

## **Nuevo modelo celular para el estudio de la señalización de insulina en miocardio**

**Yolanda F. Otero, Manuel Benito de las Heras\***

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 28 de junio de 2008.

### **RESUMEN**

En los últimos años, la prevalencia de la obesidad y enfermedades metabólicas relacionadas como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 ha aumentado en las sociedades occidentales. Un efecto subyacente en los individuos aquejados de obesidad asociada o no a diabetes tipo 2 es la resistencia a la insulina y el daño cardiovascular, siendo éste la principal causa de muerte. Sin embargo, el impacto de la resistencia a la acción de la insulina sobre la función cardiaca es desconocido. En este trabajo, hemos estudiado la señalización de la insulina y la resistencia a la misma en cardiomiocitos neonatales de ratón. Para ello, hemos generado una nueva línea celular de cardiomiocitos inmortalizados. En dicha línea, hemos estudiado la expresión de distintas proteínas implicadas en la cascada de señalización celular de la insulina, como el receptor de insulina y sus principales sustratos IRS-1 e IRS-2, así como la vía de señalización mediada por PKB/Akt, ERKs y p70/S6K. También, se estudiaron enzimas implicadas en la regulación de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, tales como la AMPK y la Acetil-CoA Carboxilasa. Además, se estudió la captación de glucosa radiactiva bajo distintos estímulos. Los resultados obtenidos sugieren que nuestros cardiomiocitos son sensibles a la estimulación por insulina y ácidos grasos, pero resistentes en lo referido a la captación de glucosa. Dicha resistencia a la acción de la insuli-

na por ácidos grasos en cardiomiocitos podría contribuir a la intolerancia a la glucosa asociada a los estados de obesidad que cursan con diabetes tipo 2.

**Palabras clave:** Cardiomiocitos; Ácidos grasos; AMPK; ACC; Glucosa.

## **ABSTRACT**

### **Insulin signaling study in new cellular model from myocardium**

In the last years, the prevalence of obesity and metabolic diseases like diabetes type 2 and metabolic syndrome, suffered an increase. Underlying effect in people with obesity with or without diabetes type 2, are insulin resistance and cardiovascular disease that are one of the major cause of death. Nevertheless, the action of insulin resistance over cardiac function is unknown. In this work, we studied the insulin signaling and its resistance in mice neonatal cardiomyocytes. We generated a new cellular line of immortalized cardiomyocytes. In these cells we studied the expression of several proteins of insulin signaling pathway like insulin receptor and their major substrates IRS-1 and IRS-2, besides PKB/Akt pathway, ERKs and p70/S6K. We also studied some  $\beta$ -oxidation enzymes like Acetyl-CoA Carboxilase and AMPK. Finally, we studied glucose uptake with 2-Deoxy-glucose under different stimuli. The results showed that our new cell line are insulin and free fatty acids sensitive but it presents insulin resistance to glucose uptake which can be due to a low expression of GLUT4. In conclusion, these new cellular model may be useful to study glucose intolerance associated to obesity that appears in diabetes type 2.

**Key Words:** Cardiomyocytes; Fatty acids; AMPK; ACC; Glucose.

## 1. INTRODUCCIÓN

El corazón es un órgano único en muchos sentidos. Está formado por cardiomiocitos que son células musculares especializadas adaptadas para contraerse de forma coordinada y continua. Esto es vital para la supervivencia del organismo dado que el papel central del corazón es el mantenimiento del sistema cardiovascular, que libera oxígeno, sustratos metabólicos y hormonas al resto del cuerpo. En los últimos años ha aumentado en las sociedades occidentales, la prevalencia de la obesidad y de las enfermedades metabólicas relacionadas con ella, como el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (1). Un efecto subyacente en los individuos aquejados de las patologías citadas, es la resistencia a la acción de la insulina (2) y el daño cardiovascular, siendo ésta una de las principales causas de muerte en la población con enfermedad cardiovascular. Sin embargo, poco se sabe sobre el impacto de la resistencia a la acción de la insulina en la función cardíaca.

