nutricional se establece con carácter crónico, desde etapas precoces del desarrollo; sin embargo, esa circunstancia es la más común en el ser humano subnutrido. De ahí el interés que presenta investigar esas repercusiones aplicando modelos de experimentación.*

*En el modelo experimental que ha sido objeto de este trabajo, en la rata Wistar, la restricción es de tipo global (proteico-calórica), ya está presente en el último tercio de la gestación (la etapa de mayor crecimiento fetal) y se prolonga hasta la edad adulta. Este modelo no implica manipulaciones quirúrgicas y guarda una semejanza notable con la situación nutricional deficitaria que padecen muchos seres humanos; como ocurre en éstos, en las ratas restringidas se produce un fuerte retraso en el crecimiento desde las etapas de inmadurez.*

### **1.1.-Efecto de la subnutrición crónica sobre la tolerancia a la glucosa en ratas adultas**

Previamente se había demostrado que las ratas subnutridas adultas experimentan una fuerte reducción en la insulino-secreción basal, así como en la capacidad de respuesta pancreática frente a una carga de glucosa (Escrivá et al., 1992). Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran esas consecuencias negativas de la subnutrición sobre la función de las células  $\beta$  (descritas repetidamente en diferentes modelos) que conducen al cuadro de hipoinsulinemia observado en estos animales (Escrivá et al., 1992; Martín et al., 1997; revisión en Holness et al., 2000). En la parte de esta Discusión referida a las ratas lactantes se comentará más ampliamente este efecto de la subnutrición sobre las células  $\beta$  (sección 3).

En un trabajo previo también se había comprobado que en el test de tolerancia a la glucosa el perfil de la curva de glucemias de las ratas adultas subnutridas era indistinguible del correspondiente a las alimentadas *ad libitum*, a pesar de los bajos niveles de insulina plasmática suscitados por la carga de glucosa (Escrivá et al., 1992); en base a esos niveles cabría esperar, más bien, una situación de intolerancia a la glucosa. Esta paradoja sugirió que los efectos de la insulina sobre la captación de este sustrato podrían estar incrementados en las ratas subnutridas, lo que explicaría que no se mantuvieran unas glucemias superiores a las controles a lo largo de la prueba.

### **1.2.- Efecto de la subnutrición sobre la captación tisular de glucosa:**

La hipótesis anterior se confirmó mediante el análisis de la captación tisular de 2-desoxiglucosa bajo un estímulo insulínico, aplicado mediante la técnica del clamp; ese estudio puso de manifiesto que el efecto estimulante de la hormona es más intenso en las ratas subnutridas que en las controles, tanto en el tejido adiposo blanco (de diferentes localizaciones anatómicas) como en los músculos esqueléticos (Escrivá et al., 1992).

Aunque el incremento mayor se produce en el tejido adiposo, la importancia secundaria de este tejido en el metabolismo total de la glucosa, (DeFronzo et al., 1981) y la fuerte reducción que experimenta como consecuencia de la subnutrición (Escrivá et al., 1992), sugerían que el cambio experimentado por el músculo sería el principal responsable del mantenimiento de la normotolerancia a la glucosa en las ratas subnutridas.

En consecuencia, parecía lógico estudiar en profundidad las repercusiones de la subnutrición sobre la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético; como modelo fue escogido el gastrocnemius.

Confirmando lo que se había observado previamente en otros músculos (Escrivá et al., 1992), en este trabajo se demuestra que la subnutrición, aunque disminuye la captación basal de glucosa por el gastrocnemius, aumenta su capacidad para responder a la insulina en ese sentido; esa adaptación debe producirse en la totalidad o, al menos, en la mayoría del tejido muscular ya que, en la condición hiperinsulinémica, la captación global de glucosa referida al organismo entero de las ratas subnutridas está muy por encima del valor control. Varios autores, en determinaciones *in vitro*, ya habían observado una sensibilización similar en diferentes músculos aislados de ratas y ratones sometidos a restricciones calóricas, aunque de duración limitada (Cartee y Dean, 1994; Dean et al., 1998; Gazdag et al., 2000; Davidson et al., 2002). Por lo tanto, cabe deducir que la hipersensibilidad a la insulina constituye una adaptación general frente a una deficiencia en el aporte de sustratos nutricionales.

### **1.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de GLUT-4 y GLUT-1:**

No es fácil comprender el sentido fisiológico de la disminución del contenido de GLUT-4 en el músculo en una situación en la cual su sensibilidad a la insulina, con relación a la captación de glucosa, se encuentra fuertemente incrementada. Quizá, con esa disminución se evite que la captación resulte ser excesivamente alta en el estado postabsortivo, ya que esto podría ocasionar hipoglucemia. Después de la ingesta, el incremento de la insulina plasmática probablemente será muy bajo en las ratas subnutridas, debido a la depresión funcional de sus células  $\beta$  así como a la menor cantidad de alimento recibido; en esa circunstancia, la hipersensibilidad permitirá, quizá, un aprovechamiento mejor de la glucosa por parte de la fibra muscular.

### **1.4.- Translocación del GLUT-4:**

Uno de los efectos bien conocidos de la insulina sobre el GLUT-4 en los tejidos muscular y adiposo es promover su translocación, desde un reservorio situado en compartimentos membranosos intracelulares hasta la membrana plasmática (Zorzano et al., 2000). La composición de la dieta puede influir sobre este proceso; así, una alimentación rica en grasa lo inhibe en el músculo esquelético (Singh et al., 2003; Tremblay et al., 2003). En este trabajo se ha estudiado la influencia de la subnutrición sobre esa respuesta hormonal en el músculo. Para ello se ha requerido fraccionar previamente este tejido. La técnica utilizada se basa en la distribución de las membranas de la fibra muscular en distintas interfases de gradientes continuos de sacarosa; ello permitió obtener preparaciones enriquecidas selectivamente en las membranas plasmática e intracelulares. Para definir la identidad de estas preparaciones se aplicaron varios criterios, como se ha indicado en la sección 1.3 de los Resultados.

Con el empleo de ese fraccionamiento, en este trabajo se pone de manifiesto que la subnutrición provoca un aumento de la capacidad

insulínica para inducir la translocación del GLUT-4. Se sabe que este mismo tipo de cambio es el que mediatiza la hipersensibilidad a la insulina que se produce en el músculo entrenado en el ejercicio físico (Etgen, Jr. et al., 1997; Hansen et al., 1998). Un aumento similar de la translocación también se ha observado en modelos de restricción calórica temporal; en ese caso, la proporción de transportador situado en la membrana plasmática supera al valor control, lo que puede explicar el aumento paralelo que se produce en la captación de glucosa (Dean et al., 1998). En cambio, en nuestro modelo de restricción crónica, la cantidad de GLUT-4 presente en la membrana plasmática muscular de las ratas subnutridas está por debajo de dicho valor, tanto en estado basal como tras el estímulo insulínico. A pesar de ello, en esta última condición el músculo de esas ratas capta mucha más glucosa que el músculo procedente de las alimentadas *ad libitum*; por lo tanto, hay que deducir que la hipersensibilidad que se produce en la respuesta hormonal de translocación del GLUT-4 no es suficiente para explicar esa diferencia en la captación.

Hemos observado que, en las dos poblaciones de ratas, el GLUT-1 está situado mayoritariamente en la membrana plasmática y que, además, no experimenta translocación; se trata de un hecho bien conocido, para el tejido adiposo y el músculo esquelético. Por lo tanto, el incremento en la captación de glucosa consecuente al estímulo insulínico tampoco parece deberse al GLUT-1.

### **1.5.- Contenido muscular de otras isoformas de GLUTs:**

La subnutrición ocasionó fuertes incrementos del contenido de GLUT-3 y GLUT-5 en el gastrocnemius; no obstante, la proporción de ambos fue muy inferior a la del GLUT-4 (e incluso a la del minoritario GLUT-1). El GLUT-3 se encuentra, sobre todo, en las células nerviosas; su contribución a la captación muscular de glucosa debe ser irrelevante desde el punto de vista cuantitativo, a pesar del aumento causado por la subnutrición. Un hecho destacable en cuanto al GLUT-5, es que hasta ahora no se había detectado su presencia en el músculo; ello confiere una relevancia particular a nuestro resultado. Se trata de un transportador de



fructosa, con poca capacidad respecto a la glucosa (Gould y Holman, 1993). El incremento que hemos encontrado en las ratas subnutridas quizá permita un mejor aprovechamiento de la fructosa por parte de la fibra muscular, un sustrato suplido a estas ratas en cantidad insuficiente; pero ese incremento tampoco debe contribuir, de manera significativa, a la sensibilización en el estímulo sobre la captación específica de la glucosa.

No se conocen los efectos de la subnutrición sobre otras isoformas de transportadores (GLUT 10, GLUT-11 y GLUT-12), cuya presencia en el músculo han puesto de manifiesto recientemente varios autores (Dawson et al., 2001; Doege et al., 2001; Rogers et al., 2002; Wood et al., 2003).

#### **1.6.-Posible papel de la actividad intrínseca del GLUT-4:**

En consecuencia, ninguno de los cambios observados en este trabajo con respecto a los transportadores de glucosa en el músculo parecen explicar *per se* el incremento de la respuesta insulínica sobre la captación de glucosa en las ratas subnutridas; ello sugiere que deben estar actuando otros factores en ese sentido.

Podrían considerarse algunos que son independientes del propio tejido muscular. Por ejemplo, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos, sustratos que influyen sobre la sensibilidad a la insulina; sin embargo, en un estudio previo no se encontraron alteraciones de su concentración en el plasma de las ratas subnutridas (Escrivá et al., 1992). Podrían ocurrir cambios en el volumen de flujo sanguíneo (y en la consecuente disponibilidad de glucosa extracelular), así como alteraciones en el nivel plasmático de las hormonas contrarregulatorias, todo ello causado por la subnutrición. Sin embargo, según se ha indicado anteriormente, el incremento en la sensibilidad muscular también se ha demostrado en otros modelos de restricción en los cuales los músculos se han analizado *in vitro* (Cartee y Dean, 1994; Dean et al., 1998; Gazdag et al., 2000; Davidson et al., 2002); ello induce a pensar que el cambio fundamental provocado por la subnutrición debe suceder en el propio músculo.

En ese sentido, una posibilidad se refiere a la propia actividad intrínseca del GLUT-4; es decir, a la cantidad de glucosa que este transportador introduce en la fibra muscular cuando ya se ha translocado a la membrana plasmática. Una serie de trabajos recientes demuestran que la insulina, además de estimular la translocación del GLUT-4, aumenta su actividad intrínseca y que ese efecto está mediatizado por la vía de las p38 MAP kinasas (Somwar et al., 2001). Esto nos lleva a proponer la hipótesis de que la subnutrición también podría incrementar la actividad intrínseca de ese transportador en respuesta a la insulina. En realidad, no tenemos datos experimentales en las ratas subnutridas adultas que apoyen esa idea; sin embargo, en ratas subnutridas lactantes hemos comprobado que el contenido muscular de p38MAPK está significativamente aumentado, un resultado que favorece indirectamente esa posibilidad. Ese resultado se discutirá detalladamente en la parte correspondiente a esas ratas lactantes (sección 3.5).

### **1.7.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica de señales :**

Las modificaciones de la sensibilidad a la insulina características de algunas situaciones fisiopatológicas pueden estar relacionadas con cambios en las moléculas de la vía de señales de la hormona. De ahí el interés de estudiar los efectos de la subnutrición sobre esta vía.

La cantidad de receptores musculares de insulina está incrementada en las ratas subnutridas, un dato que concuerda con su mejor respuesta hormonal. En esa línea se ha visto, recientemente, que la mejoría en la sensibilidad a la insulina que experimentan las mujeres tras el parto también está ligada a un aumento de los receptores en el músculo (Kirwan et al., 2004); y que en ratas sometidas a una restricción calórica de duración limitada la fosforilación del receptor, al estimular con insulina, está intensificada (Dean y Cartee, 2000).

En ese tipo de restricción, de carácter moderado, se produce una disminución del IRS-1, a pesar de que aumenta la respuesta de captación muscular de glucosa (Dean et al., 1998; Gazdag et al., 1999); en cambio,

con la deficiencia crónica aplicada en este trabajo, no aparecen cambios en el contenido de IRS-1. Estos dos hechos parecen indicar que el aumento de sensibilidad derivado de la subnutrición es independiente de la cantidad de este sustrato del receptor insulínico.

Se ha señalado que el IRS-2 no es requerido para el efecto insulínico sobre la captación de glucosa en el tejido muscular (Higaki et al., 1999); por ello, esa proteína no ha sido objeto de estudio en el músculo en el presente trabajo.

Nuestros datos muestran que la actividad de la PI 3-kinasa es más baja cuando la hiperinsulinemia se mantiene durante una hora (clamp) que tras una inyección puntual de la hormona, en las dos poblaciones de ratas. Posiblemente, este resultado se debe a que la acción insulínica induce una fosforilación del IRS-1 en Serina y Treonina y ello, a su vez, favorece la degradación de este sustrato; la consecuencia sería una reducción de la actividad PI 3-kinásica. Algunas acciones hormonales parecen regularse a la baja de este modo, cuando el estímulo no es puntual sino prolongado (Haruta et al., 2000).

El aumento de sensibilidad a la insulina que se establece en las ratas subnutridas tampoco parece ligado a un mayor efecto hormonal sobre la actividad de la PI 3-kinasa ya que, por el contrario, dicha actividad se encuentra en estos animales por debajo de los valores controles. Aplicando restricciones calóricas más breves, otros autores tampoco han encontrado que la actividad de esta enzima se encuentre incrementada (Dean et al., 1998). Recientemente, en el gastrocnemius de ratas tratadas con leucina se ha visto una disminución de esa actividad, sin alteraciones en la captación de glucosa (O'Connor et al., 2004); también se ha comprobado, en humanos, que la infusión de lípidos aminora el efecto insulínico sobre el consumo muscular de glucosa sin que se afecte dicha actividad enzimática (Storgaard et al., 2004).

Este conjunto de resultados, así como los obtenidos en el presente trabajo, indican que, a pesar del papel determinante que la PI 3-kinasa juega en el estímulo insulínico sobre la captación de glucosa (Brady et al., 1999),

la intensidad de esa respuesta puede experimentar modificaciones sin que se produzcan cambios paralelos en el efecto hormonal sobre la enzima. Quizá, la explicación de esta aparente discordancia se encuentre en el hecho de que la PI 3-kinasa está compartimentada intracelularmente (Clark et al., 2000); por ello, es posible que distintas condiciones fisio-patológicas influyan sobre la misma de un modo diferenciado, dependiendo de su ubicación intracelular; ello sería difícil de observar cuando su actividad se analiza globalmente. Así ha sido en nuestro caso, y por ello desconocemos cómo afecta la subnutrición a la PI 3-kinasa situada específicamente en las vesículas que constituyen el reservorio intracelular del GLUT-4, que es la que parece estar selectivamente implicada en su translocación (Heller-Harrison et al., 1996).

No se han evaluado las señales de la vía insulínica que actúan posteriormente a las que se acaban de describir; tampoco otras moléculas que están implicadas en la translocación del GLUT-4, como las que operan en la vía de CAP (que es independiente de la PI 3-kinasa) o las que intervienen directamente en el mecanismo de translocación; en consecuencia, no puede descartarse la posibilidad de que la subnutrición ejerza efectos sobre ellas.

### **1.8.- Efecto de la subnutrición sobre la Fosfodiesterasa I muscular:**

Esta enzima se analizó como marcadora de la membrana plasmática, contribuyendo a la identificación de las preparaciones de gastrocnemius que estaban enriquecidas en esa membrana superficial. Inesperadamente, la subnutrición indujo un incremento de su actividad en el músculo, cuyas implicaciones fisiológicas desconocemos. Lo mismo se ha observado en el corazón de las ratas restringidas; en ese órgano dicha elevación podría contribuir al aumento de la captación de glucosa, como se discutirá más adelante. En cuanto al músculo esquelético se ha visto que algunas isoformas de esta enzima parecen implicadas en el efecto antilipolítico de la insulina (Enoksson et al., 1998), un tipo de acción hormonal poco estudiado en ese tejido y que no ha sido objeto de análisis en este trabajo.



## **2.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATA ADULTA**

*El sistema cardiovascular es uno de los más susceptibles de ser afectados por la subnutrición, sobre todo cuando ésta se establece en la etapa del desarrollo; se ha señalado que el paso a una dieta adecuada tras una deficiencia nutricional grave producida en esas etapas de crecimiento podría ser causa de patologías coronarias. Existen menos trabajos en los que se estudie el impacto de la subnutrición sobre el metabolismo cardíaco cuando ésta es permanente, a pesar de la frecuencia con que se presenta en el ser humano.*

*La gran cantidad de energía metabólica consumida por el corazón requiere un uso considerable de sustratos; los prioritarios son los ácidos grasos y, a continuación, la glucosa. En algunas situaciones fisiopatológicas, la participación de ésta en el metabolismo energético del miocardio se incrementa, y se convierte en el sustrato principal: así ocurre en las últimas fases de la gestación, durante el ejercicio físico y en cuadros de isquemia e hipoxia. Parece lógico, por lo tanto llevar a cabo un estudio de las repercusiones de la subnutrición crónica sobre el uso cardíaco de la glucosa. El objetivo concreto de este estudio ha sido averiguar el impacto de la subnutrición sobre la captación de este sustrato por el miocardio, en coherencia con el trabajo previamente realizado en el músculo esquelético.*

### **2.1.- Efecto de la subnutrición sobre el consumo de glucosa en el corazón:**

Se sabe que el consumo de glucosa por el músculo cardíaco es muy superior al que tiene lugar en el músculo esquelético (Kraegen et al., 1993). Ello está de acuerdo con los datos obtenidos en el presente trabajo: la tasa de utilización de glucosa fue de 2 a 10 veces más alta en el corazón que en el gastrocnemius, independientemente del nivel plasmático de insulina, tanto en las ratas subnutridas como en sus controles. Esta diferencia remarca el importante papel que desempeña la glucosa en el metabolismo energético del miocardio. Por otra parte, en la condición basal, la tasa de glucosa utilizada por el corazón de las ratas subnutridas fue casi tres veces mayor que la de sus controles, en concordancia con lo que ocurre en otras situaciones patológicas, en las que se ha demostrado que la glucosa adquiere una mayor relevancia en el metabolismo cardíaco (Zorzano et al., 1997; Young et al., 1999). Este uso más elevado de glucosa por parte de las ratas subnutridas se produjo a pesar de su hipoinsulinemia basal, lo que sugiere que la sensibilidad a la hormona se encuentra incrementada en el corazón de estos animales. Este resultado difiere del que se ha obtenido en el músculo esquelético, en el cual la deficiencia nutricional conduce a una reducción del consumo basal de glucosa. Para explicar esta diferencia hay que tener en cuenta que la evaluación se efectuó en las ratas bajo anestesia, una condición en la cual el corazón, a diferencia de la musculatura esquelética, está contrayéndose y por ello sigue requiriendo cantidades importantes de energía. La administración de insulina incrementó el consumo cardíaco de glucosa en los dos tipos de ratas pero, en proporción, el estímulo fue mayor en las controles; probablemente, eso se debe a que la tasa basal ya está muy elevada en las ratas restringidas. En cualquier caso, el consumo de glucosa permaneció más alto en estas últimas.

La elevada capacidad para consumir glucosa que se establece en el corazón de las ratas subnutridas podría ser una de las causas por las que la masa relativa de este órgano con respecto al peso corporal total resulta ser más alta que en las alimentadas *ad libitum*, como se ha observado en este trabajo. Este hecho parece indicar una cierta protección del corazón frente a los efectos negativos de la deficiencia nutricional sobre el crecimiento; así

ocurre también en las ratas subnutridas en otro órgano crucial, como es el cerebro (Dobbing, 1970; Escrivá et al., 1985).

### **2.2.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido de transportadores de glucosa en el corazón:**

El GLUT-4 y el GLUT-1, que son los principales transportadores de glucosa en el miocardio, fueron primeramente analizados en una preparación que contenía mezclados los diferentes tipos de membrana. Ese análisis demostró que el déficit nutricional crónico provoca una disminución del contenido de ambos. Se evaluó, además, su mRNA, que también se encontró reducido; esto sugiere que la modificación a la baja de esos transportadores se produce al nivel de su transcripción. En el caso del gastrocnemius el efecto de la subnutrición fue opuesto para cada transportador, como se ha descrito previamente. Ello confirma que su regulación se produce con una marcada especificidad tisular. También se han descrito cambios en la cantidad de GLUT-4 y GLUT-1 cardíacos en otras condiciones fisiopatológicas; ambos disminuyen frente al ayuno prolongado o la diabetes (revisado en Zorzano et al., 1997), así como en ratas que experimentan insuficiencia útero-placentaria (Tsirka et al., 2001); por el contrario, se ha visto que la expresión del GLUT-1 aumenta en cuadros de isquemia e hipoxia (Brosius et al., 1997).

El GLUT-3 es el transportador característico de los tejidos que poseen una elevada necesidad de energía metabólica; por eso parecía interesante determinarlo en este trabajo. Además, ya se había descrito que el GLUT-3 está presente en el miocardio humano (Grover-McKay et al., 1999). Su análisis, que se llevó a cabo en el mismo tipo de preparación membranosa completa que en el caso del GLUT-4 y GLUT-1, demostró que la proporción de GLUT-3 en el corazón es muy inferior a la de los otros dos. Por otra parte, la subnutrición redujo su contenido, sin alterar el correspondiente a su mRNA. Debido a su baja  $K_M$ , el GLUT-3 transporta la glucosa con una elevada eficacia. No obstante, dado que en el corazón sólo se encuentra de forma marginal, la influencia que pueda tener la



disminución de este transportador sobre los cambios que se han observado en el uso de la glucosa por parte de ese órgano debe ser escasa.