El metabolismo cardíaco está regulado por: la disponibilidad de sustrato, hormonas (insulina), trabajo cardíaco (demanda de energía) y aporte de oxígeno. Dada la importancia de la función contráctil continua, no es sorprendente que el corazón haya sido descrito como un órgano que puede utilizar muchos sustratos diferentes para generar ATP bajo diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas (3). Como es de suponer, la diabetes tiene una marcada influencia en el metabolismo cardíaco debido a que el aporte de sustratos se encuentra alterado, la acción de la insulina se ve afectada, y existen mal adaptaciones metabólicas en el corazón diabético (4, 5).

Se han realizado muy pocos estudios sobre el impacto que causa la diabetes tipo 2 en el metabolismo cardíaco. Se supone que existe un incremento en la utilización de ácidos grasos como sustrato para la obtención de ATP y que ello podría tener consecuencias deletéreas, siendo un posible mecanismo de cardiomiopatía diabética (6).

La asimilación de glucosa por el músculo (cardíaco y esquelético) está determinada principalmente por 2 factores independientes pero interrelacionados, a saber, las concentraciones locales de insulina y la intensidad del ejercicio/contracción. Los ácidos grasos

no esterificados (NEFAs) modulan el transporte de glucosa mediado por insulina e inhiben la oxidación de glucosa en mayor medida que la asimilación de glucosa por el corazón (7). Sin embargo, la glucosa suprime la oxidación de ácidos grasos de cadena larga, a través de la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa I por malonil-CoA (8, 9).

La secreción de insulina estimula la asimilación de glucosa en los miocitos por aumento de la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. Además, la insulina inhibe la liberación de NEFAs desde el tejido adiposo. Así, disminuyen las concentraciones plasmáticas de los ácidos grasos y por lo tanto se previene la inhibición de la glicólisis y la oxidación de piruvato mediada por NEFA (así como el efecto inhibitorio de los mismos en la señalización de insulina). La magnitud del consumo de glucosa observada con algunas concentraciones de insulina *in vivo* se verá reducida a medida que aumentan las cantidades circulantes de NEFA. Este principio de competición de sustratos entre glucosa y NEFA es tan conocido, que inicialmente los investigadores asumieron incorrectamente que la diabetes tipo 2 era secundaria a una elevación crónica de los niveles de NEFA en plasma (10). La supresión de la oxidación de glucosa por los ácidos grasos, sin embargo, es sólo un componente más de un complejo sistema de interacciones metabólicas.

En diabetes, el corazón está expuesto a un ambiente hiperinsulinémico e hiperglucémico. Inicialmente, se adapta a este ambiente incrementando la expresión de proteínas del metabolismo de ácidos grasos, de esta forma aumenta su dependencia de los ácidos grasos como combustible. Este corazón adaptado es capaz de mantener la producción cardiaca bajo estas condiciones. Sin embargo, cabría la posibilidad de que una exposición continuada a este ambiente metabólico pudiera conducir a una disfunción cardiaca. A medida que la diabetes progresa, la excesiva disponibilidad de ácidos grasos y lípidos podría exceder la tasa de uso por el corazón, produciendo una acumulación lipídica en los cardiomiocitos. La menor dependencia de los ácidos grasos como sustratos del corazón hipertrofiado en un medio diabético precipitará la deposición lipídica en los cardiomiocitos, y por lo tanto acelerará la lipotoxicidad.

Se han generado ratones con una delección específica del receptor de insulina en el corazón (CIRKO), revelando que la insulina es capaz de regular a largo plazo varios aspectos de la biología cardiaca (11).

La utilización del sustrato metabólico está alterada en los corazones de ratones CIRKO. Se produce una disminución de las tasas de oxidación de glucosa debido a la pérdida de la señalización de la insulina, también se observa que el contenido proteico de GLUT4 está aumentado, mientras el de GLUT1 está disminuido. En diabetes, la expresión de ambos transportadores de glucosa se ve reducida en el corazón (12). La reducción de GLUT4 podría reflejar los efectos indirectos de la pérdida de la señalización de insulina, mientras la regulación a la baja de GLUT1 reflejaría los efectos directos de la deficiencia de insulina en el corazón.