En cambio, aunque cabía prever que la fuerte reducción del contenido de GLUT-4 y GLUT-1 repercutiera negativamente sobre la capacidad del corazón para utilizar la glucosa, la captación de ésta se encontró incrementada en las ratas subnutridas, como se ha visto anteriormente. Para poder explicar esta aparente paradoja hay que considerar que, además de la cantidad total de transportadores, son muy importantes las proporciones de éstos que se encuentran presentes en los distintos compartimentos de membrana, ya que sólo los que estén situados sobre la plasmática serán verdaderamente funcionales.

### **2.3.- Distribución subcelular del GLUT-4 y GLUT-1 en el miocardio:**

Con el objeto de obtener por separado preparaciones de membrana plasmática e intracelulares, el músculo cardíaco fue fraccionado aplicando la misma técnica que en el caso del gastrocnemius. También se analizó la actividad de la Fosfodiesterasa-I como marcador de la membrana superficial; más adelante se discutirán los resultados obtenidos con respecto a esta enzima.

La determinación diferenciada de los contenidos de GLUT-4 y GLUT-1 en las fracciones membranosas demostró que ambos son más abundantes en el interior de la fibra cardíaca que en la membrana superficial, en las dos poblaciones de ratas. Se trata de un hecho bien establecido para el GLUT-4, cuya distribución subcelular en dicha fibra es, por lo tanto, análoga a la que posee en el músculo esquelético (como ya se ha visto en la primera parte de este trabajo). En el caso del GLUT-1, sin embargo, los datos publicados sobre su ubicación eran contradictorios: a veces se había afirmado que la proporción de éste es mayoritaria en la membrana plasmática de cardiomiocitos (Doria-Medina et al., 1993), y otras veces se había encontrado casi exclusivamente en el interior de estas células aisladas (Fischer et al., 1997). Nuestros resultados, obtenidos *in vivo*, en el músculo cardíaco contrayéndose, ponen de manifiesto que sus fibras

contienen una reserva intracelular importante de GLUT-1. En el músculo esquelético la situación es distinta porque el GLUT-1 de ese tejido está dispuesto casi en su totalidad en la membrana plasmática, incluso en la condición insulinémica basal. Esa diferencia entre los dos tejidos es la que determina que el transportador pueda experimentar translocación en el corazón, pero no en el músculo esquelético, como se verá más adelante.

#### **2.4.- Translocación del GLUT-4 en el músculo cardíaco:**

El análisis del GLUT-4 efectuado en las membranas plasmática e intracelulares del miocardio en estado basal confirmó que este transportador experimenta una reducción importante de su contenido como consecuencia de la subnutrición, como se había puesto de manifiesto al determinarlo en las preparaciones membranosas completas. La insulina estimuló su translocación hacia la membrana plasmática, un resultado previsto. Ese efecto se produjo con la misma intensidad en las dos poblaciones de animales; por ello, en la condición estimulada, la proporción de transportador presente en los dos compartimentos membranosos continuó manteniéndose deficitaria en las ratas subnutridas, como ocurre en la situación basal. Ello sugiere que con relación a la respuesta de translocación del GLUT-4, la restricción nutricional no provoca un aumento de la sensibilidad del miocardio a la insulina, a diferencia de lo que ocurre en el músculo esquelético.

#### **2.5.- Translocación del GLUT-1 en el músculo cardíaco:**

En el estado basal, la proporción de GLUT-1 situado en la membrana plasmática de las ratas subnutridas fue superior a la que estaba presente en las controles. Al administrar insulina, el transportador experimentó una redistribución subcelular en ambos grupos de ratas. Esta respuesta hormonal del GLUT-1 cardíaco ya se había descrito en cardiomiocitos, en el corazón de rata perfundido (revisión en Zorzano et al., 1997) y en el de perro *in vivo* (Young et al., 1997). Lo más destacable es que el transportador se translocó en mayor proporción en las ratas

subnutridas que en sus controles; por eso, la concentración del mismo en la membrana plasmática de las ratas restringidas también fue más alta después del tratamiento insulínico, como ocurre en el estado basal. Ello indica que el corazón de estas ratas subnutridas es hipersensible con respecto a esta clase de respuesta hormonal.

### **2.6.- Papel del GLUT-1 en la captación de glucosa por el corazón:**

El resultado anterior sugiere que la causa más probable de la mayor capacidad de uso de la glucosa observada en el corazón de las ratas nutricionalmente restringidas consiste en una mayor presencia selectiva de GLUT-1 en la membrana plasmática; es decir, la adaptación a un mayor consumo cardíaco de glucosa tiene su base en este transportador. Otros autores ya habían descrito una correlación entre el contenido de GLUT-1 en el miocardio y su tasa de captación de glucosa (Laybutt et al., 1997).

La propuesta anterior está de acuerdo con el hecho de que el GLUT-1 parece jugar un papel más relevante en el miocardio que en la musculatura esquelética; su proporción en esta última es del 5-10 % del total de GLUTs, mientras que en el corazón llega a ser del 30% (Fischer et al., 1997). Además, se ha señalado que una fracción del GLUT-1 analizado en el músculo esquelético procede, en realidad, de sus fibras nerviosas (Hyberg et al., 1992; Doria-Medina et al., 1993). Finalmente, se ha visto que en ratones cuya expresión de GLUT-4 está abolida, tanto la captación basal de glucosa por el corazón como el GLUT-1 están incrementados en una proporción similar (Abel et al., 1999).

Nuestros datos no explican porqué la subnutrición aumenta la sensibilidad insulínica respecto a la translocación del GLUT-1 sin modificar la del GLUT-4. Sin embargo, se ha señalado que ambos transportadores podrían estar ubicados en reservorios intracelulares distintos, con una capacidad específica para responder a la hormona (Becker et al., 2001). En esa línea, puede sugerirse que la repercusión de distintas situaciones fisiopatológicas sobre ambos reservorios podría no ser la misma; en concreto, la subnutrición mejoraría, selectivamente, la translocación del GLUT-1, según nuestros resultados.

No puede descartarse la posibilidad de que en el incremento de la captación de glucosa intervengan, adicionalmente, otros factores; por ejemplo, posibles cambios en la actividad intrínseca de los GLUTs, como se comentó en el caso del gastrocnemius (apartado 1.6).

### **2.7.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica de señales:**

La subnutrición produjo un ligero descenso del número de receptores de insulina en el corazón, sin afectar al IRS-1. Pero el efecto más destacable sobre las moléculas de la vía de señales insulínica que se han examinado en el músculo cardíaco consistió en un incremento de la PI 3-kinasa, tanto en estado basal como tras el estímulo con la hormona; esa mayor actividad de la enzima, así como un aumento del contenido de Akt, determinaron que la fosforilación de esta última también fuera más intensa en las ratas restringidas. Son datos que se correlacionan bien con el incremento paralelo que experimentó la captación tisular de glucosa, ya que la PI 3-kinasa juega un papel clave al respecto (Till et al., 2000).

No se observaron cambios en la cantidad de subunidad catalítica de la enzima; sin embargo, las dos isoformas cardíacas principales de la subunidad reguladora, p85 $\alpha$  y p85 $\beta$ , aumentaron considerablemente con la subnutrición, un resultado que merece la siguiente consideración: en ratones que mantienen una expresión disminuida de una u otra de estas isoformas se ha visto que, paradójicamente, la sensibilidad a la insulina está aumentada. El mecanismo que se ha propuesto para explicar este hecho, inesperado, se basa en una posible competición por parte de las subunidades reguladoras libres con el heterodímero enzimático completo (p85-p110), en cuanto a su capacidad para unirse al IRS-1 fosforilado. Como el estímulo de la PI 3-kinasa deriva precisamente de esa unión, la competición indicada disminuiría dicho estímulo y modificaría a la baja los efectos insulínicos dependientes del mismo (Mauvais-Jarvis et al., 2002; Ueki et al., 2002). Este mecanismo explica porqué en ratones que tienen suprimidas esa isoformas (knock out) se produce un aumento de la sensibilidad hepática y muscular a la insulina: la supresión impediría la citada competición (Terauchi et al., 1999; Mauvais-Jarvis et al., 2002; Ueki et al., 2002).

Sin embargo, la posibilidad de que se produzca este tipo de inhibición no está de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo en el miocardio, ya que con los aumentos de p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  se incrementan simultáneamente la actividad PI 3-kinásica y la sensibilidad a la insulina. Esta aparente discordancia sugiere que en el músculo cardíaco la relación entre estos factores sea más compleja. Efectivamente, se han publicado datos indicativos de que, por una parte, la asociación de p85 $\beta$  con el IRS-1 no esté relacionada con el transporte de glucosa en el corazón, sino con otro tipo de respuestas insulínicas (no consideradas en este trabajo) (Kessler et al., 2001); por otra parte, se ha propuesto que para la translocación del GLUT-4 en cardiomiocitos o en el miocardio, la p85 $\alpha$  no establezca interacciones con el IRS1/2, sino con una proteína de 200 kDa fosforilada en tirosina, que todavía no se ha identificado (Till et al., 2000; Kessler et al., 2001).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en realidad no puede precisarse cuál es la trascendencia concreta de los incrementos observados en las subunidades reguladoras de la PI3K en el corazón de las ratas subnutridas, aunque está claro que un mayor contenido de esas subunidades en el miocardio no impide una hipersensibilidad de este tejido en cuanto a la captación de glucosa. Finalmente, hay que señalar, que no existen datos acerca de una posible repercusión de la deficiencia nutricional sobre la hipotética proteína blanco de 200 kDa que, interaccionando con la subunidad p85 $\beta$ , mediaría la activación de la PI3K cardíaca.

### **2.8.- Efecto de la subnutrición sobre la Fosfodiesterasa-I cardíaca:**

La deficiencia nutricional indujo un incremento de la actividad de esta enzima (la cual, en principio, era utilizada como marcadora de la membrana plasmática). Este aumento parece ser un efecto general de la subnutrición, al menos sobre el tejido muscular, ya que también se produjo en el gastrocnemius. Aunque no sabemos qué trascendencia puede tener la mayor actividad fosfodiesterásica en el contexto de los resultados de este trabajo, puede especularse con la siguiente posibilidad: la familia de las

fosfodiesterasas cataliza la hidrólisis de cAMP y cGMP, regulando así sus niveles intracelulares. Se ha visto que el cGMP es capaz de inhibir la utilización basal y estimulada de la glucosa, así como la translocación del GLUT-4, en cardiomiocitos (Bergemann et al., 2001). Esto sugiere que el incremento de la PD-I podría conducir a un descenso del cGMP en la fibra cardíaca de las ratas subnutridas y contribuir consecuentemente al aumento de la captación de glucosa que se ha observado en éstas.



### **3.- ESTUDIO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA LACTANTE**

*Durante la etapa perinatal de los mamíferos se van produciendo cambios importantes en relación con el tipo y cantidad de nutrientes disponibles y, coincidiendo con ello, tiene lugar un intenso desarrollo. Los aminoácidos juegan un papel clave para el crecimiento y la obtención de energía por parte del feto; después, durante la lactancia, éstos son destinados casi exclusivamente a la síntesis proteica y entonces la glucosa y los lípidos se convierten en los sustratos prioritarios del metabolismo energético. Estos hechos fuerzan al organismo a una serie de adaptaciones metabólicas, que facilitan el aprovechamiento adecuado de los nutrientes; en esas adaptaciones intervienen varias hormonas, entre las que sobresale la insulina. La malnutrición altera esas circunstancias y es la causa de muchas patologías graves presentes en etapas de desarrollo, así como de una proporción sustancial de las muertes infantiles en el mundo; en la mayoría de los niños que experimentan esa condición, la deficiencia nutricional abarca la etapa intrauterina y la lactancia.*

*Nuestro trabajo previo ha puesto de manifiesto que cuando la subnutrición persiste hasta la vida adulta, en el tejido muscular se establece un estado de hipersensibilidad a la insulina; en consecuencia, parece interesante examinar si esa condición adaptativa ya se encuentra presente durante la lactancia o bien si, en esa fase de inmadurez, la respuesta frente al déficit nutricional posee otras características.*

*Todo ello fundamenta el interés del estudio experimental de las repercusiones de la subnutrición en la etapa lactante, utilizando el modelo que hemos desarrollado en la rata.*



### **3.1.- Insulinemia y glucemia características de la etapa lactante: efecto de la subnutrición:**

Durante la lactancia, la homeostasis glucídica posee unas características propias que permiten la adaptación del metabolismo a un intenso crecimiento, así como a la composición de la leche, un alimento proporcionalmente rico en lípidos pero pobre en glúcidos (Jenness, 1974). El lactante mantiene unas necesidades altas de glucosa destinada, sobre todo, al cerebro, órgano muy dependiente de este sustrato y cuyo crecimiento se encuentra acelerado en las etapas perinatales. Está demostrado que la normoglucemia durante la lactancia se logra, en gran parte, gracias a una intensa gluconeogénesis llevada a cabo por el hígado (Burnol et al., 1986); ésta, a su vez, depende de los cofactores y la energía que derivan de la oxidación hepática de los ácidos grasos lácteos, una pauta metabólica que se pone en marcha a partir de las primeras ingestas de leche (Pégorier et al., 1992). Contribuye a esa adaptación el hecho, bien conocido, de que durante la lactancia, la insulinemia sea inferior a la propia del adulto (Girard et al., 1992) (la captación cerebral de glucosa es independiente de esta hormona); esta condición concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, al comparar la insulina plasmática de las ratas controles de 10 y 70 días de vida.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la subnutrición altera este panorama fisiológico de la rata lactante: ocasiona una ligera hipoglucemia y reduce a la mitad el nivel plasmático de insulina. Se sabe que la restricción nutricional a la madre disminuye el peso, flujo sanguíneo y producción de leche de su glándula mamaria (Sakanashi et al., 1987). Este impacto de la subnutrición sobre la cantidad de leche disponible permite sugerir una causa indirecta de la hipoglucemia establecida en la rata lactante: una probable depresión de la gluconeogénesis; esta alteración, aunque hipotética, es previsible, dado que la deficiencia de lípidos de la leche implicará una menor tasa de oxidación hepática de los ácidos grasos. En este contexto es posible, además, que la hipoinsulinemia contribuya a evitar que la glucemia sea todavía más baja, para prevenir las repercusiones negativas que podrían derivar de la agudización de ese cuadro. En la

discusión de los resultados obtenidos en el hígado se complementarán estas ideas (sección 4).

La reducción de la insulina plasmática es una de las consecuencias mejor conocida de la subnutrición. El páncreas endocrino es muy sensible a esa condición restrictiva durante la etapa perinatal, que es crítica para el desarrollo y maduración de las células  $\beta$  (Fowden y Hill, 2001); por eso, en diversos modelos de subnutrición (aplicada tanto durante la gestación como sólo en sus fases finales y comprendiendo, o no, la lactancia), se ha comprobado que se produce una depresión de la capacidad insulino-secretora de esas células (Dahri et al., 1991; Martín et al., 1997; Heywood et al., 2004). El tipo de restricción aplicado en el presente estudio conduce a un cuadro similar: la secreción de insulina está marcadamente reducida en las ratas adultas (como se ha presentado en la primera parte de esta Discusión) y los datos obtenidos en los animales de 10 días demuestran que ese efecto negativo ya es patente durante la lactancia. En todas sus etapas, estas ratas subnutridas no sólo presentan hipoinsulinemia basal sino que su respuesta insulino-secretora frente a la glucosa experimenta una marcada deficiencia.

En trabajos previos de nuestro grupo se han estudiado las posibles causas de esa deficiencia; se ha comprobado que tanto la expresión del gen de la insulina como el metabolismo insular de la glucosa, metabolismo que conduce a un incremento dicha expresión, se encuentran fuertemente deprimidos en las ratas adultas (Martín et al., 1997). El PDX-1 es un factor de transcripción clave en la mediación de ese efecto de la glucosa (MacFarlane et al., 1994); pues bien: se ha visto que tras el destete, este factor está disminuido en ratas procedentes de madres subnutridas (Arantes et al., 2002) y que su expresión está reducida en un 70% en las ratas adultas restringidas según nuestro modelo (Martín et al., 1997).

La alteración de la funcionalidad de las células  $\beta$  repercute negativamente más tarde, en aquellas situaciones en que la demanda de insulina está incrementada, como ocurre en la gestación (Blondeau et al., 1999) y el envejecimiento (Garofano et al., 1999). Además, como se ha señalado en la Introducción y se ha sugerido repetidas veces en la literatura

científica, la deficiencia nutricional en etapas críticas del desarrollo de las células  $\beta$  predispone para la diabetes (Heywood et al., 2004).

### **3.2.- Tolerancia a la glucosa de las ratas lactantes subnutridas**

Un resultado muy destacable obtenido en el presente trabajo es que las ratas subnutridas lactantes mantienen normal la tolerancia a la glucosa tras una carga de este sustrato, a pesar de que su respuesta insulino-secretora se encuentra severamente deprimida. Se sabe que la tolerancia a la glucosa durante la etapa lactante es menor que en el animal adulto; ello se debe a que la insulina provoca efectos mucho menos intensos en el hígado (sobre la supresión de la producción de glucosa) y en los tejidos periféricos (sobre la captación de glucosa) (Issad et al., 1988; Ferré et al., 1990; Sampaio et al., 2003). Esto concuerda con los datos básicos presentados en el apartado anterior sobre la significación fisiológica de la homeostasis glucídica durante la lactancia, porque unos efectos insulínicos disminuidos contribuirán a que exista más glucosa en la sangre disponible para el cerebro. Con la transición al destete aumenta la proporción de glúcidos en la dieta y ese cambio nutricional conlleva un incremento de la sensibilidad a la hormona (Girard et al., 1992).

El panorama anterior resulta fuertemente perturbado por la subnutrición: el mantenimiento de la normotolerancia a la glucosa a pesar de los reducidos niveles de insulina plasmática sugiere que la subnutrición incrementa la sensibilidad a la insulina. Por lo tanto, la condición de hipersensibilidad que se había observado previamente en la rata restringida adulta (Agote et al., 2001), ya se encuentra establecida durante la lactancia. Hay que resaltar que una marcada diferencia entre ambas etapas es que durante esa fase lactante se requiere que la sensibilidad a la insulina se encuentre fisiológicamente baja, como venimos indicando.

### **3.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido muscular de transportadores de glucosa**

Mediante la técnica del clamp acoplada a la administración de 2-desoxiglucosa otros autores han comprobado que el estímulo insulínico sobre la captación de glucosa en los tejidos adiposo y muscular es bajo en las ratas lactantes, incrementándose tras el destete; ello pone de manifiesto que la lactancia es una etapa de resistencia fisiológica a la insulina (Ferré et al., 1990). En contrapartida, nuestros resultados obtenidos en las pruebas de tolerancia a la glucosa sugieren que la subnutrición revierte este cuadro de resistencia y provoca hipersensibilidad a la hormona; en consecuencia, cabe prever que el estímulo hormonal sobre la captación de glucosa se encuentre incrementado en las ratas lactantes que sufren la restricción.

Es conocido que en esa especie, que nace prácticamente sin reservas grasas, la cantidad de tejido adiposo se mantiene escasa lo largo de la lactancia y comienza a acumularse tras el destete (Girard et al., 1992). En un trabajo reciente se ha visto que la subnutrición materna provoca una disminución importante del tejido adiposo blanco de la progenie (Gosby et al., 2003); aunque este resultado se ha obtenido en las ratas tras el destete, es lógico deducir que en los animales restringidos según nuestro modelo, la proporción de dicho tejido se encuentre por debajo de la cifra, típicamente pequeña, de la lactancia. Por eso, el impacto global de la hipersensibilidad insulínica en esas ratas (es decir: la normotolerancia a la glucosa asociada paradójicamente a la hipoinsulinemia) derivará esencialmente de los cambios que induzca la subnutrición sobre el músculo; la contribución, al respecto, del tejido adiposo será mucho menor (ya efectuamos esta misma consideración al examinar la situación de la rata adulta). Además, en las ratas lactantes, el músculo representa un porcentaje sobre el peso corporal mucho más bajo que en las adultas: 16% y 40%, respectivamente (Girard et al., 1992); por ello, puede preverse que las modificaciones producidas en ese tejido y que repercuten provocando el aumento de la sensibilidad global a la insulina serán más intensas.

Puesto que en el uso muscular de la glucosa la etapa primaria dependiente de la insulina es su captación, en este trabajo se ha evaluado el

efecto de la subnutrición sobre los transportadores característicos: GLUT-1 y GLUT-4. En las etapas fetal y postnatal inmediata predomina el primero, pero luego va disminuyendo y aumenta paralelamente el GLUT-4. De este modo, hacia los 10 días de vida el contenido muscular de GLUT-1 ya es muy bajo, comparable al adulto, y el de GLUT-4 está muy incrementado, aunque todavía es algo inferior al del adulto (Santalucía et al., 1992; Castelló et al., 1993; Postic et al., 1994).

Nuestros datos son indicativos de que la hipersensibilidad muscular a la insulina de las ratas lactantes subnutridas no deriva de un incremento de GLUT-4 o GLUT-1, puesto que no se altera su contenido. Se sabe poco de la regulación de estos transportadores en etapas de desarrollo. Se ha señalado que los factores nutricionales podrían influir en este sentido; por ejemplo, la glucosa. En células musculares privadas de ésta se incrementa el GLUT-1, sin que se afecte el GLUT-4 (Koivisto et al., 1991); es posible que el ligero descenso de la glucemia observado en nuestras ratas subnutridas sea insuficiente para inducir un cambio similar. En cuanto al GLUT-4, se ha visto que las hormonas tiroideas (Weinstein et al., 1991) y los glucocorticoides (Li et al., 1998) influyen sobre su expresión muscular, pero en este trabajo no se ha investigado un posible efecto de la subnutrición sobre estas hormonas. En todo caso, la ausencia de cambios en la cantidad de GLUT-4 sugiere que el impacto de dichas hormonas podría estar modificado por otros factores asociados a la subnutrición.