En este trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos: 1. Obtener nuevas líneas de cardiomiocitos neonatales de ratón que permitan el estudio de la señalización de insulina. 2. Estudiar la ruta de  $\beta$ -oxidación en este tipo celular y comprobar que existe una regulación de los ácidos grasos sobre la señalización de insulina. 3. Determinar si el modelo celular obtenido es válido para el estudio de la sensibilidad y/o resistencia a la insulina.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se han utilizado ratones machos y hembras procedentes del ICAI de la UCM. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas, 8:00-20:00/20:00-8:00), temperatura ( $23 \pm 3$  °C) y humedad ( $65 \pm 1\%$ ) durante todo el periodo experimental. Todas las manipulaciones con animales se realizaron de acuerdo con las Normativas Internacionales para el uso y manejo de animales de laboratorio aprobadas por el National Research Council (Washington, 1996), la Directiva Europea 86/609 CEE y bajo las normas previstas por el Comité Ético de la Universidad Complutense.

Se procedió al cruce de ratones machos y hembras. Después del período de gestación, se tomaron los neonatos de un día, se les extrajo el corazón y se procedió al cultivo primario, punto de partida para la generación de las nuevas líneas.

## 2.1. Cultivo primario

Se realizó a partir de los corazones de los neonatos en grupos de 3. Se trocearon los corazones y se introdujeron en 1 ml de una solución de PBS 1x con 1,2 mg/ml de colagenasa (Colagenasa tipo 2, Worthington) y 10 µg/ml DNAsa (DNAsa I grado II, Roche). Para la disgregación del tejido, se incubó el tubo en un baño a 37 °C, dentro de la campana de flujo laminar, durante 10-20 min; tiempo durante el que se realizó un pipeteo suave y continuo para separar las células. Una vez hecho esto, se tomó el sobrenadante, desechando el tejido restante, y se añadieron entre 3-5 ml de suero fetal bovino. Dependiendo del número de ratones neonatos, este ciclo se repitió varias veces, siempre tratando los corazones en grupos de 3.

A continuación, se centrifugaron los tubos con el suero fetal durante 5 min a 1000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células mediante un pipeteo suave, en 1 ml de medio de "cardiomiocitos" (DMEM y M199 (3:1), 5% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo, 20 mM de HEPES, 0,2 ng/ml de cardiotrofina-I (R&D Systems), 1µM de insulina (Sigma) y una mezcla de antibióticos y antifúngicos).

Posteriormente se sembraron las células en platos normales (Falcon) durante 45 min para así eliminar los fibroblastos del sobrenadante. Pasado ese tiempo, el sobrenadante se sembró en platos previamente tratados con colágeno (Collagen from rat tail, Roche Applied Sciences) disuelto en una solución de PBS al 0,2% de ácido acético, para así facilitar la adhesión de los cardiomiocitos.

Después de dos días de estabilización del cultivo primario, se procedió a la inmortalización de las células mediante infección retroviral con la construcción pBABE puro-antígeno T. Las células infectadas fueron seleccionadas por la adición al medio de cultivo del antibiótico de selección, en este caso puromicina, a una concentración de 0,5 µg/ml, durante un tiempo de entre 2 y 3 semanas.

En todos los casos se observó que las células mantenían las mismas propiedades proliferativas tras repetidos pases y procesos de congelación-descongelación.

Una vez superado el tiempo de selección, las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fe-

tal y 0,2 ng/ml de cardiotrofina-1, 20 mM de Hepes y la mezcla de antibióticos y antifúngicos.

## 2.2. Curva de dosis - respuesta frente un estímulo

Para estudiar cómo responden los cardiomiocitos de ratón frente a varios estímulos, se procedió a la realización de curvas de dosis – respuesta. Así, se sembraron las células y una vez que alcanzaron el 60-70% de confluencia, se procedió a la retirada de suero durante 15 horas. En el caso del ácido oleico se utilizó un medio de retirada con 0,5% de suero fetal y 500 $\mu$ M de albúmina, para intentar reproducir *in vitro* la situación que ocurre en diabetes.

Una vez transcurrido ese tiempo, se estimularon las células con concentraciones crecientes de insulina en un rango desde 10 pM a 100 nM, durante un tiempo de 5 minutos.

También se realizaron estimulaciones con ácido oleico, para estudiar como respondían los cardiomiocitos a los ácidos grasos. En este caso los estímulos se llevaron a cabo con concentraciones de entre 200 y 800  $\mu$ M, durante una hora.

## 2.3. Curva de tiempo

Se realizaron curvas de tiempo frente a ambos estímulos: insulina y ácido oleico. Para ello se procedió a la retirada de suero de las células una vez que alcanzaron el 60-70% de confluencia, durante 15 horas.

Los estímulos se llevaron a cabo con 10 nM de insulina y 800  $\mu$ M de ácido oleico. Para ambos el tiempo de estimulación fue de 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos.

## 2.4. Obtención de extractos de proteínas

Las placas de cultivo se lavaron dos veces con PBS frío y posteriormente se lisaron a 4°C (sobre hielo) en 100 - 500  $\mu$ l de tampón de lisis (EDTA 5mM, NaCl 50 mM, Pirofosfato sódico 30 mM, NaF 50 mM,

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 μM, Tritón X-100 1%, Tris pH 7,6 10 mM, PMSF 1mM, Aprotinina 1 mM, Leupeptina 1 mM).

Las células se levantaron de la placa mediante raspado y lisado se colocó rápidamente en tubos de 1,5 ml. Los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos, a continuación se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos para su uso inmediato o congelación a -70°C.

## 2.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas obtenidas, se realizó mediante el ensayo descrito por Bradford (13). Para ello se usó el agente “Bio-Rad protein assay” (Bio-Rad) y albúmina de suero bovino (Bio-Rad protein Assay standard H, Bio-Rad) para preparar una curva patrón. La cuantificación se realizó mediante la adición del reactivo de Bradford y la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm.

## 2.6. Electroforesis de proteínas

Una vez valorados los lisados, se prepararon las muestras de forma que todas contuvieran la misma cantidad de proteínas, alrededor de 20-60 μg, y se mezclaron en proporción 1:1 con un tampón compuesto por: Tris 72 mM pH 7,6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), y β-mercaptoetanol 2 mM. Así preparadas, las muestras se guardaron a -20 °C hasta el momento de la electroforesis (SDS-PAGE). Estas muestras se calentaron a 90-100 °C durante 5 minutos y se cargaron en el gel de electroforesis. En un carril del mismo gel se cargó un patrón de pesos moleculares, con una mezcla de proteínas de tamaños conocidos (*Prestained SDS-PAGE Standards* Bio Rad ref # 161-0318). El porcentaje del gel de poliacrilamida varió en función del tamaño de la proteína que se quería estudiar en cada momento.

## 2.7. Transferencia de proteínas

Una vez separadas suficientemente las proteínas mediante la electroforesis se procedió a la transferencia de las mismas a una mem-



brana de poli vinil difluoruro o PVDF (*Immobilon-P*®) mediante el paso de corriente eléctrica. Esta transferencia se realizó según dos métodos: utilizando el equipo de transferencia *Trans-blot SD Semy-dry* de Bio Rad y un tampón compuesto por glicina 40 mM, metanol al 20% (v/v) y Tris 48 mM pH 8,3; a 15 V durante un tiempo variable en función del tamaño del gel, el espesor y porcentaje de acrilamida del mismo y el tamaño de la proteína en estudio. Y para la transferencia de proteínas de alto peso molecular, se utilizó el equipo de transferencia por húmedo de Bio Rad y un tampón compuesto por: glicina 386 mM, SDS 0,1 %, metanol 20% y Tris 66 mM pH 8,5. Esta transferencia se lleva a cabo a 100 V durante 2 horas.