Por otra parte, en otro modelo de restricción nutricional, en cerdos jóvenes, también se han obtenido datos discordantes en cuanto al contenido muscular de transportadores de glucosa y la captación de ésta; este tipo de resultados sugiere que un *status* nutricional energéticamente pobre podría, más bien, alterar la distribución subcelular de dichos transportadores, o su actividad (Katsumata et al., 1999), más que su cantidad.

### **3.4.- Efecto de la subnutrición sobre la translocación del GLUT-4**

Existen pocos estudios acerca de la evolución durante el desarrollo de la capacidad de translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática. En un reciente trabajo, Sampaio et al., (2003) muestran que la redistribución del transportador inducida por la insulina es relativamente baja en el músculo de ratas de 4 días (nutridas normalmente) y poco después ya se produce con la intensidad propia del animal adulto; en cambio, el efecto hormonal sobre la captación de glucosa sólo llega a ser tan alto como en el adulto a partir del destete, coincidiendo con la desaparición de la resistencia fisiológica a la insulina característica de la lactancia. Al comparar estos resultados obtenidos en ratas normales con los correspondientes a las ratas subnutridas según el modelo de los citados autores se observa una pobre captación basal de glucosa en estas últimas, así como una ausencia de estímulo insulínico sobre dicha captación (que se restaura tras el destete). Además, estas ratas presentan una baja proporción del GLUT-4 presente específicamente en la membrana plasmática (no han evaluado el contenido total); su translocación, al tratar los músculos *in vitro* con insulina, se encuentra al principio muy deprimida, para normalizarse progresivamente tras el destete.

Como hemos señalado antes, en las ratas subnutridas según la pauta aplicada en este trabajo no se modifica el contenido muscular total de GLUT-4; pues bien: los resultados obtenidos tras el fraccionamiento de las membranas demuestran que tampoco cambia su distribución subcelular en estado basal. Sin embargo, el efecto de la insulina sobre la translocación del GLUT-4 está intensificado, ya que tanto su incremento en la superficie de la célula como su disminución en el reservorio intracelular son significativamente superiores a los que se producen en las ratas controles. Este resultado confirma la hipótesis de que el aumento de la sensibilidad a la insulina provocado por la subnutrición deriva, al menos en parte, de una mejor translocación del GLUT-4; además, demuestra que esa hipersensibilidad ya está instaurada durante la lactancia.

Es muy destacable el hecho de que la subnutrición según nuestra pauta establezca en las ratas lactantes un cuadro opuesto al de su resistencia característica. También destaca que sea un resultado contrario al que

observan Sampaio et al. (2003), ya que en las ratas examinadas por esos autores la subnutrición más bien agrava la resistencia muscular típica a la hormona. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ambos modelos difieren mucho en sus características; Sampaio et al. subnutren suministrando a la rata madre una dieta totalmente exenta de proteínas y sólo durante los diez primeros días de lactancia: un tipo de malnutrición poco comparable a la condición restrictiva más frecuente del ser humano. Con todo, hay que señalar que las ratas subnutridas según ese modelo temporal también manifiestan un incremento de la sensibilidad a la insulina cuyo llegan a adultas, como las estudiadas en el presente trabajo.

### **3.5.- Efecto de la subnutrición sobre la actividad intrínseca del GLUT-4**

Las ratas lactantes subnutridas mantienen normal la tolerancia a la glucosa a pesar de su escasa secreción inulínica. Esto nos ha llevado a pensar que la intensificación de la respuesta hormonal sobre la captación muscular de glucosa que se produce en estos animales sea muy grande. Aunque, como se ha visto, la subnutrición mejora la capacidad de translocación del GLUT-4, la magnitud de esta mejora no es muy marcada: más bien parece insuficiente para explicar toda la captación de glucosa que debe producirse en el músculo.

La discordancia anterior no es excepcional. En la mayoría de los estudios en los que se comparan la translocación del GLUT-4 y el incremento consecuente producido en la captación de glucosa se observan discrepancias: esa captación suele ser mayor de lo que cabría esperar en base a la cantidad de GLUT-4 trasladado a la superficie celular. Por ejemplo, recientemente, Sampaio et al., (2003) han observado en músculo *in vitro* procedente de ratas normales que la translocación del GLUT-4 suscitada por la insulina ya se produce con la máxima intensidad (la propia del adulto) hacia la mitad de la lactancia; en cambio, el efecto hormonal máximo sobre la captación de glucosa no ocurre hasta después del destete. Este tipo de resultados discordantes ha suscitado la idea de que este transportador, una vez insertado en la membrana plasmática experimenta,

además, una activación de su capacidad de transporte. Estudios recientes sobre el mecanismo que estaría implicado demuestran que existe una correlación entre los efectos insulínicos sobre la captación de glucosa y la capacidad hormonal para activar la vía de la p38MAPK. Puesto que esta vía no estimula la translocación se ha postulado que, más bien, induce un aumento de la actividad intrínseca del GLUT-4 ya translocado a la membrana plasmática, contribuyendo así a incrementar la captación de glucosa, tanto en células musculares como en adipocitos (Somwar et al., 2001; Huang et al., 2002; Niu et al., 2003).

Nuestros resultados van en esa línea; sugieren que un incremento de la actividad intrínseca del GLUT-4 contribuya al aumento de sensibilidad a la insulina que experimentan las ratas lactantes subnutridas y que ello está mediado por la p38MAPK. En el músculo de estas ratas se encuentra significativamente incrementado el contenido de p38MAPK. Es sabido que la insulina induce la fosforilación dual de esta proteína, en treonina y tirosina, y así conduce a su activación. Pues bien: tanto en estado basal como tras la inyección de hormona, la proporción de fosfo-p38MAPK muscular también es mayor en las ratas subnutridas que en sus controles. Por lo tanto, estos datos favorecen nuestra propuesta: la subnutrición va acompañada de un aumento de p38MAPK y de la capacidad insulínica para activarla y estos hechos contribuyen a la mejora de la sensibilidad establecida en el músculo. En apoyo de esta idea está la reciente observación de que la fosforilación de esta proteína se encuentra disminuida en el músculo de pacientes diabéticos de tipo 2 (Koistinen et al., 2003), típicamente resistentes a la hormona.

En nuestras condiciones experimentales la insulina no aumentó la proporción de fosfo-p38MAPK que se había observado en el estado basal, en ninguno de los dos tipos de ratas. En miocitos se ha visto que esa fosforilación es dependiente del tiempo y disminuye a partir de un determinado momento (Somwar et al., 2001); de modo que la ausencia de aumento en nuestras ratas podría estar indicando que el efecto insulínico producido *in vivo* es breve, probablemente porque va seguido de la actuación de una fosfatasa que regularía a la baja la señal generada. Koistinen et al. (2003) sí que observan un incremento de fosfo-p38MAPK



en músculo humano, pero en condiciones de hiperinsulinemia sostenida, bajo clamp.

### **3.6.- Efecto de la subnutrición sobre los componentes próximos de la vía de señales insulínica:**

En diferentes situaciones de resistencia tisular a la insulina se encuentran alteradas algunas de las moléculas que forman parte de la vía de señales de esta hormona (Ryder et al., 2001); de ahí el interés de investigar la situación al respecto en el músculo de las ratas subnutridas lactantes, que son hipersensibles, para averiguar qué etapas son las responsables de esa condición. Por otra parte, son pocos los estudios que se han efectuado sobre los componentes de la vía y su activación durante el desarrollo. Aunque el grupo de Alexandrides (Alexandrides et al., 1989) encontró que la capacidad de ligadura a la insulina era mayor en el músculo de la rata lactante que en el del animal adulto, más recientemente el grupo de Sampaio (Sampaio et al., 2003), evaluando directamente las proteínas mediante Western, no ha observado diferencias significativas en la cantidad de receptores o de IRS-1, ni en la fosforilación de ambos, durante la lactancia, ni con posterioridad al destete. No parece, pues, que la resistencia hormonal característica de la etapa lactante esté asociada a un menor contenido o menor capacidad de activación de estos componentes de la vía de señalización.

Nuestros datos demuestran que la subnutrición conduce, en plena lactancia, a un notable incremento del contenido muscular de receptores de insulina, sin que se altere la disponibilidad de IRS-1; esto contrasta con el hecho de que el IRS-1 se encuentra disminuido en algunos cuadros de resistencia (Sesti et al., 2001). Probablemente, estos cambios en la parte inicial de la vía insulínica se mantienen a lo largo de la vida de la rata subnutrida, ya que son los mismos que se habían observado en el animal adulto. En el modelo de subnutrición aplicado por Sampaio et al. (2003) se produce una disminución de los receptores y del IRS-1; pero como se ha indicado antes, ese modelo es muy diferente al que se ha estudiado en este trabajo. La mayor cantidad de receptores de insulina determina que su fosforilación, tras la administración de la hormona, esté intensificada en las

ratas subnutridas. También lo está la del IRS-1 y ello parece lógico, ya que según han señalado otros autores, esta fosforilación depende más de la actividad kinásica del receptor que de la propia cantidad de IRS-1 (Saad et al., 1992).

En resumen: el aumento de receptores, de su fosforilación y de la correspondiente al IRS-1 son coherentes con el incremento de sensibilidad a la hormona inducido por la subnutrición.

La influencia del IRS-2 sobre el transporte muscular de glucosa es menor que la del IRS-1 (Higaki et al., 1999); sin embargo, pensamos que su evaluación en las ratas subnutridas era interesante debido a que en algunas circunstancias su papel se vuelve más significativo: por ejemplo, en el ratón carente de IRS-1 (Yamauchi et al., 1996). Recientemente se ha observado una disminución de la fosforilación del IRS-2 en miotubos procedentes de seres humanos obesos intolerantes a la glucosa (Vollenweider et al., 2002). Por otra parte, el IRS-2 es una molécula clave en la inducción del aumento de sensibilidad insulínica que sigue típicamente al ejercicio físico (Howlett et al., 2002). No obstante, nuestros datos indican que ni la disponibilidad de IRS-2 ni su asociación a la PI 3-kinasa se encuentran afectados por la subnutrición; no parece, pues, que esta proteína intervenga en el aumento de sensibilidad ocasionado por esa condición.

### **3.7.- Efecto de la subnutrición sobre la PI 3-kinasa:**

La PI 3-kinasa juega un papel central en la mayoría de los efectos suscitados por la insulina (Shepherd et al., 1998) y puede alterarse en situaciones en las que está modificada la sensibilidad a esta hormona (Shulman, 2000; Kim et al., 2002); además, se piensa que interviene de modo importante en el tráfico vesicular que conduce a la translocación del GLUT-4 (Backer, 2000); de ahí el interés de su determinación en las ratas sometidas a restricción nutricional, en las que está incrementada esa translocación.

Nuestros resultados muestran que la subnutrición incrementa de un modo notable las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de las subunidades p85 (reguladora) y p110 (catalítica) de la PI 3-kinasa, que son las más ampliamente expresadas (Shepherd et al., 1998). Se ha descrito que la subunidad p85 estabiliza a la subunidad catalítica, prolongando su vida media (Yu et al., 1998); en esa línea, Fruman et al., (2000) han observado que en ratones “knock out” para la p85 $\alpha$  se produce una disminución de p110  $\alpha$  y  $\beta$ . Todo esto permite sugerir que el aumento de la subunidad catalítica observado en las ratas restringidas podría derivar no sólo de cambios en la expresión de sus dos isoformas sino también de un efecto estabilizador causado por la abundancia de p85.

Como se ha indicado en otra sección de esta Discusión (la que se refiere al músculo cardíaco), los aumentos de la subunidad reguladora conducen a cuadros de insulino-resistencia, porque cuando esta subunidad se encuentra libre puede competir con el heterodímero p85-p110 por su unión a los IRS (Ueki et al., 2002). En este sentido, se ha visto que una disminución de p85 incrementa la sensibilidad a la insulina en el músculo de ratones (Mauvais-Jarvis et al., 2002) y, contrariamente, la administración de hormona de crecimiento placentario induce un aumento de p85 $\alpha$  e insulino-resistencia en esos mismos animales (Barbour et al., 2004); en el ser humano, la recuperación de la sensibilidad hormonal que se produce tras el parto coincide con una reducción del contenido muscular de p85 $\alpha$  (Kirwan et al., 2004). Nuestros datos indican que el marcado incremento de p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  inducido por la subnutrición coincide con una mayor capacidad de asociación de la subunidad reguladora al IRS-1, tras estimular con insulina. Sin embargo, contrariamente a lo que se podría prever en función del mecanismo de competición propuesto, ese estímulo determina una activación de la PI 3-kinasa significativamente mayor en el músculo de las ratas subnutridas; esto indica que, en realidad, la especie que está asociada más intensamente al IRS-1 en esas ratas es el heterodímero enzimático completo. Este resultado puede deberse al hecho de que la subnutrición también induce un fuerte incremento de las isoformas de p110. El enriquecimiento simultáneo en los dos tipos de subunidad conduce, probablemente, a una presencia incrementada de las formas

heterodiméricas; ello evitará que se produzca el desequilibrio estequiométrico que daría lugar a la competición antes mencionada.

En resumen: el aumento de ambas subunidades en el músculo de las ratas subnutridas ocasiona, de hecho, una mayor asociación de la PI 3-kinasa al IRS-1, acontecimiento cuyo impacto sobre la insulino-sensibilidad a la insulina se considera crucial (Cusi et al., 2000). Por lo tanto, la subnutrición mejora significativamente la señalización insulínica en este punto de la vía.

Se sabe que los incrementos de acil-CoA y diacil-glicerol intracelulares consecuentes a la elevación de los ácidos grasos plasmáticos disminuyen la actividad de la PI 3-kinasa asociada al IRS-1; el mecanismo se basa en una fosforilación de éste catalizada por la PKC- $\theta$  (Yu et al., 2002). Es probable que la restricción nutricional en las ratas lactantes reduzca su nivel plasmático de ácidos grasos; ello, junto con la gran abundancia de receptores de insulina, podría contribuir a la mayor activación de la PI 3-kinasa observada en estos animales.

### **3.8.- Efecto de la subnutrición sobre señales avanzadas de la vía insulínica:**

Los productos originados en la actuación de la PI 3-kinasa estimulan a otras dos kinasas: PKB y PKC- $\zeta/\lambda$ ; una u otra se requieren para que aparezcan diversos efectos insulínicos, entre ellos, probablemente, la translocación del GLUT-4, aunque existe cierta controversia al respecto (Braiman et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2002; Cantó et al., 2004). Estas kinasas pueden modificarse en situaciones en que la acción insulínica está alterada; por ejemplo, la resistencia que deriva de una dieta hipergrasa está asociada a una menor activación de ambas en el músculo de la rata (Tremblay et al., 2001); en miotubos de humanos obesos intolerantes a la glucosa (Vollenweider et al., 2002) así como en músculo de ratas adultas cuyas madres se subnutrieron durante la gestación y la lactancia, se encuentra disminuida la PKC- $\zeta/\lambda$  (Ozanne et al., 2003). Estos resultados contrastan con la ausencia de cambios en la proporción de PKC- $\zeta/\lambda$  que

hemos observado en el músculo de las ratas lactantes subnutridas; no parece, por lo tanto, que esta isoforma de la PKC esté implicada en la hipersensibilidad a la insulina establecida en este tejido.

Sin embargo, el contenido de PKB presenta un fuerte incremento en las ratas restringidas. Ya se había observado un cambio similar en el corazón de estos animales en la edad adulta, órgano en el que, además, la fosforilación de esta kinasa, tras estimular con insulina, superaba a los valores controles. En el músculo de las ratas lactantes no hemos evaluado esta respuesta hormonal concreta, pero hemos estudiado la fosforilación de la GSK-3, uno de sus sustratos, ya que esto constituye un índice inmediato de la actividad *in vivo* de la PKB (Tremblay et al., 2003). La insulina estimuló la fosforilación de las dos isoformas de GSK-3,  $\alpha$  y  $\beta$ , en ambas poblaciones de ratas, un efecto conocido (Liu et al., 2004). Sin embargo, nuestros resultados indican que la proporción de fosfo-GSK-3 está incrementada en las ratas subnutridas, tanto en estado basal como tras el estímulo insulínico, lo que concuerda con el aumento del contenido de PKB en su músculo.

La GSK-3 es una kinasa que se encuentra constitutivamente activada; cuando se fosforila se inhibe y ello conduce a una disminución del grado de fosforilación de su sustrato, la glucógeno-sintasa y así se estimula la actividad de este enzima clave en la regulación de la síntesis del glucógeno (Newgard et al., 2000). En base al elevado nivel de fosfo-GSK-3 presente en el músculo de las ratas subnutridas lo más probable es que la glucógeno-sintasa se encuentre muy activada en ese tejido; ello, junto con su mayor capacidad de transporte de glucosa, podría conducir a una síntesis de glucógeno notablemente elevada en condición hiperinsulinémica. La conversión de glucosa en glucógeno constituye un hecho clave para la contribución muscular a la homeostasis glucídica en esa condición estimulada (Myarino et al., 1987). Por lo tanto, la inhibición más eficaz de la GSK-3 por la insulina en el músculo de las ratas lactantes subnutridas debe cooperar en el mantenimiento de la normotolerancia de estos animales. Es lo contrario de lo que se ha observado en músculos de diabéticos de tipo 2, en los cuales el efecto insulínico sobre la activación de

la glucógeno-sintasa se encuentra deprimido, contribuyendo esta baja respuesta al deterioro de su homeostasis glucídica (Nikoulina et al., 2001).

Por otra parte, trabajos recientes demuestran que la GSK-3 también cataliza la formación de fosfo-IRS-1, en varios restos de serina, proceso que disminuye su susceptibilidad a la fosforilación por el receptor de insulina; el resultado es una atenuación de la señal de esta hormona (revisiones en Plotkin et al., 2003 y Eldar-Finkelman, 2002). Por eso, la GSK-3 se ha involucrado en el estado de resistencia característico de la diabetes de tipo 2; se ha visto que la actividad de esta kinasa está elevada en los tejidos adiposo y muscular de roedores y humanos diabéticos (Eldar-Finkelman et al., 1999; Nikoulina et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que la hiperexpresión específica de GSK-3 en el músculo induce intolerancia a la glucosa en ratones machos (Pearce et al., 2004). En base a estos datos, la circunstancia de que la GSK-3 se encuentre más fosforilada, es decir, menos activa, en el músculo de las ratas subnutridas podría implicar, a su vez, que la fosforilación del IRS-1 en serina fuese menor en éstas; ello incrementaría la actuación catalítica del receptor de insulina sobre este sustrato, otro hecho a favor de una mayor intensidad de esta vía en los animales subnutridos.

### **3.9.- Efecto de la subnutrición sobre la p70S6-Kinasa**

La p70S6K es una Ser/Tre kinasa citoplasmática que participa en la biosíntesis proteica, catalizando la fosforilación de la proteína ribosomal S6; con ello se incrementa la translación de un grupo de mRNA que codifican para proteínas de los ribosomas y para otras implicadas en la maquinaria de la traducción (Raught et al., 2001). La insulina induce una fosforilación múltiple de la p70S6K y su consecuente activación (Weng et al., 1998), proceso que es clave en la regulación de la biosíntesis proteica que realiza esta hormona (Lawrence, Jr. et al., 1997). No se sabe bien si dicha fosforilación está directamente catalizada por la PKB, PDK-1 o mTOR, aunque estas dos últimas kinasas parecen ser las más probablemente implicadas (Proud, 2002; Beugnet et al., 2003).

Un estado nutricional pobre deprime la biosíntesis proteica. En parte, ello se debe a que el efecto insulínico requiere la acción permisiva de los

aminoácidos, especialmente los ramificados, aunque no está claro a través de qué mecanismos actúan (Anthony et al., 2001; Raught et al., 2001; Kimball et al., 2002; Proud, 2002; Karlsson et al., 2004). Nuestros datos muestran que la subnutrición no altera el contenido muscular de p70S6K; aparentemente, dicha restricción tampoco modifica la capacidad insulínica para fosforilar esta proteína. Sin embargo, el déficit nutricional conlleva una reducción de los aminoácidos ingeridos; en consecuencia, el panorama parece ser el siguiente: la fosforilación de p70S6K en los animales subnutridos estaría produciéndose con una intensidad normal, pero frente a un nivel más bajo de aminoácidos. En este trabajo no se ha analizado la concentración plasmática de éstos y por lo tanto no puede constatarse directamente esa escasez; pero existe un indicio de la misma: el contenido de proteína muscular está disminuido en las ratas subnutridas, lo que sugiere que esa falta de aminoácidos se está realmente produciendo. Hay otros hechos a favor de que ese déficit ocurra, aunque indirectos: esos sustratos deprimen la acción insulínica, tanto sobre el transporte de glucosa (Ferrannini et al., 1988) como sobre algunas etapas próximas de su vía de señales (Patti et al., 1998) y, sin embargo, en las ratas subnutridas ambos procesos se encuentran intensificados. Esta supuesta disminución de los aminoácidos no influiría negativamente sobre la fosforilación de la GSK-3, como han indicado nuestros datos, porque el estímulo insulínico que la induce es independiente de esos compuestos, según se ha demostrado recientemente (Liu et al., 2004).

Todo lo anterior permite sugerir la hipótesis de que la sensibilidad muscular para la fosforilación de la p70S6K y la biosíntesis de proteínas, ambas estimulables por la insulina, se encuentre más bien incrementada en las ratas subnutridas. A diferencia de lo que ocurre con relación al metabolismo glucídico, la capacidad hormonal para estimular dicha biosíntesis es fisiológicamente alta en el músculo de las ratas lactantes, que se encuentran en pleno crecimiento (Davis et al., 1993). A pesar de todo, lo que en realidad se produce en el músculo de las ratas subnutridas es una reducción del contenido de proteínas, como se ha señalado. Este resultado no resulta paradójico: aun admitiendo el incremento de sensibilidad a la insulina con relación a esa vía, la disminución no estaría ligada a una deficiencia en la vía de señales, sino que derivaría del efecto negativo de la

escasez de sustratos sobre la biosíntesis proteica. En esa línea, hay que indicar que el efecto depresor que tiene el ayuno sobre dicha biosíntesis es muy intenso durante las fases de la lactancia estudiadas concretamente en este trabajo, y disminuye en estadios posteriores (Davis et al., 1991).