Finalizada la transferencia, se realizó el bloqueo o saturación de todos los sitios inespecíficos de unión de proteínas en la membrana de PVDF. Para ello, la membrana fue incubada 2 horas con agitación suave en solución de bloqueo, preparada con TBS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,3) suplementado con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) o BSA al 3% (p/v). Posteriormente, se eliminó este tampón y se añadió el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20), incubándose con agitación suave a 4 °C durante toda la noche. Tras esta incubación se realizaron 4 lavados sucesivos de 10 minutos cada uno con el tampón de lavado TTBS. A continuación se añadió el anticuerpo secundario (un anticuerpo de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas de ratón o conejo y conjugado con una peroxidasa de rábano) y con él se incubó la membrana de polivinilo durante al menos 1 hora a 4°C. Finalmente se realizaron otros 4 lavados con TTBS y se procedió al revelado, consistente en la detección de la peroxidasa fijada mediante una técnica quimioluminiscente, utilizando el equipo de detección comercializado por Amersham (ECL) y películas fotográficas de alta sensibilidad de la misma casa.

## **2.8. Medida de la captación celular de glucosa**

La línea celular en estudio, sin suero y con medio bajo en glucosa durante 4 horas, se lavó 3 veces con medio KRH (NaCl 136mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, Hepes 20mM, 1% BSA) y seguidamente se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 1 ml de KRH en presencia o ausencia de insulina (10-100 nM). La incubación con in-

hibidores de la proteína PI3K, se realizó durante 30 minutos previos en el mismo medio de deprivación, a una concentración de 40 nM de Wortmanina y 10 nM de LY 294002 (ambos de Sigma). Por último, la incubación con ácido oleico (Sigma) se realizó durante 1 hora a una concentración de 800  $\mu$ M. Todos los estímulos se mantuvieron durante la incorporación de glucosa tritiada. La incorporación de 2-deoxy-D-(1-<sup>3</sup>H)-glucosa (500 nCi/ml, Amersham Biosciences) se midió durante los últimos 10 minutos de incubación. Transcurrido este tiempo las células se lavaron 3 veces con KRH y se solubilizaron en 1 ml – 500  $\mu$ l de SDS 0,1%. La radiactividad de una alícuota de 200  $\mu$ l fue determinada en 2 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold®) en un contador de radiación beta.

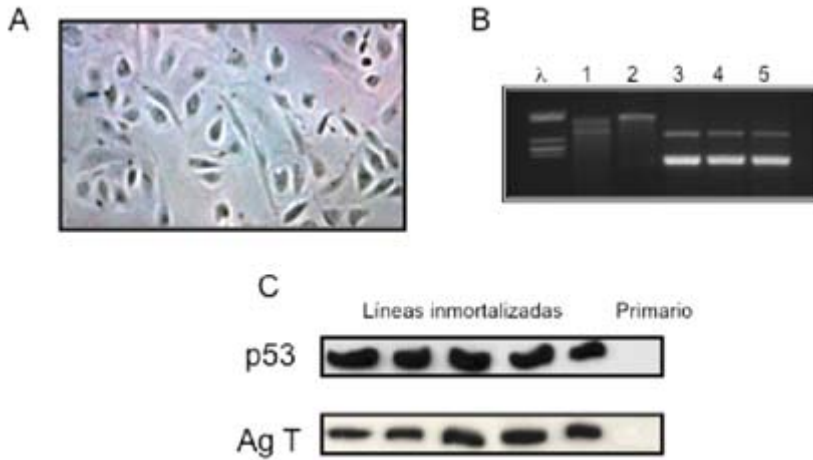
### 3. RESULTADOS

Para la inmortalización de los cardiomiocitos se obtuvo primero el DNA del antígeno T mediante purificación de la banda del gel de agarosa. Una vez transfectadas con el DNA, y después de la selección con puromicina, se comprobó la inmortalización mediante western blot contra antígeno T y contra p53. La presencia de ambas proteínas confirma que las células son inmortales (Figura 1).