Se ha visto que la vía mTOR/p70S6K puede modular a la baja la acción insulínica, induciendo la fosforilación del IRS-1 en Ser/Tre, un mecanismo que desacopla su interacción con la PI 3-kinasa (Tremblay y Marette, 2001). En este trabajo se ha demostrado que la subnutrición incrementa esta interacción, como se ha discutido anteriormente. Pero dado que no se produce una reducción de la cantidad de p70S6K activa en el músculo de las ratas subnutridas, no parece que este mecanismo regulador contribuya a la sensibilización del músculo a la insulina.

### **3.10.- Efecto de la subnutrición sobre la PTP1B:**

#### **a) Contenido total de PTP1B.**

Las PTPasas regulan a la baja muchas vías de señales estimuladas por tirosín-kinasas, hidrolizando restos de fosfo-tirosina de ciertas proteínas implicadas en ellas; la actividad de estas vías resulta del equilibrio entre esos dos tipos de enzimas. Se sabe menos sobre estos mecanismos de atenuación de señales que sobre su activación, debido a la poca especificidad que tienen las PTPasas *in vitro*: ello hace difícil precisar cuál es su verdadero sustrato en las células (Espanel et al., 2001; Ostman y Bohmer, 2001; Tonks, 2003).

En el caso de la vía insulínica, se han propuesto como moduladoras varias PTPasas, tanto membranosas como intracelulares; las dos más destacables son: LAR, y PTP1B, respectivamente; ambas desfosforilan al receptor de insulina. La sobreexpresión de LAR en músculo de ratón provoca resistencia a esta hormona (Zabolotny et al., 2001); sin embargo, el contenido de LAR en este tejido es escaso (Norris et al., 1997), lo que sugiere que tiene poca importancia fisiológica. Parece más relevante al respecto la PTP1B, porque es abundante en el músculo y en otros tejidos



sensibles a la insulina. Se sabe que la PTP1B regula esta sensibilidad (Kusari et al., 1994); por ejemplo, está incrementada en el ratón privado de su gen, como demostraron Elchebly et al., (1999); otro grupo ha observado que esa carencia intensifica el estímulo hormonal sobre la captación muscular de glucosa (Klaman et al., 2000). Recientemente se ha visto que la reducción de los niveles de PTP1B mediante oligonucleótidos anti-sentido mejora la sensibilidad a la insulina de ratones diabéticos (Gum et al., 2003). En cambio, la sobreexpresión de PTP1B en adipocitos reduce la proporción de GLUT-4 en la membrana plasmática de estas células (Chen et al., 1997).

En el presente trabajo se ha evaluado el contenido muscular de PTP1B para investigar su posible papel en la hipersensibilidad muscular inducida por la subnutrición. Nuestros datos muestran que la restricción nutricional no modifica el contenido total de esta PTPasa, un resultado que contrasta con el incremento de PTP1B observado en algunos cuadros de resistencia, como en el músculo de ratas GK (Dadke et al., 2000b) o de ratas tratadas con glutamato monosódico (Hirata et al., 2003). No obstante, se ha sugerido que la cantidad de PTP1B no es el determinante primario de su influencia catalítica sobre el receptor; hay que considerar también su capacidad de unión a éste (Bleyle et al., 1999), que se produce a través de la región N-terminal (Dadke et al., 2000a). De ahí que hayamos estudiado el efecto de la subnutrición sobre esa unión.

#### **d) Asociación de PTP1B al receptor de insulina:**

La asociación de PTP1B con el receptor de insulina se ha demostrado muchas veces en células cultivadas y en otros sistemas *in vitro* (Wang et al., 2001; Mur et al., 2002), pero solamente hay dos trabajos en que se ha constatado *in vivo*: en músculo e hígado de cerdo lactante (Suryawan y Davis, 2003) y de rata adulta (Hirata et al., 2003). En el presente estudio se pone de manifiesto, por vez primera, la existencia de complejos PTP1B – receptor de insulina, así como el incremento que induce la hormona sobre su formación, en el músculo de la rata lactante.

**c ) Localización subcelular de los complejos PTP1B-receptor:**

El receptor de insulina se fosforila cuando se encuentra en la membrana plasmática y ello provoca su endocitosis; por otra parte, la PTP1B está situada en la membrana del retículo endoplásmico, con su dominio fosfatásico orientado hacia el citoplasma (Frangioni et al., 1992); así pues, la asociación de ambos sucede en un compartimento interno. Se ha visto que el receptor intracelular está mayoritariamente fosforilado (Calera et al., 2000). Por lo tanto, la fosforilación y desfosforilación de esta proteína parecen producirse siguiendo una secuencia temporal y en distinto sitio celular (Haj et al., 2002). Hay que indicar, no obstante, que recientemente se ha visto que la PTP1B también puede actuar sobre el receptor sin que éste experimente previa internalización (Shi et al., 2004).

En este trabajo hemos observado que en el estado basal ya existe una cantidad destacable de complejos PTP1B-receptor y que son mucho más abundantes en las ratas subnutridas que en sus controles; quizá esta diferencia refleje la mayor proporción de receptores que presentan las primeras. La insulina induce la asociación de ambas proteínas en los dos tipos de ratas, pero la subnutrición altera la cinética de esta interacción: en las restringidas se mantiene elevada durante el lapso de 20 minutos analizado, mientras que en las controles regresa al valor basal a los 10 minutos; de ello resulta que la cantidad de PTP1B ligada al receptor siempre es más abundante en las ratas restringidas que en sus controles.

A pesar de que en estado basal, la proporción de complejos PTP1B-receptor es significativamente más abundante en las ratas subnutridas, la cantidad de receptor fosforilado que éstas presentan no se encuentra por debajo del valor control, como podría esperarse en base a la desfosforilación que cataliza la PTP1B; ello sugiere que la actividad de esta PTPasa se encuentra inhibida en esas ratas. La insulina exógena aumenta los complejos PTP1B-receptor en las dos poblaciones de animales, pero siguen siendo más abundantes en los restringidos, y también lo es la cantidad de receptor fosforilado; esto vuelve a sugerir que la subnutrición deprime la actividad de esta PTPasa, aunque incrementa su interacción con el receptor de insulina.

**d) Regulación de la actividad de la PTP1B.**

Las consideraciones anteriores indican que otros mecanismos diferentes a la simple asociación entre el receptor y la PTP1B juegan un papel importante en la regulación de la actividad de esta PTPasa. Lo cierto es que se trata de un proceso complejo y no se conoce por completo. Parece ser que intervienen dos tipos de factores: (1) su fosforilación en restos de tirosina y serina; (2) el estado redox del medio intracelular.

**(1) Fosforilación de la PTP1B:**

El grupo de Tao y col. (Tao et al., 2001) ha visto que la insulina induce la fosforilación en tirosina de la PTP1B en el músculo y tejido adiposo y que este cambio conduce a una disminución de su actividad fosfatásica; también han observado que el cAMP provoca su fosforilación en serina y que ello aumenta esa actividad. Estos datos sugieren que no toda la PTP1B asociada al receptor esté siempre catalizando su desfosforilación. Como hemos señalado antes, la cantidad de receptores fosforilados en tirosina se encuentra incrementada en las ratas subnutridas, y por ello su actividad kinásica sobre la PTP1B será mayor; a favor de esto, hay que indicar que en el grupo de Calera (Calera et al., 2000) ha visto que, efectivamente, la capacidad kinásica del receptor es elevada cuando se encuentra fosforilado e internalizado. Por lo tanto, esto conducirá a un aumento de la fosforilación en tirosina de la PTP1B y a la atenuación de su capacidad fosfatásica; a su vez, ello permitiría, que se mantuvieran altos los niveles de receptor fosforilado, lo que coincide con nuestros resultados. En conjunto, esto concuerda con la intensificación de la vía de señales que se produce en el músculo de las ratas subnutridas.

Hay que reseñar, sin embargo, que existe cierta controversia en cuanto al efecto de la fosforilación en tirosina sobre la actividad de la PTP1B, ya que según otros autores conduce a un incremento de la misma, si bien esto no se ha descrito *in vivo* sino en una línea celular (Dadke et al., 2000b).

## (2) Oxidación de la PTP1B:

En la regulación de muchas vías de señales de hormonas y citocinas intervienen diversas especies reactivas oxigenadas (Finkel, 2000). Así, se sabe desde hace años que algunos oxidantes (por ejemplo: el  $H_2O_2$ ) mimetizan los efectos insulínicos sobre el transporte de glucosa (Czech et al., 1974). Un posible mecanismo se basa en la inhibición de las PTPasas, mediatizada por la oxidación del grupo tiólico de una cisteína crucial presente en el centro catalítico (Zhu et al., 2001; Mahadev et al., 2004); Mahadev et al., (2001) han demostrado que la insulina induce la formación de  $H_2O_2$  en adipocitos e inhibe la actividad de la PTP1B; en otro estudio se han observado efectos similares y, simultáneamente, un aumento de la fosforilación del receptor de insulina y del transporte de glucosa (Cho et al., 2003); es decir, un cuadro análogo al que se establece en las ratas subnutridas. Por eso, la información anterior permite plantearse la posibilidad de que la subnutrición influya sobre el estado redox muscular y que ello repercuta sobre la actividad de la PTP1B.

Muchos trabajos recientes demuestran que la restricción calórica reduce la génesis mitocondrial de radicales oxidativos y se cree que eso retrasa la aparición de algunos efectos negativos del envejecimiento (Barja, 2002; Merry, 2002). En base a estos hechos, cabe preguntarse si una disminución de esos radicales podría ocurrir en las ratas subnutridas, con lo cual aumentaría la actividad de la PTP1B, justamente lo contrario de lo que parece estar ocurriendo. Sin embargo, no se sabe cómo repercute realmente la subnutrición sobre el estado redox muscular del animal lactante; quizá ésta no conduzca al descenso de radicales oxidativos característico de los modelos de restricción calórica antes señalados: éstos se han establecido en la edad adulta o en la etapa de envejecimiento. Recientemente se ha visto, por ejemplo, que en el músculo sólo se produce un incremento de radicales oxidativos cuando la restricción calórica tiene una larga duración (Gredilla et al., 2004).

### **a) Interacción de la PTP1B con los IRSs:**

Se ha demostrado que la PTP1B desfosforila al IRS-1 (Calera et al., 2000; Goldstein et al., 2000), inhibe su asociación a la PI 3-kinasa (Egawa

et al., 2001) y desfosforila al IRS-2 (Mahadev et al., 2001). Esto ha llevado a considerar que esta PTPasa también regula a la baja la señal insulínica más allá del receptor.

No hemos encontrado publicaciones en las que se ponga de manifiesto una asociación directa entre la PTP1B y el IRS-1 o IRS-2, asociaciones que han sido efectivamente demostradas en el presente trabajo. Además, se ha visto que la subnutrición no altera la cantidad de ninguno de estos dos complejos en estado basal en el músculo de la rata lactante. Tampoco se observan cambios al administrar insulina; quizá el lapso seleccionado, 20 minutos tras la inyección, no es el adecuado para poner de manifiesto un posible aumento de estos complejos *in vivo*.

Se sabe poco de la interacción de la PTP1B con el IRS-2; en este trabajo no se ha profundizado en ello, debido al papel secundario que éste juega en el músculo. Se han estudiado más los efectos referidos al IRS-1.

Como se ha dicho anteriormente, la fosforilación del IRS-1 inducida por la insulina sí que se ha visto incrementada en ambos tipos de ratas, contrastando con la falta de cambios observada en la cuantía de los complejos IRS-1-PTP1B; esta discordancia sugiere que la cantidad de PTP1B asociada al IRS-1 no es un índice directo de la actividad fosfatásica sobre este sustrato. Por otra parte, a pesar de que la cantidad de este complejo es la misma en los dos tipos de ratas, la fosforilación del IRS-1 es más intensa en las subnutridas (y su asociación consecuente a la PI 3-kinasa); este resultado puede reflejar simplemente que la abundancia de receptores fosforilados que se generan tras el estímulo hormonal es mayor en las ratas restringidas que en las controles, y por ello también será más alta su actividad tirosín-kinásica. Posiblemente, todos los hechos anteriores también ilustran la complejidad de los mecanismos de control de la actuación de la PTP1B sobre el IRS-1. Goldstein et al. (2000) han visto que para esa actuación se requiere la formación de un complejo ternario entre ambos y el Grb-2; recientemente se ha sugerido que esta proteína jugará un papel importante en la regulación *in vivo* de la actividad catalítica de la PTP1B (Suryawan y Davis, 2003). Pero en este trabajo no se ha estudiado si la subnutrición influye sobre la disponibilidad de Grb-2.

#### **4.-ESTUDIO EN EL HIGADO DE RATA LACTANTE**

*El hígado juega un papel esencial en la homeostasis glucídica. En la condición postabsortiva ese órgano capta glucosa plasmática y la almacena como glucógeno; durante el ayuno produce glucosa degradando ese glucógeno y, sobre todo, a través de la gluconeogénesis. Estas funciones tienen una importancia particular durante las etapas perinatales. Hacia el final de la gestación el hígado sintetiza una reserva de glucógeno a partir de la glucosa materna que llega al feto por vía placentaria y esa reserva se degrada en las primeras horas de vida, para evitar que la hipoglucemia postnatal fisiológica se agudice o se prolongue. Cuando se establece la lactancia, en el hígado se activa la gluconeogénesis, que es un proceso fundamental, dada la pobreza relativa en glúcidos de la leche. Esta vía metabólica permanecerá estimulada a lo largo de toda la lactancia. La energía requerida para la síntesis de neoglucosa deriva de una intensa  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos lácteos. Todos estos procesos están regulados mediante ajustes del ambiente endocrino, cuyo aspecto más importante es la proporción insulina/glucagón en el plasma.*

*En conjunto, estas adaptaciones metabólicas que van sucediendo a lo largo de las primeras etapas del desarrollo son similares a las que se producen en el hígado del animal adulto durante el ayuno prolongado. Sin embargo, hay una diferencia notable: en ese estadio, los lípidos y proteínas que sustentan la producción de glucosa son endógenos, mientras que en el hígado del lactante son suministrados por la leche. Por lo tanto, cuando esos sustratos dietarios sean fuertemente limitados como consecuencia de la subnutrición, se producirán importantes alteraciones en el metabolismo hepático. En este trabajo se ha efectuado un estudio de la influencia de esa subnutrición sobre la vía insulínica en el hígado de la rata lactante, estudio que constituye una primera aproximación al problema.*

#### **4.1.- Efecto de la subnutrición sobre la vía insulínica en el hígado:**

La vía de señales de la insulina ha sido descrita con detalle en la Introducción (Apartado 6). En el hígado, concretamente, sus características más destacables son las siguientes: en ese órgano coexisten distintas formas de IRS pero la principal es el IRS-2, por su abundancia y significación en el metabolismo glucídico hepático (Sutherly et al., 1995; Withers et al., 1998; Rother et al., 1998; Dickens et al., 1998; Kubota et al., 2000); también se encuentra el IRS-1, que interviene con menos relevancia en ese metabolismo y parece implicado en las acciones mitogénicas del IGF-1 (Rother et al., 1998). Además de la subunidad reguladora p85 de la PI-3 kinasa, en el hígado está presente la p50 $\alpha$ , una variante más corta que se asocia con más afinidad al IRS-1 que al IRS-2 (Inukai et al., 1997). La isoforma de la PKB que participa en las acciones insulínicas sobre el metabolismo hepático de la glucosa es la  $\alpha$ , y no la  $\beta$  (Cho et al., 2001a; Cho et al., 2001b).

En este trabajo se han analizado algunos componentes de la vía de señales en el hígado para estudiar cómo repercute la subnutrición sobre ella. Varios autores, con pautas de restricción distintas a nuestro modelo y aplicadas a ratas jóvenes o adultas obtuvieron resultados discordantes sobre la capacidad de ligadura de la insulina: en unos casos incrementos (Dardevet et al., 1991) y en otros disminuciones (Rao et al., 1991). En cambio, en el presente estudio, se ha visto que el nivel de receptores no se afecta por la subnutrición; tampoco se observan cambios en el contenido de IRS-1. Sin embargo, es destacable que la restricción nutricional induce un aumento importante de tres proteínas de la vía de señales: el IRS-2, la subunidad p85 de la PI 3-kinasa y la PKB. Estos resultados sugieren que la subnutrición conduce a un cuadro de hipersensibilidad hepática a la insulina en la rata lactante, hipótesis que será matizada a lo largo de esta Discusión.

En línea con esa propuesta se ha comprobado que, al administrar insulina, la asociación del IRS-2 al receptor hormonal es mayor en las ratas subnutridas que en sus controles. Aunque la cantidad de receptores no está alterada en las primeras, según ya se ha indicado, esa cantidad no parece un

determinante clave de la sensibilidad hepática a la insulina; el grupo de Pagliassotti (Pagliassotti et al., 2002), en un cuadro de resistencia producido por una dieta rica en sacarosa, no observó modificaciones en el número de receptores pero tanto su asociación al IRS-2 como la consecuente activación de la PI 3-kinasa estaban disminuidos; también se han descrito situaciones opuestas, es decir, estados de hipersensibilidad sin cambios en el receptor aunque con aumentos de la fosforilación del IRS-2 (Campbell et al., 2004). Shimomura y col. han visto en el hígado del ratón lipodistrófico que su resistencia a la insulina con respecto al metabolismo glucídico se debe a una disminución del IRS-2 (Shimomura et al., 2000). Todos estos datos muestran que la respuesta hepática a la insulina puede correlacionarse más con el IRS-2, o con su funcionalidad, que con el número de receptores. Por lo tanto, el aumento del IRS-2 ocasionado por la subnutrición favorece la hipótesis indicada, es decir, que esa condición induce un cuadro de hipersensibilidad a la insulina.

Es interesante señalar que los cambios en la sensibilidad hepática a esta hormona pueden presentarse asociados con alteraciones en su vía de señales aparentemente contradictorias; probablemente se trata de adaptaciones complejas, cuya significación todavía no se entiende bien. Así, se ha visto que en ratas ayunadas o tratadas con estreptozotocina se encuentra incrementada la fosforilación del IRS-1 y del IRS-2 en respuesta a la insulina, a pesar de que ambas son situaciones de clara resistencia (Rojas et al., 2001); más aún: así como la resistencia característica de la obesidad está ligada a una disminución de la actividad PI 3-kinásica (Anai et al., 1998), la que se produce como consecuencia de una dieta hiperlipídica va acompañada de un incremento de esa enzima (Anai et al., 1999).

Si en el hígado de las ratas subnutridas se estableciera efectivamente una hipersensibilidad a la insulina, esta hormona bloquearía más eficazmente la producción de glucosa en ellas. Es bien sabido que ese bloqueo es la consecuencia de dos acciones hormonales: un estímulo sobre la síntesis de glucógeno y una inhibición de la gluconeogénesis (que es el efecto más relevante en términos cuantitativos) y que estas respuestas resultan de un aumento de la actividad de la glucógeno-sintasa y de una menor expresión de la PEPCK y G6Pasa (Barthel y Schmoll, 2003). En este



trabajo no se ha evaluado ni el contenido hepático de glucógeno ni la actividad de esas enzimas; por eso no tenemos resultados experimentales concretos que permitan demostrar el tipo de adaptación real establecido en el hígado de las ratas subnutridas. Sin embargo, además de los incrementos de IRS-2, p85 y PKB antes señalados, se han obtenido dos resultados que muestran directamente que ese órgano experimenta un aumento de su respuesta insulínica:

- a) Tras la administración de insulina, es más intensa la fosforilación de la GSK-3, que es uno de los sustratos de la PKB; dado que en el estado basal no hay diferencias entre los dos grupos de ratas en cuanto a esa fosforilación, este resultado sugiere que después del tratamiento hormonal la PKB también se activa más en las subnutridas.
- b) El contenido hepático de p70S6K se encuentra aumentado en las ratas restringidas, así como su fosforilación.

Es un hecho bien conocido que la fosforilación de la GSK-3 (que provoca su inhibición) conduce a la activación de la glucógeno-sintasa; ello reduce, indirectamente, la liberación de glucosa procedente del glucógeno (el mecanismo se ha detallado en la sección 6.3 de la Introducción). Pero con independencia de este efecto, últimamente se ha visto que la GSK-3 también está implicada en la inhibición de la gluconeogénesis, ya que modula la expresión de PEPCK y G6Pasa hepáticas a través de un mecanismo todavía poco estudiado (Lochhead et al., 2001; Barthel y Schmoll, 2003). Por lo tanto, el hecho de que el incremento en la fosforilación de la GSK-3 sea mayor en las ratas subnutridas indica que en el hígado de estos animales, la insulina también inhibirá más eficazmente la producción de neo-glucosa a través del mecanismo que implica a la GSK-3.

Al margen de lo anterior, es sabido que la GSK-3 estimulada puede atenuar la vía insulínica en los tejidos muscular y adiposo, mediante la fosforilación en serina del IRS-1 (sección 3.8 de esta Discusión). Sin embargo, el papel concreto de esta kinasa sobre la sensibilidad hepática a esta hormona no está bien estudiado (Eldar-Finkelman et al., 1999).

La PTP1B regula a la baja las acciones insulínicas en el hígado; como indican nuestros datos, su contenido no está modificado por la

subnutrición. Pero la actividad de esta PTPasa se modula de manera muy compleja y desconocemos si la restricción nutricional influye sobre esa actividad, o sobre la capacidad de asociación a sus sustratos. Véase la discusión correspondiente a los resultados obtenidos con respecto a la PTP1B en el músculo (Sección 3.10).