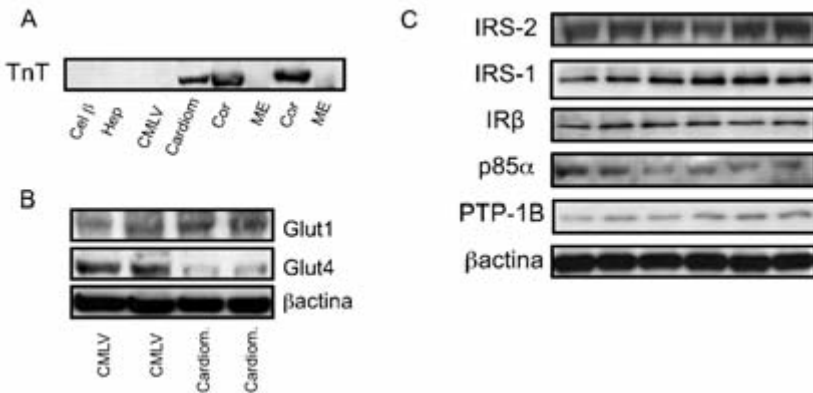
Para comprobar que las células inmortalizadas y seleccionadas son realmente cardiomiocitos y se eliminó la contaminación por otros tipos celulares como fibroblastos, estas células deben poseer la fracción específica de corazón de la proteína Troponina T, como así se demuestra en el western blot directo realizado (Figura 2A).

En determinados tejidos, al inmortalizar las líneas celulares, se puede producir un cambio en la relación de expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, lo que posteriormente puede repercutir en la señalización celular. Se realizó un western blot contra estos transportadores, comparando los cardiomiocitos obtenidos con otros tipos celulares y con tejidos (Figura 2B). Se puede observar que la expresión de Glut 4 en cardiomiocitos neonatales es muy inferior a la de otros tipos celulares.

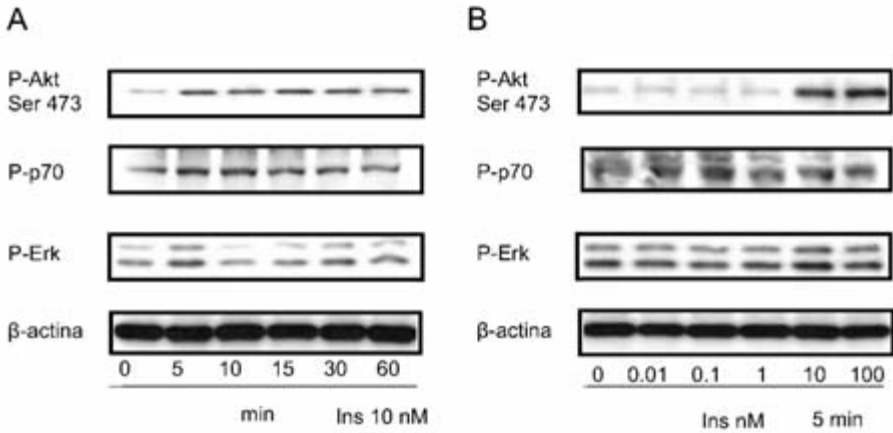
Se caracterizó la ruta de señalización intracelular de la insulina (Figura 2C) y se observó que los cardiomiocitos neonatales expresan ya



**Figura 1.** **A** Fotografía en campo claro de los cardiomiocitos en cultivo. **B.** Plásmido con Antígeno T sin digerir y digerido con dos enzimas de restricción para la obtención del inserto que se usará para transfectar. **C.** Comprobación de la inmortalización mediante western blot contra antígeno T y p53.



**Figura 2.** **A.** Presencia de Troponina T para confirmar que las células son cardiomiocitos, mediante comparación con distintos tipos celulares y tejidos (Cel β: células beta; Hep: hepatocito; CMLV: célula muscular lisa vascular; Cardiom: cardiomiocito; Cor: corazón; ME: músculo esquelético.). **B.** Expresión de Glut4 y Glut1 en distintos tipos celulares. **C.** Caracterización de la ruta de señalización intracelular de la insulina en cardiomiocitos.



**Figura 3.** Estudio de distintas proteínas de la cascada de señalización de la insulina durante una curva de tiempo (A) y un experimento de dosis-respuesta (B), ambos frente a un estímulo de insulina.

muchas de las proteínas implicadas en la ruta de señalización de la insulina.