#### **4.2.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de PTEN:**

Como se ha indicado en la Introducción, el PTEN es una lípido-proteín-fosfatasa que hidroliza un resto de fosfato en la posición 3 del PIP<sub>3</sub> generado por la PI 3-kinasa; así, al reducir sus niveles intracelulares, el PTEN disminuye la estimulación de la PKB y atenúa las acciones insulínicas (rev. en Leslie y Downes, 2002; Pendaries et al., 2003). En adipocitos 3T3-L1 se ha demostrado que el PTEN inhibe la captación de glucosa y la translocación del GLUT-4 (Nakashima et al., 2000); por el contrario, la supresión específica de su gen hepático en ratones aumenta la síntesis de glucógeno y mejora la tolerancia a la glucosa (Stiles et al., 2004); el tratamiento de ratones diabéticos con un oligonucleótido anti-PTEN incrementa su sensibilidad a la insulina (Butler et al., 2002). A pesar de que van acumulándose cada vez más datos en este sentido, la relevancia fisiológica que pueda tener el PTEN *in vivo* aún no está bien estudiada.

En este trabajo se ha visto que la subnutrición conduce a un fuerte incremento de la cantidad de PTEN en el hígado. Dado el papel de esa fosfatasa, este resultado parece contradecir la hipótesis de que la restricción nutricional causa hipersensibilidad hepática a la insulina. Sin embargo, otros datos recientes sugieren que el papel regulador del PTEN va más allá de su acción catalítica sobre el PIP<sub>3</sub>. Cuando en células carentes de esta fosfatasa se promueve su expresión, se observa que también produce otro efecto: el PTEN se comporta como un potente inductor de la síntesis del IRS-2 (Simpson et al., 2001). Sorprendentemente, se trata de un resultado próximo al que se ha obtenido en este trabajo *in vivo*: en el hígado de las ratas subnutridas coexisten altos niveles de PTEN y de IRS-2; por lo tanto, es posible que el PTEN sea el inductor de ese incremento del IRS-2. Por otra parte, se ha descrito que la hiperinsulinemia disminuye selectivamente la

expresión hepática de esta proteína (Shimomura et al., 2000) y puesto que la subnutrición conduce a un cuadro de hipoinsulinemia crónica, este déficit hormonal podría contribuir al fuerte incremento observado en la misma.

Por lo tanto, el PTEN induce efectos aparentemente contradictorios: atenúa la intensidad de la vía insulínica, pero también provoca un aumento de IRS-2, que constituye una señal clave de esta vía en el hígado. Se ha postulado que estas dos funciones se integrarían en un mecanismo de modulación de tipo “*feedback*”, en el que se producirían dos efectos simultáneos: una disminución de las acciones insulínicas (al reducirse el nivel intracelular de PIP3) y un aumento de la disponibilidad de IRS-2; con ese aumento, la célula quedaría mejor preparada para recuperar esas acciones cuando fuera necesario (Simpson et al., 2001). Hay que señalar que el PTEN está modulado por fosforilaciones en restos de Ser/Tre, así como a través de cambios de su localización celular, procesos todavía poco conocidos; de modo que la cantidad de esta fosfatasa podría no estar directamente relacionada con su actividad (Leslie y Downes, 2002).

En base a estos complicados mecanismos de regulación, todavía no bien estudiados, los datos obtenidos en este trabajo plantean la siguiente posibilidad: aunque la subnutrición incremente la capacidad hepática para responder a la insulina, es posible que esa respuesta se encuentre amortiguada en la condición basal. Los factores determinantes de esa amortiguación serían: la propia hipoinsulinemia de los animales subnutridos y el alto contenido de PTEN hepático. Como consecuencia de ambos factores, el hígado de la rata lactante subnutrida sería capaz de “escapar” a esa hipersensibilidad a la insulina en la condición basal, es decir, podría evitar una inhibición excesiva de la producción hepática de glucosa. De ese modo, dicho órgano llegaría a exportar a la sangre cierta cantidad de glucosa: la suficiente para impedir que se produjese un descenso profundo del nivel glucémico. Hay que tener en cuenta que una hipoglucemia aguda tendría graves consecuencias para el cerebro en pleno desarrollo. Sin la indicada capacidad de “escape”, ese descenso de la glucemia posiblemente sí que tendría lugar, ya que estaría facilitado por la limitación de la cantidad de glúcidos en la dieta (a lo cual se añadiría la hipersensibilidad en la captación muscular de glucosa causada por la subnutrición). A favor de que este cuadro adaptativo efectivamente se

produzca hay un hecho: la glucemia de las ratas subnutridas está disminuida sólo en un 30% con respecto al valor control. El grupo de Penicaud y col. demostró que la inhibición de la producción hepática de glucosa ocasionada por la insulina es menos marcada tras el ayuno (Penicaud et al., 1985); se trata de una condición comparable en cierta medida a la subnutrición y por lo tanto es un dato que concuerda con esa propuesta.

En las ratas lactantes se requiere una gluconeogénesis activa, ya que constituye un proceso crucial en esa etapa; pero en las ratas subnutridas parece más conveniente que su intensidad sea moderada y ello se lograría mediante un aumento de la sensibilidad hepática a la insulina. De este modo, se reduciría la cantidad de aminoácidos específicamente destinados a la vía gluconeogénica. Como el suministro de nutrientes está restringido en esas ratas, una limitación del uso de aminoácidos en la citada vía metabólica aumentaría su disponibilidad como sustratos de la biosíntesis proteica, proceso que también es esencial en plena etapa de crecimiento.

Por otra parte, la p70S6K, cuyo papel en la biosíntesis de proteínas se ha indicado en la sección 3.9 de esta Discusión, está notablemente incrementada en el hígado de las ratas subnutridas y su fosforilación (proceso insulino-dependiente) ya está elevada en la condición basal de éstas. Son resultados que sugieren que el hígado de dichas ratas también sea hipersensible a la insulina en cuanto a sus efectos sobre esta vía de biosíntesis, con las consideraciones y matizaciones que se han indicado en el caso del músculo (sección 3.9).

#### **4.3.- Efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de SOCS:**

Se ha evaluado el efecto de la subnutrición sobre el contenido hepático de SOCS-1 y SOCS-3, moléculas supresoras de la señalización de citoquinas (rev. en Krebs y Hilton, 2001) que, además, modulan a la baja la sensibilidad a la insulina. Estas proteínas son capaces de unirse al receptor de la hormona, inhibir su autofosforilación, su interacción con los IRS (Senn et al., 2003; Ueki et al., 2004a) y promover la degradación de éstos (Rui et

al., 2002). Recientemente se ha visto que la inhibición de SOCS-1 y SOCS-3 en el hígado de ratones obesos diabéticos mejora su resistencia a la insulina (Ueki et al., 2004b).

El estado nutricional puede afectar a la expresión de estas proteínas; así, se ha visto que la restricción dietaria provoca una disminución de la correspondiente a SOCS-3 en el hipotálamo de ratas viejas (Peralta et al., 2002). En este trabajo se muestra que la subnutrición no afecta al contenido de SOCS-3 hepático, pero induce un ligero incremento de SOCS-1. Considerando exclusivamente esos datos, no puede explicarse la influencia que los SOCS podrían tener sobre la hipersensibilidad hepática a la insulina de las ratas subnutridas, o sobre la atenuación de la misma sugerida para la condición basal; sería más informativo el resultado de un análisis sobre la interacción de los SOCS con el receptor de insulina, proceso que es dependiente de esta hormona (Ueki et al., 2004a) y cuya intensidad podría estar afectada por la subnutrición.

#### **4.4.- Efecto de la subnutrición sobre los transportadores de glucosa hepáticos:**

Los principales transportadores hepáticos de glucosa son el GLUT-1 y el GLUT-2. El primero capta la glucosa del compartimento extracelular para introducirla en el hepatocito; en cambio, el GLUT-2 funciona en las dos direcciones: puede introducir o extraer la glucosa de estas células. Es el tipo de transportador de glucosa con menor afinidad. A diferencia de los otros GLUTs, cuya actividad casi siempre es la máxima con independencia de la concentración de glucosa, la velocidad de actuación del GLUT-2 está subordinada a los niveles de ésta que se encuentren a uno y otro lado de la membrana; como su capacidad de transporte es muy alta, tiende a equilibrar rápidamente esos niveles. Por eso, en condiciones fisiológicas el GLUT-2 actúa como un “sensor glucémico” (Thorens, 2001): si se eleva la glucemia por encima de 6 mM aumenta la captación de glucosa por los hepatocitos (en donde se fosforila y ya no refluye); pero si la glucemia desciende por debajo de 4 mM estas células producen glucosa y entonces el GLUT-2 la exporta a la sangre (Thorens, 1996). En condiciones patológicas este

funcionamiento se encuentra alterado; así, en la diabetes, el hígado exporta activamente glucosa a la sangre a través del GLUT-2, a pesar de la hiperglucemia.

La dirección e intensidad de los flujos hepáticos de la glucosa no dependen principalmente de la disponibilidad de GLUT-2 sino de los mecanismos que regulan la producción y utilización de esta hexosa (síntesis y degradación del glucógeno, gluconeogénesis y glucolisis) (O'Brien y Granner, 1996); dicho de un modo más general: la cantidad de GLUT-2 presente en la membrana del hepatocito no es un punto de control primario en la regulación del metabolismo hepático de la glucosa (Hah et al., 2002); (Bollen et al., 1998). De acuerdo con ello, este transportador no experimenta cambios de su localización subcelular sino que, tras su síntesis, se sitúa permanentemente en la membrana plasmática (Ciaraldi et al., 1986; Nordlie et al., 1999); esto supone una diferencia notable con respecto al GLUT-4, que puede translocarse rápidamente a esa membrana en los tejidos muscular y adiposo. No obstante, esta idea de que la localización subcelular del GLUT-2 es fija ha sido recientemente cuestionada (Hah et al., 2002). Por otra parte, aunque este transportador no intervenga en la regulación de los cambios rápidos del metabolismo glucídico hepático, sí que podría mediatizar las modulaciones establecidas a plazos más largos o con carácter crónico (Thorens, 1996).

Nuestros datos muestran que la subnutrición está ligada a un gran incremento de la proporción de GLUT-2 hepático. Una revisión de la bibliografía pone de manifiesto que la cantidad de este transportador suele aumentar en las situaciones caracterizadas por una intensa producción hepática de glucosa, como la diabetes; en esos casos el aumento del transportador contribuye a la hiperglucemia (Thorens, 1996). Se trata de cuadros de resistencia a la insulina, en los cuales también se encuentra activada la expresión de las enzimas claves para esa producción de glucosa, G6Pasa y PEPCK. Cuando en esos cuadros se normaliza la glucemia, tiene lugar una disminución de la expresión tanto del transportador como de esas enzimas (Burcelin et al., 1992; Brichard et al., 1993; Hidaka et al., 2002). En base a estas informaciones, el incremento de GLUT-2 en las ratas subnutridas podría considerarse como un resultado singular, ya que el

hígado de estas ratas parece más bien hipersensible a la insulina, como hemos visto en las secciones anteriores. Sin embargo, la bibliografía hace patente que, en realidad, se desconoce cómo repercuten las situaciones de hipersensibilidad hepática sobre la expresión del GLUT-2; dado que su función es bidireccional, no parece extraño que este transportador también se incremente en esas situaciones, en las que el efecto hormonal sobre la entrada de glucosa en el hepatocito, destinada a la síntesis de glucógeno o la glucólisis, se encuentra intensificada. Este sería el caso de las ratas subnutridas, que parecen hipersensibles a la insulina cuando se estimulan con la hormona. En la condición basal de estos animales, para la cual hemos sugerido que la acción de ésta se encuentre atenuada (y así sea posible una moderada producción hepática de glucosa), la presencia de una cantidad mayor de GLUT-2 favorecería su exportación a la sangre. Precisamente, este transportador es más abundante en los hepatocitos periportales (Hacker et al., 1991), lo que facilita la salida de la glucosa desde estas células a la circulación sistémica a través de la vena porta.

El contenido hepático de GLUT-1 es escaso: sólo supone un 5% del total de transportadores (Thorens et al., 1990). Su expresión se incrementa en las condiciones en que el nivel de insulina es bajo, como la diabetes (Tal et al., 1991) o el ayuno (Thorens et al., 1990). Por lo tanto, el aumento de GLUT-1 observado en las ratas subnutridas es coherente con esos datos, dada la hipoinsulinemia establecida en ellas. Probablemente, esa mayor disponibilidad de GLUT-1 favorecerá la capacidad hepática para usar catabólicamente la glucosa, ya que la cantidad de este transportador se correlaciona con la actividad glucolítica de las células en donde se expresa; en el caso del hígado son los hepatocitos perivenosos (Thorens, 1996).

**VI**

---

**CONCLUSIONES**





**Conclusiones:**

**1.- La subnutrición crónica establecida desde una etapa perinatal conduce a un incremento de la capacidad de respuesta a la insulina en los músculos esquelético y cardíaco de la rata adulta, con relación al transporte de la glucosa. Ello explica que los animales subnutridos sean normotolerantes a la glucosa, a pesar de que su secreción insulínica se encuentra fuertemente disminuida.**

**2.- La subnutrición aumenta el estímulo de la insulina sobre la translocación de los transportadores de glucosa en el músculo de la rata adulta.**

- a) En el músculo esquelético se incrementa la translocación del GLUT-4 y esto parece relacionado con un incremento de su contenido en receptores de insulina.**
- b) En el músculo cardíaco, se incrementa la translocación del GLUT-1, probablemente como consecuencia de un aumento de la actividad de la PI 3-kinasa y de la Akt.**

**3.- Las ratas lactantes que se han subnutrido desde el último tercio de la gestación son normotolerantes a la glucosa a pesar de su escasa respuesta insulino-secretora. Ello se debe, al menos en parte, a un incremento de su capacidad de respuesta a la insulina sobre la translocación del GLUT-4, lo cual está ligado a un aumento del número de receptores de la hormona así como de varias etapas de su vía de señales posteriores al receptor.**

**4.- La subnutrición establecida desde el último tercio de la gestación conduce a un aumento de GLUT-2 y GLUT-1 en el hígado de la rata lactante, así como de algunas señales de la vía insulínica. Es posible que ello tenga como consecuencia una hipersensibilidad frente a algunas de las respuestas hepáticas hormonales.**



**VII**

---

**BIBLIOGRAFÍA**



BIBLIOGRAFÍA

Abel, E. D. et al., 1999, Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart: *J.Clin.Invest*, v. 104, no. 12, p. 1703-1714.

Agote, M., L. Goya, S. Ramos, C. Alvarez, M. L. Gavete, A. M. Pascual-Leone, and F. Escrivá, 2001, Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 281, no. 5, p. E1101-E1109.

Ahmad, F., and B. J. Goldstein, 1997, Effect of tumor necrosis factor-alpha on the phosphorylation of tyrosine kinase receptors is associated with dynamic alterations in specific protein-tyrosine phosphatases: *J.Cell Biochem.*, v. 64, no. 1, p. 117-127.

Alessi, D. R., and C. P. Downes, 1998, The role of PI 3-kinase in insulin action: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1436, no. 1-2, p. 151-164.

Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen, 1997, Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha: *Curr.Biol.*, v. 7, no. 4, p. 261-269.

Alexandrides, T., A. C. Moses, and R. J. Smith, 1989, Developmental expression of receptors for insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-II in rat skeletal muscle: *Endocrinology*, v. 124, no. 2, p. 1064-1076.

Amasino, R. M., 1986, Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol: *Anal.Biochem.*, v. 152, no. 2, p. 304-307.

Anai, M. et al., 1999, Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-fed rats: *Diabetes*, v. 48, no. 1, p. 158-169.

Anai, M. et al., 1998, Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats: *Diabetes*, v. 47, no. 1, p. 13-23.

Yerson, K. E., and S. P. Jackson, 2003, Class I phosphoinositide 3-kinases: *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 35, no. 7, p. 1028-1033.

Anthony, J. C., T. G. Anthony, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson, 2001, Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine: *J.Nutr.*, v. 131, no. 3, p. 856S-860S.

Antonetti, D. A., P. Algenstaedt, and C. R. Kahn, 1996, Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, no. 5, p. 2195-2203.

Araki, E., M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Bruning, B. Haag, III, R. S. Johnson, and C. R. Kahn, 1994, Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene: *Nature*, v. 372, no. 6502, p. 186-190.

Arantes, V. C., V. P. Teixeira, M. A. Reis, M. Q. Latorraca, A. R. Leite, E. M. Carneiro, A. T. Yamada, and A. C. Boschero, 2002, Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation: *J.Nutr.*, v. 132, no. 10, p. 3030-3035.

Aronson, N.N. and Touster, O, 1974, Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods in Enzymology*. Eds.: Fleischer S and Packer, L. Vol. xxxI, part A, pág. 92. Academic Press, New York.

Avruch, J., C. Belham, Q. Weng, K. Hara, and K. Yonezawa, 2001, The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity: *Prog.Mol.Subcell.Biol.*, v. 26, p. 115-154.

Azzi, A., D. Boscoboinik, and C. Hensey, 1992, The protein kinase C family: *Eur.J.Biochem.*, v. 208, no. 3, p. 547-557.

Backer, J. M., 2000, Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of vesicular trafficking: *Mol.Cell Biol.Res.Commun.*, v. 3, no. 4, p. 193-204.

Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes, and D. R. Alessi, 1999a, PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2: *Curr.Biol.*, v. 9, no. 8, p. 393-404.

Balendran, A., R. Currie, C. G. Armstrong, J. Avruch, and D. R. Alessi, 1999b, Evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates phosphorylation of p70 S6 kinase in vivo at Thr-412 as well as Thr-252: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 52, p. 37400-37406.

Bandyopadhyay, D., A. Kusari, K. A. Kenner, F. Liu, J. Chernoff, T. A. Gustafson, and J. Kusari, 1997, Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 3, p. 1639-1645.

Bandyopadhyay, G., AND. Kanoh, M. P. Sajan, M. L. Styært, and R. V. Farese, 2000, Effects of adenoviral gene transfer of wild-type, constitutively active, and kinase-defective protein kinase C-lambda on insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes: *Endocrinology*, v. 141, no. 11, p. 4120-4127.

Bandyopadhyay, G., M. P. Sajan, AND. Kanoh, M. L. Styært, M. J. Quon, R. Lea-Currie, A. Sen, and R. V. Farese, 2002, PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 87, no. 2, p. 716-723.

Barbour, L. A., J. Shao, L. Qiao, W. Leitner, M. Yerson, J. E. Friedman, and B. Draznin, 2004, Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle: *Endocrinology*, v. 145, no. 3, p. 1144-1150.

Barja, G., 2002, Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction: *Ageing Res.Rev.*, v. 1, no. 3, p. 397-411.

Barker, D. J., 1999a, The fetal origins of type 2 diabetes mellitus: *Ann.Intern.Med.*, v. 130, no. 4 Pt 1, p. 322-324.

Barker, D. J., 1999b, Fetal origins of cardiovascular disease: *Ann.Med.*, v. 31 Suppl 1, p. 3-6.

Barker, D. J., P. D. Gluckman, K. M. Godfrey, J. E. Harding, J. A. Owens, and J. S. Robinson, 1993, Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life: *Lancet*, v. 341, no. 8850, p. 938-941.



Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh, and M. E. Wadsworth, 1989, Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease: *BMJ*, v. 298, no. 6673, p. 564-567.

Barthel, A., and D. Schmolz, 2003, Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 285, no. 4, p. E685-E692.

Beauloye, C., A. S. Marsin, L. Bertry, U. Krause, D. G. Hardie, J. L. Vanovershelde, and L. Hue, 2001, Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides: *FEBS Lett.*, v. 505, no. 3, p. 348-352.

Becker, C., L. Sevilla, E. Tomas, M. Palacín, A. Zorzano, and AND. Fischer, 2001, The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes: *Endocrinology*, v. 142, no. 12, p. 5267-5276.

Beeson, M. et al., 2003, Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)<sub>3</sub> is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise: *Diabetes*, v. 52, no. 8, p. 1926-1934.

Bento, J. L., N. D. Palmer, J. C. Mychaleckyj, L. A. Lange, C. D. Langefeld, S. S. Rich, B. I. Freedman, and D. W. Bowden, 2004, Association of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Gene Polymorphisms With Type 2 Diabetes: *Diabetes*, v. 53, no. 11, p. 3007-3012.

Bergemann, C., C. Loken, C. Becker, B. Graf, M. Hamidzadeh, and AND. Fischer, 2001, Inhibition of glucose transport by cyclic GMP in cardiomyocytes: *Life Sci.*, v. 69, no. 12, p. 1391-1406.

Beugnet, A., A. R. Tee, P. M. Taylor, and C. G. Proud, 2003, Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability: *Biochem.J.*, v. 372, no. Pt 2, p. 555-566.

Biondi, R. M., and A. R. Nebreda, 2003, Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions: *Biochem.J.*, v. 372, no. Pt 1, p. 1-13.

Bleyle, L. A., AND. Peng, C. Ellis, and R. A. Mooney, 1999, Dissociation of PTPase levels from their modulation of insulin receptor signal transduction: *Cell Signal.*, v. 11, no. 10, p. 719-725.

Blondeau, B., A. Garofano, P. Czernichow, and B. Breant, 1999, Age-dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat: *Endocrinology*, v. 140, no. 9, p. 4208-4213.

Bode, D. C., J. R. Kanter, and L. L. Brunton, 1991, Cellular distribution of phosphodiesterase isoforms in rat cardiac tissue: *Circ.Res.*, v. 68, no. 4, p. 1070-1079.

Bollag, G. E., R. A. Roth, J. Beaudoin, D. Mochly-Rosen, and D. E. Koshly, Jr., 1986, Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 83, no. 16, p. 5822-5824.

Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans, 1998, Specific features of glycogen metabolism in the liver: *Biochem.J.*, v. 336 ( Pt 1), p. 19-31.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal.Biochem.*, v. 72, p. 248-254.

Brady, M. J., J. E. Pessin, and A. R. Saltiel, 1999, Spatial Compartmentalization in the Regulation of Glucose Metabolism by Insulin: *Trends Endocrinol.Metab.*, v. 10, no. 10, p. 408-413.

Braiman, L., A. Alt, T. Kuroki, M. Ohba, A. Bak, T. Tennenbaum, and S. R. Sampson, 2001, Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle: *Mol.Cell Biol.*, v. 21, no. 22, p. 7852-7861.

Braiman, L., A. Alt, T. Kuroki, M. Ohba, A. Bak, T. Tennenbaum, and S. R. Sampson, 1999a, Protein kinase Cdelta mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle: *Mol.Endocrinol.*, v. 13, no. 12, p. 2002-2012.

Braiman, L., L. Sheffi-Friedman, A. Bak, T. Tennenbaum, and S. R. Sampson, 1999b, Tyrosine phosphorylation of specific protein kinase C isoenzymes

participates in insulin stimulation of glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle: *Diabetes*, v. 48, no. 10, p. 1922-1929.

Brichard, S. M., J. C. Henquin, and J. Girard, 1993, Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism: *Diabetologia*, v. 36, no. 4, p. 292-298.

Brodbeck, D., P. Cron, and B. A. Hemmings, 1999, A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 14, p. 9133-9136.

Brodbeck, D., M. M. Hill, and B. A. Hemmings, 2001, Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 31, p. 29550-29558.

Brosius, F. C., III, N. Nguyen, S. Egert, Z. Lin, G. M. Deeb, F. Haas, M. Schwaiger, and D. Sun, 1997, Increased sarcolemmal glucose transporter abundance in myocardial ischemia: *Am.J.Cardiol.*, v. 80, no. 3A, p. 77A-84A.

Brown-Shimer, S., K. A. Johnson, J. B. Lawrence, C. Johnson, A. Bruskin, N. R. Green, and D. E. Hill, 1990, Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 87, no. 13, p. 5148-5152.

Burcelin, R., M. Eddouks, J. Kye, R. Assan, and J. Girard, 1992, Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats: *Biochem.J.*, v. 288 ( Pt 2), p. 675-679.

Burgering, B. M., and P. J. Coffey, 1995, Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction: *Nature*, v. 376, no. 6541, p. 599-602.

Burnol, A. F., A. Leturque, P. Ferré, J. Kye, and J. Girard, 1986, Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats: *Am.J.Physiol.*, v. 251, no. 5 Pt 1, p. E537-E541.

Butler, M., R. A. McKay, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, D. Witchell, S. F. Murray, N. M. Dean, S. Bhanot, and B. P. Monia, 2002, Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice: *Diabetes*, v. 51, no. 4, p. 1028-1034.

Calera, M. R., G. Vallega, and P. F. Pilch, 2000, Dynamics of protein-tyrosine phosphatases in rat adipocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 9, p. 6308-6312.

Campbell, C. S., L. C. Caperuto, A. E. Hirata, E. P. Araujo, L. A. Velloso, M. J. Saad, and C. R. Carvalho, 2004, The phosphatidylinositol/AKT/atypical PKC pathway is involved in the improved insulin sensitivity by DHEA in muscle and liver of rats in vivo: *Life Sci.*, v. 76, no. 1, p. 57-70.

Cantley, L. C., 2002, The phosphoinositide 3-kinase pathway: *Science*, v. 296, no. 5573, p. 1655-1657.

Cantó, C. et al., 2004, Neuregulin signaling on glucose transport in muscle cells: *J.Biol.Chem.*

Cartee, G. D., and D. J. Dean, 1994, Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles: *Am.J.Physiol*, v. 266, no. 6 Pt 1, p. E946-E952.

Castelló, A., J. Cadefau, R. Cusso, X. Testar, J. E. Hesketh, M. Palacín, and A. Zorzano, 1993, GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 20, p. 14998-15003.

Castelló, A., A. Gumá, L. Sevilla, M. Furriols, X. Testar, M. Palacín, and A. Zorzano, 1995, Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes: *Biochem.J.*, v. 309 ( Pt 1), p. 271-277.

Charbonneau, H., N. K. Tonks, S. Kumar, C. D. Diltz, M. Harrylock, D. E. Cool, E. G. Krebs, E. H. Fischer, and K. A. Walsh, 1989, Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 86, no. 14, p. 5252-5256.

Cheatham, B., and C. R. Kahn, 1995, Insulin action and the insulin signaling network: *Endocr.Rev.*, v. 16, no. 2, p. 117-142.

Chen, H., S. J. Wertheimer, C. H. Lin, S. L. Katz, K. E. Amrein, P. Burn, and M. J. Quon, 1997, Protein-tyrosine phosphatases PTP1B and syp are modulators of insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 12, p. 8026-8031.

Chen, J., and AND. Fang, 2002, A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling: *Biochem.Pharmacol.*, v. 64, no. 7, p. 1071-1077.

Cheng, A., N. Dube, F. Gu, and M. L. Tremblay, 2002, Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction: *Eur.J.Biochem.*, v. 269, no. 4, p. 1050-1059.

Chiang, S. H., C. A. Baumann, M. Kanzaki, D. C. Thurmond, R. T. Watson, C. L. Neudauer, I. G. Macara, J. E. Pessin, and A. R. Saltiel, 2001, Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10: *Nature*, v. 410, no. 6831, p. 944-948.

Chin, J. E., M. Dickens, J. M. Tavaré, and R. A. Roth, 1993, Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 9, p. 6338-6347.

Cho, H. et al., 2001a, Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta): *Science*, v. 292, no. 5522, p. 1728-1731.

Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, and M. J. Birnbaum, 2001b, Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 42, p. 38349-38352.

Cho, K. J., H. Moini, H. K. Shon, A. S. Chung, and L. Packer, 2003, Alpha-lipoic acid decreases thiol reactivity of the insulin receptor and protein tyrosine phosphatase 1B in 3T3-L1 adipocytes: *Biochem.Pharmacol.*, v. 66, no. 5, p. 849-858.

Chomczynski, P., and N. Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: *Anal.Biochem.*, v. 162, no. 1, p. 156-159.

Ciaraldi, T. P., R. Horuk, and S. Matthaei, 1986, Biochemical and functional characterization of the rat liver glucose-transport system. Comparisons with the adipocyte glucose-transport system: *Biochem.J.*, v. 240, no. 1, p. 115-123.

Cicogna, A. C., C. R. Padovani, K. Okoshi, F. F. Aragon, and M. P. Okoshi, 2000, Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle: *Am.J.Med.Sci.*, v. 320, no. 4, p. 244-248.

Clark, S. F., J. C. Molero, and D. E. James, 2000, Release of insulin receptor substrate proteins from an intracellular complex coincides with the development of insulin resistance: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 6, p. 3819-3826.

Coffer, P. J., and J. R. Woodgett, 1991, Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families: *Eur.J.Biochem.*, v. 201, no. 2, p. 475-481.

Cohen, A. W., B. Razani, X. B. Wang, T. P. Combs, T. M. Williams, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti, 2003, Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue: *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 285, no. 1, p. C222-C235.

Cohen, P., D. R. Alessi, and D. A. Cross, 1997, PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction?: *FEBS Lett.*, v. 410, no. 1, p. 3-10.

Corish, C. A., P. Flood, S. Mulligan, and N. P. Kennedy, 2000, Apparent low frequency of undernutrition in Dublin hospital in-patients: should we review the anthropometric thresholds for clinical practice?: *Br.J.Nutr.*, v. 84, no. 3, p. 325-335.

Cormont, M., J. F. Tanti, A. Zahraoui, E. Van Obberghen, A. Tavitian, and AND. Marchy-Brustel, 1993, Insulin and okadaic acid induce Rab4 redistribution in adipocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 26, p. 19491-19497.

Craparo, A., T. J. O'Neill, and T. A. Gustafson, 1995, Non-SH2 domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor: *J.Biol.Chem.*, v. 270, no. 26, p. 15639-15643.

Crnic, L. S., 1980, Models of infantile malnutrition in rats: effects on maternal behavior: *Dev.Psychobiol.*, v. 13, no. 6, p. 615-628.

Crnic, L. S., and H. P. Chase, 1978, Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk: *J.Nutr.*, v. 108, no. 11, p. 1755-1760.

Cross, D. A., P. W. Watt, M. Shaw, K. J. van der, C. P. Downes, J. C. Holder, and P. Cohen, 1997, Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue: *FEBS Lett.*, v. 406, no. 1-2, p. 211-215.

Cusi, K., K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M. E. Patti, T. Pratipanawatr, R. A. DeFronzo, C. R. Kahn, and L. J. Myarino, 2000, Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle: *J.Clin.Invest.*, v. 105, no. 3, p. 311-320.

Czech, M. P., and S. Corvera, 1999, Signaling mechanisms that regulate glucose transport: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 4, p. 1865-1868.

Czech, M. P., J. C. Lawrence, Jr., and W. S. Lynn, 1974, Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 71, no. 10, p. 4173-4177.

Dadke, S., J. Kusari, and J. Chernoff, 2000a, Down-regulation of insulin signaling by protein-tyrosine phosphatase 1B is mediated by an N-terminal binding region: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 31, p. 23642-23647.

Dadke, S. S., H. C. Li, A. B. Kusari, N. Begum, and J. Kusari, 2000b, Elevated expression and activity of protein-tyrosine phosphatase 1B in skeletal muscle of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 274, no. 3, p. 583-589.

Dahri, S., A. Snoeck, B. Reusens-Billen, C. Remacle, and J. J. Hoet, 1991, Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation: *Diabetes*, v. 40 Suppl 2, p. 115-120.

Dardevet, D., M. Manin, M. Balage, C. Sornet, and J. Grizard, 1991, Influence of low- and high-protein diets on insulin and insulin-like growth factor-1 binding to skeletal muscle and liver in the growing rat: *Br.J.Nutr.*, v. 65, no. 1, p. 47-60.

Davidson, R. T., E. B. Arias, and G. D. Cartee, 2002, Calorie restriction increases muscle insulin action but not IRS-1-, IRS-2-, or phosphotyrosine-PI 3-kinase: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*, v. 282, no. 2, p. E270-E276.

Davis, T. A., M. L. Fiorotto, H. V. Nguyen, D. G. Burrin, and P. J. Reeds, 1991, Response of muscle protein synthesis to fasting in suckling and weaned rats: *Am.J.Physiol*, v. 261, no. 6 Pt 2, p. R1373-R1380.

Davis, T. A., M. L. Fiorotto, H. V. Nguyen, and P. J. Reeds, 1993, Enhanced response of muscle protein synthesis and plasma insulin to food intake in suckled rats: *Am.J.Physiol*, v. 265, no. 2 Pt 2, p. R334-R340.

Dawson, P. A., J. C. Mychaleckyj, S. C. Fossey, S. J. Mihic, A. L. Craddock, and D. W. Bowden, 2001, Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1: *Mol.Genet.Metab*, v. 74, no. 1-2, p. 186-199.

Dean, D. J., J. T. Brozinick, Jr., S. W. Cushman, and G. D. Cartee, 1998, Calorie restriction increases cell surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle: *Am.J.Physiol*, v. 275, no. 6 Pt 1, p. E957-E964.

Dean, D. J., and G. D. Cartee, 2000, Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle: *Acta Physiol Scy.*, v. 169, no. 2, p. 133-139.

DeFronzo, R. A., E. Ferrannini, AND. Sato, P. Felig, and J. Wahren, 1981, Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake: *J.Clin.Invest*, v. 68, no. 6, p. 1468-1474.

DeFronzo, R. A., J. D. Tobin, and R. Yres, 1979, Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance: *Am.J.Physiol*, v. 237, no. 3, p. E214-E223.

Dennis, P. B., N. Pullen, R. B. Pearson, S. C. Kozma, and G. Thomas, 1998, Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 24, p. 14845-14852.

Dickens, M., C. A. Svitek, A. A. Culbert, R. M. O'Brien, and J. M. Tavaré, 1998, Central role for phosphatidylinositide 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 32, p. 20144-20149.

Dobbing, J., 1970, Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem: *Am.J.Dis.Child*, v. 120, no. 5, p. 411-415.



Doege, H., A. Bocianski, H. G. Joost, and A. Schurmann, 2000a, Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes: *Biochem.J.*, v. 350 Pt 3, p. 771-776.

Doege, H., A. Bocianski, A. Scheepers, H. Axer, J. Eckel, H. G. Joost, and A. Schurmann, 2001, Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle: *Biochem.J.*, v. 359, no. Pt 2, p. 443-449.

Doege, H., A. Schurmann, G. Bahrenberg, A. Brauers, and H. G. Joost, 2000b, GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 21, p. 16275-16280.

Dollet, J. M., B. Beck, C. Villaume, J. P. Max, and G. Debry, 1985, Progressive adaptation of the endocrine pancreas during long-term protein deficiency in rats: effects on blood glucose homeostasis and on pancreatic insulin, glucagon and somatostatin concentrations: *J.Nutr.*, v. 115, no. 12, p. 1581-1588.

Dombrowski, L., D. Roy, B. Marcotte, and A. Marette, 1996, A new procedure for the isolation of plasma membranes, T tubules, and internal membranes from skeletal muscle: *Am.J.Physiol.*, v. 270, no. 4 Pt 1, p. E667-E676.

Donnelly, R., M. J. Reed, S. Azhar, and G. M. Reaven, 1994, Expression of the major isoenzyme of protein kinase-C in skeletal muscle, nPKC theta, varies with muscle type and in response to fructose-induced insulin resistance: *Endocrinology*, v. 135, no. 6, p. 2369-2374.

Doornbos, R. P., M. Theelen, P. C. van der Hoeven, W. J. van Blitterswijk, A. J. Verkleij, and van Bergen en Henegouwen PM, 1999, Protein kinase Czeta is a negative regulator of protein kinase B activity: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 13, p. 8589-8596.

Doria-Medina, C. L., D. D. Lund, A. Pasley, A. Syra, and W. I. Sivitz, 1993, Immunolocalization of GLUT-1 glucose transporter in rat skeletal muscle and in normal and hypoxic cardiac tissue: *Am.J.Physiol.*, v. 265, no. 3 Pt 1, p. E454-E464.

Ducluzeau, P. H., L. M. Fletcher, H. Vidal, M. Laville, and J. M. Tavaré, 2002, Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes: *Diabetes Metab.*, v. 28, no. 2, p. 85-92.

Egawa, K. et al., 2001, Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in 16 myocytes and Fao hepatoma cells: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 13, p. 10207-10211.

Elchebly, M. et al., 1999, Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene: *Science*, v. 283, no. 5407, p. 1544-1548.

Eldar-Finkelman, H., 2002, Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target: *Trends Mol.Med.*, v. 8, no. 3, p. 126-132.

Eldar-Finkelman, H., S. A. Schreyer, M. M. Shinohara, R. C. LeBoeuf, and E. G. Krebs, 1999, Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice: *Diabetes*, v. 48, no. 8, p. 1662-1666.

Embi, N., D. B. Rylatt, and P. Cohen, 1980, Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase: *Eur.J.Biochem.*, v. 107, no. 2, p. 519-527.

Enoksson, S., E. Degerman, E. Hagstrom-Toft, V. Large, and P. Arner, 1998, Various phosphodiesterase subtypes mediate the in vivo antilipolytic effect of insulin on adipose tissue and skeletal muscle in man: *Diabetologia*, v. 41, no. 5, p. 560-568.

Escrivá, F., C. Rodríguez, J. Cacho, C. Alvarez, B. Portha, and A. M. Pascual-Leone, 1992, Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction: *Am.J.Physiol*, v. 263, no. 1 Pt 1, p. E1-E7.

Escrivá, F., C. Rodríguez, and A. M. Pascual-Leone, 1985, Glycemia, ketonemia, and brain enzymes of ketone body utilization in suckling and adult rats undernourished from intrauterine life: *J.Neurochem.*, v. 44, no. 5, p. 1358-1362.

Espanel, X., S. Walchli, R. P. Gobert, M. El Alama, M. L. Curchod, N. Gullu-Isler, and R. H. Van Huijsduijnen, 2001, Pulling strings below the surface: hormone receptor signaling through inhibition of protein tyrosine phosphatases: *Endocrine.*, v. 15, no. 1, p. 19-28.

Etgen, G. J., Jr., J. Jensen, C. M. Wilson, D. G. Hunt, S. W. Cushman, and J. L. Ivy, 1997, Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced

recruitment of GLUT-4 to the cell surface: *Am.J.Physiol*, v. 272, no. 5 Pt 1, p. E864-E869.

Fantin, V. R., B. E. Lavan, Q. Wang, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copely, S. R. Keller, and G. E. Lienhard, 1999, Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene: *Endocrinology*, v. 140, no. 3, p. 1329-1337.

Farese, R. V., 2002, Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 283, no. 1, p. E1-11.

Ferrannini, E., D. C. Simonson, L. D. Katz, G. Reichard, Jr., S. Bevilacqua, E. J. Barrett, M. Olsson, and R. A. DeFronzo, 1988, The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes: *Metabolism*, v. 37, no. 1, p. 79-85.

Ferré, P., D. Perdereau, A. Leturque, T. Issad, C. Postic, C. Coupé, and J. Girard, 1990, Adaptations of glucose metabolism in white-fat adipocytes at weaning in the rat are concomitant with specific gene expression: *Biochem.Soc.Trans.*, v. 18, no. 5, p. 857-858.

Fickova, M., and L. Macho, 1983, The lipogenic effect of insulin on glucose metabolism in isolated adipocytes of rats with different neonatal nutrition: *Horm.Metab Res.*, v. 15, no. 7, p. 354-355.

Finkel, T., 2000, Redox-dependent signal transduction: *FEBS Lett.*, v. 476, no. 1-2, p. 52-54.

Fischer, AND., J. Thomas, G. D. Holman, H. Rose, and H. Kammermeier, 1996, Contraction-independent effects of catecholamines on glucose transport in isolated rat cardiomyocytes: *Am.J.Physiol*, v. 270, no. 4 Pt 1, p. C1204-C1210.

Fischer, AND. et al., 1997, Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 11, p. 7085-7092.

Fiske, C.H. and SubbaRow Y, 1925, The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375.

Fowden, A. L., and D. J. Hill, 2001, Intra-uterine programming of the endocrine pancreas: *Br.Med.Bull.*, v. 60, p. 123-142.

Frangioni, J. V., P. H. Beahm, V. Shifrin, C. A. Jost, and B. G. Neel, 1992, The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence: *Cell*, v. 68, no. 3, p. 545-560.

Freychet, P., J. Roth, and D. M. Neville, Jr., 1971, Insulin receptors in the liver: specific binding of (<sup>125</sup>I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 68, no. 8, p. 1833-1837.

Fruman, D. A., F. Mauvais-Jarvis, D. A. Pollard, C. M. Yballe, D. Brazil, R. T. Bronson, C. R. Kahn, and L. C. Cantley, 2000, Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha: *Nat.Genet.*, v. 26, no. 3, p. 379-382.

Furtado, L. M., R. Somwar, G. Sweeney, W. Niu, and A. Klip, 2002, Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin: *Biochem.Cell Biol.*, v. 80, no. 5, p. 569-578.

Garofano, A., P. Czernichow, and B. Breant, 1999, Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period: *Diabetologia*, v. 42, no. 6, p. 711-718.

Gavete, M. L., M. Agote, M. A. Martín, C. Alvarez, and F. Escrivá, 2002, Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart: *Endocrinology*, v. 143, no. 11, p. 4295-4303.

Gazdag, A. C., C. L. Dumke, C. R. Kahn, and G. D. Cartee, 1999, Calorie restriction increases insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle from IRS-1 knockout mice: *Diabetes*, v. 48, no. 10, p. 1930-1936.

Gazdag, A. C., S. Sullivan, J. W. Kemnitz, and G. D. Cartee, 2000, Effect of long-term caloric restriction on GLUT4, phosphatidylinositol-3 kinase p85 subunit, and insulin receptor substrate-1 protein levels in rhesus monkey skeletal muscle: *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.*, v. 55, no. 1, p. B44-B46.

Gill, G. N., 2002, A pit stop at the ER: *Science*, v. 295, no. 5560, p. 1654-1655.

Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg, 1999, eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation: *Annu.Rev.Biochem.*, v. 68, p. 913-963.

Girard, J., P. Ferré, J. P. Pégorier, and P. H. Duée, 1992, Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition: *Physiol Rev.*, v. 72, no. 2, p. 507-562.

Goldstein, B. J., A. Bittner-Kowalczyk, M. F. White, and M. Harbeck, 2000, Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 6, p. 4283-4289.

Gosby, A. K., C. A. Maloney, J. L. Phuyal, G. S. Denyer, J. M. Bryson, and I. D. Caterson, 2003, Maternal protein restriction increases hepatic glycogen storage in young rats: *Pediatr.Res.*, v. 54, no. 3, p. 413-418.

Gould, G. W., and G. D. Holman, 1993, The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression: *Biochem.J.*, v. 295 ( Pt 2), p. 329-341.

Gray, I. P., K. Siddle, B. H. Frank, and C. N. Hales, 1987, Characterization and use in immunoradiometric assay of monoclonal antibodies directed against human proinsulin: *Diabetes*, v. 36, no. 6, p. 684-688.

Gredilla, R., S. Phaneuf, C. Selman, S. Kendaiah, C. Leeuwenburgh, and G. Barja, 2004, Short-term caloric restriction and sites of oxygen radical generation in kidney and skeletal muscle mitochondria: *Ann.N.AND.Acad.Sci.*, v. 1019, p. 333-342.

Greene, M. W., and R. S. Garofalo, 2002, Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation: *Biochemistry*, v. 41, no. 22, p. 7082-7091.

Grover-McKay, M., S. A. Walsh, and S. A. Thompson, 1999, Glucose transporter 3 (GLUT3) protein is present in human myocardium: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1416, no. 1-2, p. 145-154.

Gum, R. J. et al., 2003, Antisense Protein Tyrosine Phosphatase 1B Reverses Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Liver of ob/ob Mice: *Mol.Endocrinol.*, v. 17, no. 6, p. 1131-1143.

Gumá, A., J. R. Zierath, H. Wallberg-Henriksson, and A. Klip, 1995, Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle: *Am.J.Physiol.*, v. 268, no. 4 Pt 1, p. E613-E622.

Hacker, H. J., B. Thorens, and R. Grobholz, 1991, Expression of facilitative glucose transporter in rat liver and choroid plexus. A histochemical study in native cryostat sections: *Histochemistry*, v. 96, no. 5, p. 435-439.

Hah, J. S., J. Ryu, W. Lee, C. AND. Jung, and M. Lachaal, 2002, The hepatocyte glucose-6-phosphatase subcomponent T3: its relationship to GLUT2: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1564, no. 1, p. 198-206.

Haj, F. G., P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, and P. I. Bastiaens, 2002, Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum: *Science*, v. 295, no. 5560, p. 1708-1711.

Hales, C. N., and D. J. Barker, 2001, The thrifty phenotype hypothesis: *Br.Med.Bull.*, v. 60, p. 5-20.

Hales, C. N., and D. J. Barker, 1992, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis: *Diabetologia*, v. 35, no. 7, p. 595-601.

Hales, C. N., D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond, and P. D. Winter, 1991, Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64: *BMJ*, v. 303, no. 6809, p. 1019-1022.

Hyberg, A., L. Kayser, P. E. Hoyer, and J. Vinten, 1992, A substantial part of GLUT-1 in crude membranes from muscle originates from perineurial sheaths: *Am.J.Physiol.*, v. 262, no. 5 Pt 1, p. E721-E727.

Hansen, P. A., L. A. Nolte, M. M. Chen, and J. O. Holloszy, 1998, Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise: *J.Appl.Physiol.*, v. 85, no. 4, p. 1218-1222.

Haruta, T., T. Uno, J. Kawahara, A. Takano, K. Egawa, P. M. Sharma, J. M. Olefsky, and M. Kobayashi, 2000, A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1: *Mol.Endocrinol.*, v. 14, no. 6, p. 783-794.

Heller-Harrison, R. A., M. Morin, A. Guilherme, and M. P. Czech, 1996, Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles: *J.Biol.Chem.*, v. 271, no. 17, p. 10200-10204.

Heywood, W. E., N. Mian, P. J. Milla, and K. J. Lindley, 2004, Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods: *Clin.Sci.(Lond)*, v. 107, no. 1, p. 37-45.

Hidaka, S. et al., 2002, Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats: *FASEB J.*, v. 16, no. 6, p. 509-518.

Higaki, AND., J. F. Wojtaszewski, M. F. Hirshman, D. J. Withers, H. Towery, M. F. White, and L. J. Goodyear, 1999, Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 30, p. 20791-20795.

Hirai, T., and K. Chida, 2003, Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions: *J.Biochem.(Tokyo)*, v. 133, no. 1, p. 1-7.

Hirata, A. E., F. Alvarez-Rojas, J. B. Carvalheira, C. R. Carvalho, M. S. Dolnikoff, and M. J. Abdalla Saad, 2003, Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats: *Life Sci.*, v. 73, no. 11, p. 1369-1381.

Holemans, K., R. Gerber, K. Meurrens, F. De Clerck, L. Poston, and F. A. Van Assche, 1999, Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring: *Br.J.Nutr.*, v. 81, no. 1, p. 73-79.

Holness, M. J., M. L. Langdown, and M. C. Sugden, 2000, Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus: *Biochem.J.*, v. 349 Pt 3, p. 657-665.

Howlett, K. F., K. Sakamoto, M. F. Hirshman, W. G. Aschenbach, M. Dow, M. F. White, and L. J. Goodyear, 2002, Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice: *Diabetes*, v. 51, no. 2, p. 479-483.

Huang, C., R. Somwar, N. Patel, W. Niu, D. Torok, and A. Klip, 2002, Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity: *Diabetes*, v. 51, no. 7, p. 2090-2098.

Ibberson, M., M. Uldry, and B. Thorens, 2000, GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 7, p. 4607-4612.

Idris, I., S. Gray, and R. Donnelly, 2002, Insulin action in skeletal muscle: isozyme-specific effects of protein kinase C: *Ann.N.AND.Acad.Sci.*, v. 967, p. 176-182.

Inoue, M., L. Chang, J. Hwang, S. H. Chiang, and A. R. Saltiel, 2003, The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin: *Nature*, v. 422, no. 6932, p. 629-633.

Inukai, K. et al., 1997, p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 12, p. 7873-7882.

Issad, T., C. Coupé, M. Pastor-Anglada, P. Ferré, and J. Girard, 1988, Development of insulin-sensitivity at weaning in the rat. Role of the nutritional transition: *Biochem.J.*, v. 251, no. 3, p. 685-690.

Jaquet, D., H. Vidal, R. Hankard, P. Czernichow, and C. Levy-Marchal, 2001, Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 86, no. 7, p. 3266-3271.

Jeness, R., 1974, Proceedings: Biosynthesis and composition of milk: *J.Invest Dermatol.*, v. 63, no. 1, p. 109-118.

Johnston, A. M., L. Pirola, and E. Van Obberghen, 2003, Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling: *FEBS Lett.*, v. 546, no. 1, p. 32-36.

Jones, P. F., T. Jakubowicz, F. J. Pitossi, F. Maurer, and B. A. Hemmings, 1991, Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the



second-messenger subfamily: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 88, no. 10, p. 4171-4175.

Joost, H. G., and B. Thorens, 2001, The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review): *Mol.Membr.Biol.*, v. 18, no. 4, p. 247-256.

Jullien, D., J. F. Tanti, S. J. Heydrick, N. Gautier, T. Gremeaux, E. Van Obberghen, and AND. Marchy-Brustel, 1993, Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity: *J.Biol.Chem.*, v. 268, no. 20, p. 15246-15251.

Kyel, E. S., and N. Hay, 1999, The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB: *Exp.Cell Res.*, v. 253, no. 1, p. 210-229.

Kanoh, AND., G. Bandyopadhyay, M. P. Sajan, M. L. Styart, and R. V. Farese, 2000, Thiazolidinedione treatment enhances insulin effects on protein kinase C-zeta /lambda activation and glucose transport in adipocytes of nondiabetic and Goto-Kakizaki type II diabetic rats: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 22, p. 16690-16696.

Kanoh, AND., M. P. Sajan, G. Bandyopadhyay, A. Miura, M. L. Styart, and R. V. Farese, 2003, Defective activation of atypical protein kinase C zeta and lambda by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> in skeletal muscle of rats following high-fat feeding and streptozotocin-induced diabetes: *Endocrinology*, v. 144, no. 3, p. 947-954.

Karlsson, H. K., P. A. Nilsson, J. Nilsson, A. V. Chibalin, J. R. Zierath, and E. Blomstry, 2004, Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 287, no. 1, p. E1-E7.

Katsumata, M., K. A. Burton, J. Li, and M. J. Dauncey, 1999, Suboptimal energy balance selectively up-regulates muscle GLUT gene expression but reduces insulin-dependent glucose uptake during postnatal development: *FASEB J.*, v. 13, no. 11, p. 1405-1413.

Kawazoe, AND. et al., 2001, Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin

receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation: *J.Exp.Med.*, v. 193, no. 2, p. 263-269.

Keith, C. T., and S. L. Schreiber, 1995, PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints: *Science*, v. 270, no. 5233, p. 50-51.

Kessler, A., I. Uphues, D. M. Ouwens, M. Till, and J. Eckel, 2001, Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 280, no. 1, p. E65-E74.

Kido, AND., J. Nakae, and D. Accili, 2001, Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 86, no. 3, p. 972-979.

Kim, AND. B., T. P. Ciaraldi, A. Kong, D. Kim, N. Chu, P. Mohideen, S. Mudaliar, R. R. Henry, and B. B. Kahn, 2002, Troglitazone but not metformin restores insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity and increases p110beta protein levels in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects: *Diabetes*, v. 51, no. 2, p. 443-448.

Kimball, S. R., P. A. Farrell, and L. S. Jefferson, 2002, Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise: *J.Appl.Physiol*, v. 93, no. 3, p. 1168-1180.

KIPNIS, D. M., and C. F. CORI, 1959, Studies of tissue permeability. V. The penetration and phosphorylation of 2-deoxyglucose in the rat diaphragm: *J.Biol.Chem.*, v. 234, no. 1, p. 171-177.

Kirwan, J. P., and L. F. del Aguila, 2003, Insulin signalling, exercise and cellular integrity: *Biochem.Soc.Trans.*, v. 31, no. Pt 6, p. 1281-1285.

Kirwan, J. P., A. Varastehpour, M. Jing, L. Presley, J. Shao, J. E. Friedman, and P. M. Catalano, 2004, Reversal of insulin resistance postpartum is linked to enhanced skeletal muscle insulin signaling: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 89, no. 9, p. 4678-4684.

Klaman, L. D. et al., 2000, Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice: *Mol.Cell Biol.*, v. 20, no. 15, p. 5479-5489.

Klip, A., T. Tsakiridis, A. Marette, and P. A. Ortiz, 1994, Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures: *FASEB J.*, v. 8, no. 1, p. 43-53.

Koistinen, H. A., A. V. Chibalin, and J. R. Zierath, 2003, Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients: *Diabetologia*, v. 46, no. 10, p. 1324-1328.

Koivisto, U. M., H. Martínez-Valdez, P. J. Bilan, E. Burdett, T. Ramlal, and A. Klip, 1991, Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture: *J.Biol.Chem.*, v. 266, no. 4, p. 2615-2621.

Kraegen, E. W., J. A. Sowden, M. B. Halstead, P. W. Clark, K. J. Rodnick, D. J. Chisholm, and D. E. James, 1993, Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4: *Biochem.J.*, v. 295 ( Pt 1), p. 287-293.

Kraft, A. S., and W. B. Yerson, 1983, Phorbol esters increase the amount of Ca<sup>2+</sup>, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane: *Nature*, v. 301, no. 5901, p. 621-623.

Krebs, D. L., and D. J. Hilton, 2001, SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling: *Stem Cells*, v. 19, no. 5, p. 378-387.

Kubota, N. et al., 2000, Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia: *Diabetes*, v. 49, no. 11, p. 1880-1889.

Kusari, J., K. A. Kenner, K. I. Suh, D. E. Hill, and R. R. Henry, 1994, Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance: *J.Clin.Invest*, v. 93, no. 3, p. 1156-1162.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: *Nature*, v. 227, no. 259, p. 680-685.

Lavan, B. E., W. S. Lane, and G. E. Lienhard, 1997, The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 17, p. 11439-11443.

Lawrence, J. C., Jr., P. Fadden, T. A. Haystead, and T. A. Lin, 1997, PHAS proteins as mediators of the actions of insulin, growth factors and cAMP on protein synthesis and cell proliferation: *Adv.Enzyme Regul.*, v. 37, p. 239-267.

Laybutt, D. R., A. L. Thompson, G. J. Cooney, and E. W. Kraegen, 1997, Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo: *Am.J.Physiol.*, v. 273, no. 3 Pt 2, p. H1309-H1316.

Le Good, J. A., W. H. Ziegler, D. B. Parekh, D. R. Alessi, P. Cohen, and P. J. Parker, 1998, Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1: *Science*, v. 281, no. 5385, p. 2042-2045.

Leitges, M., M. Plomann, M. L. Styart, G. Bandyopadhyay, M. P. Sajan, AND. Kanoh, and R. V. Farese, 2002, Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K: *Mol.Endocrinol.*, v. 16, no. 4, p. 847-858.

Leslie, N. R., and C. P. Downes, 2002, PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling: *Cell Signal.*, v. 14, no. 4, p. 285-295.

Leturque, A., P. Ferré, A. F. Burnol, J. Kye, P. Maulard, and J. Girard, 1986, Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats: *Diabetes*, v. 35, no. 2, p. 172-177.

Li, J., J. C. Saunders, A. L. Fowden, M. J. Dauncey, and R. S. Gilmour, 1998, Transcriptional regulation of insulin-like growth factor-II gene expression by cortisol in fetal sheep during late gestation: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 17, p. 10586-10593.

Lietzke, S. E., S. Bose, T. Cronin, J. Klarlund, A. Chawla, M. P. Czech, and D. G. Lambright, 2000, Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains: *Mol.Cell*, v. 6, no. 2, p. 385-394.

Lim, M. A., C. K. Kikani, M. J. Wick, and L. Q. Dong, 2003, Nuclear translocation of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK-1): A potential regulatory mechanism for PDK-1 function: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

Lisinski, I., A. Schurmann, H. G. Joost, S. W. Cushman, and H. Al-Hasani, 2001, Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells: *Biochem.J.*, v. 358, no. Pt 2, p. 517-522.

Litherly, G. J., E. Hajduch, and H. S. Hundal, 2001, Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review): *Mol.Membr.Biol.*, v. 18, no. 3, p. 195-204.

Liu, S. C., Q. Wang, G. E. Lienhard, and S. R. Keller, 1999, Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis: *J.Biol.Chem.*, v. 274, no. 25, p. 18093-18099.

Liu, Z., AND. Wu, E. W. Nicklas, L. A. Jahn, W. J. Price, and E. J. Barrett, 2004, Unlike insulin, amino acids stimulate p70S6K but not GSK-3 or glycogen synthase in human skeletal muscle: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 286, no. 4, p. E523-E528.

Lochhead, P. A., M. Coghlan, S. Q. Rice, and C. Sutherly, 2001, Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression: *Diabetes*, v. 50, no. 5, p. 937-946.

Lu, AND. et al., 2003, Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 41, p. 40057-40066.

Lund, S., P. R. Pryor, S. Ostergaard, O. Schmitz, O. Pedersen, and G. D. Holman, 1998, Evidence against protein kinase B as a mediator of contraction-induced glucose transport and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle: *FEBS Lett.*, v. 425, no. 3, p. 472-474.

MacFarlane, W. M., M. L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, and K. Docherty, 1994, Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner: *Biochem.J.*, v. 303 ( Pt 2), p. 625-631.

Maehama, T., and J. E. Dixon, 1999, PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase: *Trends Cell Biol.*, v. 9, no. 4, p. 125-128.

Magnani, P., P. V. Cherian, G. W. Gould, D. A. Greene, A. A. Sima, and F. C. Brosius, III, 1996, Glucose transporters in rat peripheral nerve: paranodal expression of GLUT1 and GLUT3: *Metabolism*, v. 45, no. 12, p. 1466-1473.

Mahadev, K., H. Motoshima, X. Wu, J. M. Ruddy, R. S. Arnold, G. Cheng, J. D. Lambeth, and B. J. Goldstein, 2004, The NAD(P)H oxidase homolog Nox4

modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction: *Mol.Cell Biol.*, v. 24, no. 5, p. 1844-1854.

Mahadev, K., A. Zilbering, L. Zhu, and B. J. Goldstein, 2001, Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 24, p. 21938-21942.

Myarino, L. J., K. S. Wright, L. S. Verity, J. Nichols, J. M. Bell, O. G. Kolterman, and H. Beck-Nielsen, 1987, Effects of insulin infusion on human skeletal muscle pyruvate dehydrogenase, phosphofructokinase, and glycogen synthase. Evidence for their role in oxidative and nonoxidative glucose metabolism: *J.Clin.Invest*, v. 80, no. 3, p. 655-663.

Mao, M., X. Fang, AND. Lu, R. LaPushin, R. C. Bast, Jr., and G. B. Mills, 2000, Inhibition of growth-factor-induced phosphorylation and activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells: *Biochem.J.*, v. 352 Pt 2, p. 475-482.

Martín, M. A., C. Alvarez, L. Goya, B. Portha, and A. M. Pascual-Leone, 1997, Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development: *Am.J.Physiol*, v. 272, no. 4 Pt 1, p. E634-E640.

Massin, M. M., N. Withofs, K. Maeyns, and F. Ravet, 2001, The influence of fetal and postnatal growth on heart rate variability in young infants: *Cardiology*, v. 95, no. 2, p. 80-83.

Mauvais-Jarvis, F. et al., 2002, Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes: *J.Clin.Invest*, v. 109, no. 1, p. 141-149.

Merry, B. J., 2002, Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity: *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 34, no. 11, p. 1340-1354.

Michelle, F. L., V. Poon, and A. Klip, 2003, GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms: *Acta Physiol Scy.*, v. 178, no. 4, p. 287-296.

Mochly-Rosen, D., and A. S. Gordon, 1998, Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity: *FASEB J.*, v. 12, no. 1, p. 35-42.

Mueckler, M., 1994, Facilitative glucose transporters: *Eur.J.Biochem.*, v. 219, no. 3, p. 713-725.

Mueckler, M., C. Caruso, S. A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. R. Morris, W. J. Allard, G. E. Lienhard, and H. F. Lodish, 1985, Sequence and structure of a human glucose transporter: *Science*, v. 229, no. 4717, p. 941-945.

Mur, C., A. M. Valverde, C. R. Kahn, and M. Benito, 2002, Increased insulin sensitivity in IGF-I receptor--deficient brown adipocytes: *Diabetes*, v. 51, no. 3, p. 743-754.

Myers, M. G., Jr., L. M. Wang, X. J. Sun, AND. Zhang, L. Yenush, J. Schlessinger, J. H. Pierce, and M. F. White, 1994, Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling: *Mol.Cell Biol.*, v. 14, no. 6, p. 3577-3587.

Nakashima, N., P. M. Sharma, T. Imamura, R. Bookstein, and J. M. Olefsky, 2000, The tumor suppressor PTEN negatively regulates insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 17, p. 12889-12895.

Nave, B. T., M. Ouwens, D. J. Withers, D. R. Alessi, and P. R. Shepherd, 1999, Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation: *Biochem.J.*, v. 344 Pt 2, p. 427-431.

Newgard, C. B., M. J. Brady, R. M. O'Doherty, and A. R. Saltiel, 2000, Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1: *Diabetes*, v. 49, no. 12, p. 1967-1977.

Nikoulina, S. E., T. P. Ciaraldi, L. Carter, S. Mudaliar, K. S. Park, and R. R. Henry, 2001, Impaired muscle glycogen synthase in type 2 diabetes is associated with diminished phosphatidylinositol 3-kinase activation: *J.Clin.Endocrinol.Metab.* v. 86, no. 9, p. 4307-4314.

Niu, W., C. Huang, Z. Nawaz, M. Levy, R. Somwar, D. Li, P. J. Bilan, and A. Klip, 2003, Maturation of the regulation of GLUT4 activity by p38 MAPK during L6 cell myogenesis: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 20, p. 17953-17962.

Nordlie, R. C., J. D. Foster, and A. J. Lange, 1999, Regulation of glucose production by the liver: *Annu.Rev.Nutr.*, v. 19, p. 379-406.

Norris, K., F. Norris, D. H. Kono, H. Vestergaard, O. Pedersen, A. N. Theofilopoulos, and N. P. Moller, 1997, Expression of protein-tyrosine phosphatases in the major insulin target tissues: *FEBS Lett.*, v. 415, no. 3, p. 243-248.

O'Brien, R. M., and D. K. Granner, 1996, Regulation of gene expression by insulin: *Physiol Rev.*, v. 76, no. 4, p. 1109-1161.

O'Connor, P. M., S. R. Kimball, A. Suryawan, J. A. Bush, H. V. Nguyen, L. S. Jefferson, and T. A. Davis, 2004, Regulation of Neonatal Liver Protein Synthesis by Insulin and Amino Acids in Pigs: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*

Okitolonda, W., S. M. Brichard, A. M. Pottier, and J. C. Henquin, 1988, Influence of low- and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat: *Br.J.Nutr.*, v. 60, no. 3, p. 509-516.

Osmond, C., D. J. Barker, P. D. Winter, C. H. Fall, and S. J. Simmonds, 1993, Early growth and death from cardiovascular disease in women: *BMJ*, v. 307, no. 6918, p. 1519-1524.

Ostman, A., and F. D. Bohmer, 2001, Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases: *Trends Cell Biol.*, v. 11, no. 6, p. 258-266.

Ozanne, S. E. et al., 2003, Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle: *J.Endocrinol.*, v. 177, no. 2, p. 235-241.

Pagliassotti, M. J., J. Kang, J. S. Thresher, C. K. Sung, and M. E. Bizeau, 2002, Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.*, v. 282, no. 1, p. E170-E176.

Pannifer, A. D., A. J. Flint, N. K. Tonks, and D. Barford, 1998, Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 17, p. 10454-10462.

Patti, M. E., E. Brambilla, L. Luzi, E. J. Lyaker, and C. R. Kahn, 1998, Bidirectional modulation of insulin action by amino acids: *J.Clin.Invest.*, v. 101, no. 7, p. 1519-1529.



Paz, K., R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety, and AND. Zick, 1997, A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation: *J.Biol.Chem.*, v. 272, no. 47, p. 29911-29918.

Pearce, N. J. et al., 2004, Development of glucose intolerance in male transgenic mice overexpressing human glycogen synthase kinase-3beta on a muscle-specific promoter: *Metabolism*, v. 53, no. 10, p. 1322-1330.

Pégorier, J. P., C. Prip-Buus, P. H. Duée, and J. Girard, 1992, Hormonal control of fatty acid oxidation during the neonatal period: *Diabete Metab*, v. 18, no. 1 Pt 2, p. 156-160.

Pelicci, G. et al., 1992, A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction: *Cell*, v. 70, no. 1, p. 93-104.

Pendaries, C., H. Tronchere, M. Plantavid, and B. Payrastre, 2003, Phosphoinositide signaling disorders in human diseases: *FEBS Lett.*, v. 546, no. 1, p. 25-31.

Penicaud, L., J. Kye, M. J. Le, and J. R. Girard, 1985, Insulin action during fasting and refeeding in rat determined by euglycemic clamp: *Am.J.Physiol*, v. 249, no. 5 Pt 1, p. E514-E518.

Peralta, S., J. M. Carrascosa, N. Gallardo, M. Ros, and C. Arribas, 2002, Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 296, no. 2, p. 425-428.

Pessin, J. E., and A. R. Saltiel, 2000, Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance: *J.Clin.Invest*, v. 106, no. 2, p. 165-169.

Pinto, A. B., M. O. Carayannopoulos, A. Hoehn, L. Dowd, and K. H. Moley, 2002, Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival: *Biol.Reprod.*, v. 66, no. 6, p. 1729-1733.

Plotkin, B., O. Kaidanovich, I. Talior, and H. Eldar-Finkelman, 2003, Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3: *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, v. 305, no. 3, p. 974-980.

- Pons, S., T. Asano, E. Glasheen, M. Miralpeix, AND. Zhang, T. L. Fisher, M. G. Myers, Jr., X. J. Sun, and M. F. White, 1995, The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase: *Mol.Cell Biol.*, v. 15, no. 8, p. 4453-4465.
- Postic, C., A. Leturque, R. L. Printz, P. Maulard, M. Loizeau, D. K. Granner, and J. Girard, 1994, Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat: *Am.J.Physiol*, v. 266, no. 4 Pt 1, p. E548-E559.
- Proud, C. G., 2002, Regulation of mammalian translation factors by nutrients: *Eur.J.Biochem.*, v. 269, no. 22, p. 5338-5349.
- Rao, R. H., J. M. Betschart, and M. A. Virji, 1991, Effect of chronic undernutrition on hepatocyte insulin receptors in rats: *Metabolism*, v. 40, no. 12, p. 1292-1297.
- Raught, B., A. C. Gingras, and N. Sonenberg, 2001, The target of rapamycin (TOR) proteins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, no. 13, p. 7037-7044.
- Ren, J. M., P. M. Li, W. R. Zhang, L. J. Sweet, G. Cline, G. I. Shulman, J. N. Livingston, and B. J. Goldstein, 1998, Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis: *Diabetes*, v. 47, no. 3, p. 493-497.
- Rett, K., M. Wicklmayr, G. J. Dietze, and H. U. Haring, 1996, Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin: *Diabetes*, v. 45 Suppl 1, p. S66-S69.
- Ribon, V., R. Herrera, B. K. Kay, and A. R. Saltiel, 1998, A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 7, p. 4073-4080.
- Roberts, T. M., 1992, Cell biology. A signal chain of events: *Nature*, v. 360, no. 6404, p. 534-535.
- Rogers, S., M. L. Macheda, S. E. Docherty, M. D. Carty, M. A. Henderson, W. C. Soeller, E. M. Gibbs, D. E. James, and J. D. Best, 2002, Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 282, no. 3, p. E733-E738.

Rojas, F. A., A. E. Hirata, and M. J. Saad, 2001, Regulation of IRS-2 tyrosine phosphorylation in fasting and diabetes: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 183, no. 1-2, p. 63-69.

Romanelli, A., K. A. Martín, A. Toker, and J. Blenis, 1999, p70 S6 kinase is regulated by protein kinase C $\zeta$  and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, no. 4, p. 2921-2928.

Rondinone, C. M. et al., 2002, Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis: *Diabetes*, v. 51, no. 8, p. 2405-2411.

Roseboom, T. J., J. H. Van Der Meulen, C. Osmond, D. J. Barker, A. C. Ravelli, and O. P. Bleker, 2001a, Adult survival after prenatal exposure to the Dutch famine 1944--45: *Paediatr.Perinat.Epidemiol.*, v. 15, no. 3, p. 220-225.

Roseboom, T. J., J. H. Van Der Meulen, A. C. Ravelli, C. Osmond, D. J. Barker, and O. P. Bleker, 2001b, Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview: *Twin.Res.*, v. 4, no. 5, p. 293-298.

Roseboom, T. J., J. H. Van Der Meulen, A. C. Ravelli, C. Osmond, D. J. Barker, and O. P. Bleker, 2003, Perceived health of adults after prenatal exposure to the Dutch famine: *Paediatr.Perinat.Epidemiol.*, v. 17, no. 4, p. 391-397.

Rother, K. I., AND. Imai, M. Caruso, F. Beguinot, P. Formisano, and D. Accili, 1998, Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 28, p. 17491-17497.

Rui, L., M. Yuan, D. Frantz, S. Shoelson, and M. F. White, 2002, SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 44, p. 42394-42398.

Ryder, J. W., M. Gilbert, and J. R. Zierath, 2001, Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations: *Front Biosci.*, v. 6, p. D154-D163.

Saad, M. J., E. Araki, M. Miralpeix, P. L. Rothenberg, M. F. White, and C. R. Kahn, 1992, Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance: *J.Clin.Invest*, v. 90, no. 5, p. 1839-1849.

Sable, C. L., N. Filippa, B. Hemmings, and E. Van Obberghen, 1997, cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner: *FEBS Lett.*, v. 409, no. 2, p. 253-257.

Sakamoto, K., W. G. Aschenbach, M. F. Hirshman, and L. J. Goodyear, 2003, Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch: *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, v. 285, no. 5, p. E1081-E1088.

Sakanashi, T. M., H. E. Brigham, and K. M. Rasmussen, 1987, Effect of dietary restriction during lactation on cardiac output, organ blood flow and organ weights of rats: *J.Nutr.*, v. 117, no. 8, p. 1469-1474.

Saltiel, A. R., and C. R. Kahn, 2001, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism: *Nature*, v. 414, no. 6865, p. 799-806.

Saltiel, A. R., and J. E. Pessin, 2002, Insulin signaling pathways in time and space: *Trends Cell Biol.*, v. 12, no. 2, p. 65-71.

Sambrook J, Fritsch E. F. and Maniatis T, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Sampaio, d. F., E. P. Garcia De Souza, d. S. Vargas, K. A. da Rocha, S. da, V, M. A. Sanchez, and C. Barja-Fidalgo, 2003, Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1639, no. 1, p. 8-16.

Santalucía, T., M. Camps, A. Castelló, P. Munoz, A. Nuel, X. Testar, M. Palacín, and A. Zorzano, 1992, Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue: *Endocrinology*, v. 130, no. 2, p. 837-846.

Scheid, M. P., and J. R. Woodgett, 2003, Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt: *FEBS Lett.*, v. 546, no. 1, p. 108-112.

Schmitz-Peiffer, C., C. L. Browne, N. D. Oakes, A. Watkinson, D. J. Chisholm, E. W. Kraegen, and T. J. Biden, 1997, Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat: *Diabetes*, v. 46, no. 2, p. 169-178.

Sekulic, A., C. C. Hudson, J. L. Homme, P. Yin, D. M. Otterness, L. M. Karnitz, and R. T. Abraham, 2000, A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells: *Cancer Res.*, v. 60, no. 13, p. 3504-3513.

Senn, J. J., P. J. Klover, I. A. Nowak, T. A. Zimmers, L. G. Koniaris, R. W. Furlanetto, and R. A. Mooney, 2003, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes: *J.Biol.Chem.*, v. 278, no. 16, p. 13740-13746.

Serra, C. et al., 2003, Transgenic mice with dominant negative PKC-theta in skeletal muscle: a new model of insulin resistance and obesity: *J.Cell Physiol*, v. 196, no. 1, p. 89-97.

Sesti, G., M. Federici, M. L. Hribal, D. Lauro, P. Sbraccia, and R. Lauro, 2001, Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders: *FASEB J.*, v. 15, no. 12, p. 2099-2111.

Shambaugh, G. E., III, and J. F. Wilber, 1974, The effect of caloric deprivation upon thyroid function in the neonatal rat: *Endocrinology*, v. 94, no. 4, p. 1145-1149.

Shepherd, P. R., D. J. Withers, and K. Siddle, 1998, Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling: *Biochem.J.*, v. 333 ( Pt 3), p. 471-490.

Sherman, L. A., M. F. Hirshman, M. Cormont, AND. Marchy-Brustel, and L. J. Goodyear, 1996, Differential effects of insulin and exercise on Rab4 distribution in rat skeletal muscle: *Endocrinology*, v. 137, no. 1, p. 266-273.

Shi, K., K. Egawa, H. Maegawa, T. Nakamura, S. Ugi, AND. Nishio, and A. Kashiwagi, 2004, Protein-tyrosine phosphatase 1B associates with insulin receptor and negatively regulates insulin signaling without receptor internalization: *J.Biochem.(Tokyo)*, v. 136, no. 1, p. 89-96.

Shier, P., and V. M. Watt, 1989, Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family: *J.Biol.Chem.*, v. 264, no. 25, p. 14605-14608.

Shimomura, I., M. Matsuda, R. E. Hammer, AND. Bashmakov, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, 2000, Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed

insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice: *Mol.Cell*, v. 6, no. 1, p. 77-86.

Shulman, G. I., 2000, Cellular mechanisms of insulin resistance: *J.Clin.Invest*, v. 106, no. 2, p. 171-176.

Simon, M. A., G. S. Dodson, and G. M. Rubin, 1993, An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro: *Cell*, v. 73, no. 1, p. 169-177.

Simpson, L., J. Li, D. Liaw, I. Hennessy, J. Oliner, F. Christians, and R. Parsons, 2001, PTEN expression causes feedback upregulation of insulin receptor substrate 2: *Mol.Cell Biol.*, v. 21, no. 12, p. 3947-3958.

Simpson, L., and R. Parsons, 2001, PTEN: life as a tumor suppressor: *Exp.Cell Res.*, v. 264, no. 1, p. 29-41.

Singh, M. K., A. D. Krisan, A. M. Crain, D. E. Collins, and B. B. Yaspelkis, III, 2003, High-fat diet and leptin treatment alter skeletal muscle insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and glucose transport: *Metabolism*, v. 52, no. 9, p. 1196-1205.

Sokoloff, L., M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada, and M. Shinohara, 1977, The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat: *J.Neurochem.*, v. 28, no. 5, p. 897-916.

Somwar, R., D. AND. Kim, G. Sweeney, C. Huang, W. Niu, C. Lador, T. Ramlal, and A. Klip, 2001, GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase: *Biochem.J.*, v. 359, no. Pt 3, p. 639-649.

Stambolic, V. et al., 1998, Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN: *Cell*, v. 95, no. 1, p. 29-39.

Styaert, M. L., G. Bandyopadhyay, L. Galloway, J. Soto, AND. Ono, U. Kikkawa, R. V. Farese, and M. Leitges, 1999, Effects of knockout of the protein kinase C beta gene on glucose transport and glucose homeostasis: *Endocrinology*, v. 140, no. 10, p. 4470-4477.

Stephens, L. et al., 1998, Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B: *Science*, v. 279, no. 5351, p. 710-714.

Stiles, B., M. Groszer, S. Wang, J. Jiao, and H. Wu, 2004, PTENless means more: *Dev.Biol.*, v. 273, no. 2, p. 175-184.

Stokoe, D., L. R. Stephens, T. Copely, P. R. Gaffney, C. B. Reese, G. F. Painter, A. B. Holmes, F. McCormick, and P. T. Hawkins, 1997, Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B: *Science*, v. 277, no. 5325, p. 567-570.

Storgaard, H., C. B. Jensen, M. Bjornholm, X. M. Song, S. Madsbad, J. R. Zierath, and A. A. Vaag, 2004, Dissociation between fat-induced in vivo insulin resistance and proximal insulin signaling in skeletal muscle in men at risk for type 2 diabetes: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 89, no. 3, p. 1301-1311.

Sun, X. J., D. L. Crimmins, M. G. Myers, Jr., M. Miralpeix, and M. F. White, 1993, Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1: *Mol.Cell Biol.*, v. 13, no. 12, p. 7418-7428.

Sun, X. J., J. L. Goldberg, L. AND. Qiao, and J. J. Mitchell, 1999, Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway: *Diabetes*, v. 48, no. 7, p. 1359-1364.

Sun, X. J., P. Rothenberg, C. R. Kahn, J. M. Backer, E. Araki, P. A. Wilden, D. A. Cahill, B. J. Goldstein, and M. F. White, 1991, Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein: *Nature*, v. 352, no. 6330, p. 73-77.

Suryawan, A., and T. A. Davis, 2003, Protein-tyrosine-phosphatase 1B activation is regulated developmentally in muscle of neonatal pigs: *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, v. 284, no. 1, p. E47-E54.

Sutherly, C., R. M. O'Brien, and D. K. Granner, 1995, Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression: *J.Biol.Chem.*, v. 270, no. 26, p. 15501-15506.

Takayama, S., M. F. White, and C. R. Kahn, 1988, Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity: *J.Biol.Chem.*, v. 263, no. 7, p. 3440-3447.

Tal, M., B. B. Kahn, and H. F. Lodish, 1991, Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient diabetic rats: *Endocrinology*, v. 129, no. 4, p. 1933-1941.

Tamemoto, H. et al., 1994, Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1: *Nature*, v. 372, no. 6502, p. 182-186.

Tao, J., C. C. Malbon, and H. AND. Wang, 2001, Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 31, p. 29520-29525.

Tavare, J. M., and K. Siddle, 1993, Mutational analysis of insulin receptor function: consensus and controversy: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1178, no. 1, p. 21-39.

Terauchi, AND. et al., 1999, Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase: *Nat.Genet.*, v. 21, no. 2, p. 230-235.

Thomas, G., and M. N. Hall, 1997, TOR signalling and control of cell growth: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 9, no. 6, p. 782-787.

Thorens, B., 2001, GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review): *Mol.Membr.Biol.*, v. 18, no. 4, p. 265-273.

Thorens, B., 1996, Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes: *Am.J.Physiol*, v. 270, no. 4 Pt 1, p. G541-G553.

Thorens, B., J. S. Flier, H. F. Lodish, and B. B. Kahn, 1990, Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment: *Diabetes*, v. 39, no. 6, p. 712-719.

Till, M., D. M. Ouwens, A. Kessler, and J. Eckel, 2000, Molecular mechanisms of contraction-regulated cardiac glucose transport: *Biochem.J.*, v. 346 Pt 3, p. 841-847.



Tonks, N. K., 2003, PTP1B: from the sidelines to the front lines!: *FEBS Lett.*, v. 546, no. 1, p. 140-148.

Toole, M. J., and R. J. Waldman, 1997, The public health aspects of complex emergencies and refugee situations: *Annu.Rev.Public Health*, v. 18, p. 283-312.

Torres, J., and R. Pulido, 2001, The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 2, p. 993-998.

Tremblay, F., C. Lavigne, H. Jacques, and A. Marette, 2003, Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats: *Diabetes*, v. 52, no. 1, p. 29-37.

Tremblay, F., C. Lavigne, H. Jacques, and A. Marette, 2001, Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities: *Diabetes*, v. 50, no. 8, p. 1901-1910.

Tremblay, F., and A. Marette, 2001, Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 41, p. 38052-38060.

Tsirka, A. E., E. M. Gruetzmacher, D. E. Kelley, V. H. Ritov, S. U. Devaskar, and R. H. Lane, 2001, Myocardial gene expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 4 in response to uteroplacental insufficiency in the rat: *J.Endocrinol.*, v. 169, no. 2, p. 373-380.

Ueki, K., T. Kondo, and C. R. Kahn, 2004a, Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms: *Mol.Cell Biol.*, v. 24, no. 12, p. 5434-5446.

Ueki, K., T. Kondo, AND. H. Tseng, and C. R. Kahn, 2004b, Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 101, no. 28, p. 10422-10427.

Ueki, K., C. M. Yballe, S. M. Brachmann, D. Vicent, J. M. Watt, C. R. Kahn, and L. C. Cantley, 2002, Increased insulin sensitivity in mice lacking p85beta subunit of phosphoinositide 3-kinase: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 99, no. 1, p. 419-424.

Uphues, I., T. Kolter, B. Goud, and J. Eckel, 1994, Insulin-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle: studies on the role of small-molecular-mass GTP-binding proteins: *Biochem.J.*, v. 301 ( Pt 1), p. 177-182.

Vachon, C., and L. Savoie, 1987, Circadian variation of food intake and digestive tract contents in the rat: *Physiol Behav.*, v. 39, no. 5, p. 629-632.

Valovka, T. et al., 2003, Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase betaII and regulates its subcellular localization: *Mol.Cell Biol.*, v. 23, no. 3, p. 852-863.

Vanhaesebroeck, B., and D. R. Alessi, 2000, The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB: *Biochem.J.*, v. 346 Pt 3, p. 561-576.

Vazquez, F., S. R. Grossman, AND. Takahashi, M. V. Rokas, N. Nakamura, and W. R. Sellers, 2001, Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex: *J.Biol.Chem.*, v. 276, no. 52, p. 48627-48630.

Venable, C. L., E. U. Frevert, AND. B. Kim, B. M. Fischer, S. Kamatkar, B. G. Neel, and B. B. Kahn, 2000, Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation: *J.Biol.Chem.*, v. 275, no. 24, p. 18318-18326.

Virkamaki, A., K. Ueki, and C. R. Kahn, 1999, Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance: *J.Clin.Invest.*, v. 103, no. 7, p. 931-943.

Vollenweider, P., B. Menard, and P. Nicod, 2002, Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance: *Diabetes*, v. 51, no. 4, p. 1052-1059.

Walker, C. D., and M. L. Aubert, 1988, Effects of early undernutrition and hyling on the adrenocortical activity of neonatal rats: *Life Sci.*, v. 43, no. 24, p. 1983-1990.

Walker, K. S., M. Deak, A. Paterson, K. Hudson, P. Cohen, and D. R. Alessi, 1998, Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha: *Biochem.J.*, v. 331 ( Pt 1), p. 299-308.

Wang, P. H., A. Almahfouz, F. Giorgino, K. C. McCowen, and R. J. Smith, 1999, In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-Fos: *Endocrinology*, v. 140, no. 3, p. 1141-1150.

Wang, X. AND., K. Bergdahl, A. Heijbel, C. Liljebris, and J. E. Bleasdale, 2001, Analysis of in vitro interactions of protein tyrosine phosphatase 1B with insulin receptors: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 173, no. 1-2, p. 109-120.

Watson, R. T., and J. E. Pessin, 2001, Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4: *Exp.Cell Res.*, v. 271, no. 1, p. 75-83.

Weinkove, C., E. A. Weinkove, and B. L. Pimstone, 1976, Glucose tolerance and insulin release in malnourished rats: *Clin.Sci.Mol.Med.*, v. 50, no. 3, p. 153-163.

Weinstein, S. P., J. Watts, and R. S. Haber, 1991, Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter gene expression in rat skeletal muscle: *Endocrinology*, v. 129, no. 1, p. 455-464.

Welch, H., A. Eguinoa, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins, 1998, Protein kinase B and rac are activated in parallel within a phosphatidylinositide 3OH-kinase-controlled signaling pathway: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 18, p. 11248-11256.

Weng, Q. P., M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M. J. Comb, and J. Avruch, 1998, Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 26, p. 16621-16629.

White, M. F., 1994, The IRS-1 signaling system: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 4, no. 1, p. 47-54.

White, M. F., 1997, The insulin signalling system and the IRS proteins: *Diabetologia*, v. 40 Suppl 2, p. S2-17.

White, M. F., and C. R. Kahn, 1994, The insulin signaling system: *J.Biol.Chem.*, v. 269, no. 1, p. 1-4.

Withers, D. J. et al., 1998, Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice: *Nature*, v. 391, no. 6670, p. 900-904.

Wojtaszewski, J. F., J. N. Nielsen, and E. A. Richter, 2002, Invited review: effect of acute exercise on insulin signaling and action in humans: *J.Appl.Physiol*, v. 93, no. 1, p. 384-392.

Wood, I. S., L. Hunter, and P. Trayhurn, 2003, Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 308, no. 1, p. 43-49.

Wu, X. et al., 2000, Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, no. 8, p. 4233-4238.

Xie, L. et al., 2003, Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling: *Biochemistry*, v. 42, no. 44, p. 12792-12804.

Yamauchi, T. et al., 1996, Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, no. 6, p. 3074-3084.

Yano, S., H. Tokumitsu, and T. R. Soderling, 1998, Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway: *Nature*, v. 396, no. 6711, p. 584-587.

Young, L. H., AND. Renfu, R. Russell, X. Hu, M. Caplan, J. Ren, G. I. Shulman, and A. J. Sinusas, 1997, Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo: *Circulation*, v. 95, no. 2, p. 415-422.

Young, L. H., R. R. Russell, III, R. Yin, M. J. Caplan, J. Ren, R. Bergeron, G. I. Shulman, and A. J. Sinusas, 1999, Regulation of myocardial glucose uptake and

transport during ischemia and energetic stress: *Am.J.Cardiol.*, v. 83, no. 12A, p. 25H-30H.

Yu, C. et al., 2002, Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle: *J.Biol.Chem.*, v. 277, no. 52, p. 50230-50236.

Yu, J., AND. Zhang, J. McIlroy, T. Rordorf-Nikolic, G. A. Orr, and J. M. Backer, 1998, Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, no. 3, p. 1379-1387.

Zabolotny, J. M. et al., 2001, Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, no. 9, p. 5187-5192.

Zhu, L., A. Zilbering, X. Wu, K. Mahadev, J. I. Joseph, S. Jabbour, W. Deeb, and B. J. Goldstein, 2001, Use of an anaerobic environment to preserve the endogenous activity of protein-tyrosine phosphatases isolated from intact cells: *FASEB J.*, v. 15, no. 9, p. 1637-1639.

Zorzano, A., C. Fyos, and M. Palacín, 2000, Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism: *Biochem.J.*, v. 349 Pt 3, p. 667-688.

Zorzano, A., T. Santalucía, M. Palacín, A. Gumá, and M. Camps, 1998, Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expression in muscle: *Gen.Pharmacol.*, v. 31, no. 5, p. 705-713.

Zorzano, A. et al., 1997, Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes: *Am.J.Cardiol.*, v. 80, no. 3A, p. 65A-76A.

Zorzano, A., W. Wilkinson, N. Kotliar, G. Thoidis, B. E. Wadzinski, A. E. Ruoho, and P. F. Pilch, 1989, Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations: *J.Biol.Chem.*, v. 264, no. 21, p. 12358-12363.