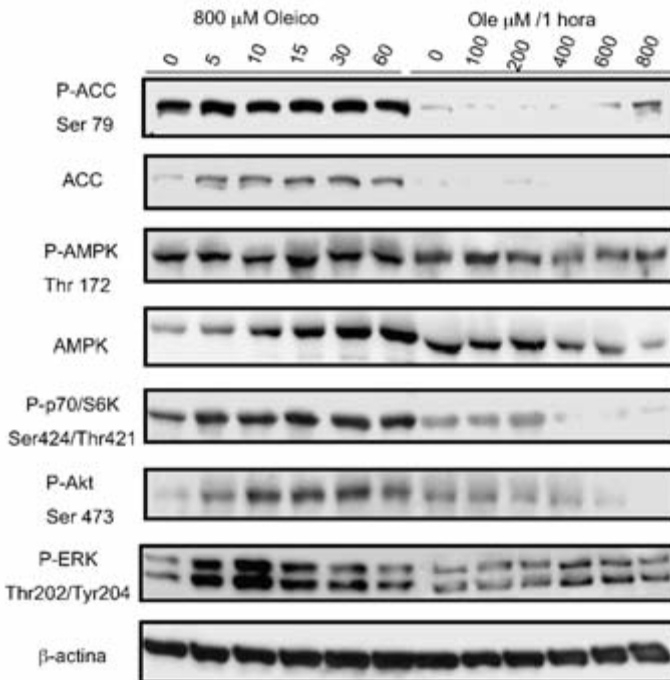
El estudio de la curva dosis-respuesta frente a insulina (Figura 3A) permite conocer la menor concentración de dicha hormona que estimula la ruta de señalización intracelular de los cardiomiocitos.

En la curva de tiempo (Figura 3B) se puede observar que la insulina a concentración de 10 nM causa una estimulación tras 5 minutos de presencia en el medio. Para todas las proteínas estudiadas, el estímulo se mantiene de forma sostenida hasta el final del experimento, aunque va decayendo poco a poco a medida que avanza el tiempo.

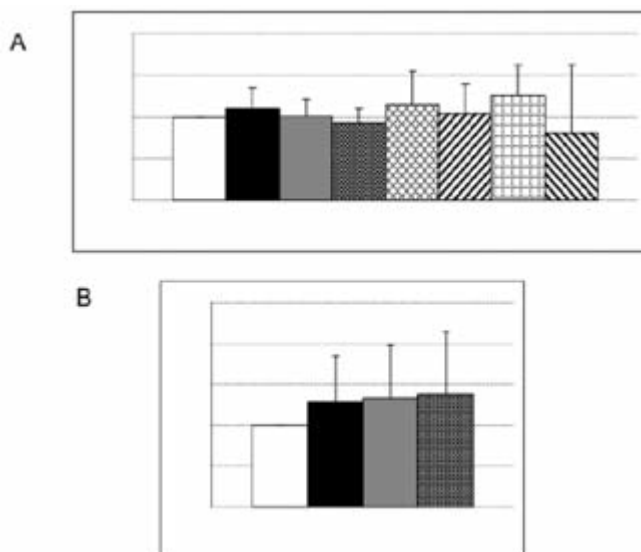
En la curva de tiempo (Figura 4), se observa una alta estimulación en el tiempo 0 en las proteínas relacionadas con la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Al relacionar la cantidad de proteína existente, con la cantidad de proteína fosforilada, observamos dos patrones distintos. En el caso de la Acetil-CoA carboxilasa (ACC), se observa que desde el primer momento hay mucha proteína fosforilada en relación con la proteína total no fosforilada (esto es, en su forma inactiva). Este efecto no se atenúa de manera tiempo-dependiente. Luego se podría decir que, el

ácido oleico a una concentración de 800  $\mu\text{M}$ , inactiva a la ACC de manera tiempo-independiente. En el caso de la quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) se observa que al principio del tratamiento se encuentra fosforilada (activa). La fosforilación (normalizada) de la AMPK es máxima a altas concentraciones de ácidos grasos, como se deduce de los datos de la curva dosis-respuesta a ácidos grasos (Figura 4). Sin embargo, la cantidad normalizada de AMPK fosforilada es cada vez menor de manera tiempo-dependiente. Estos resultados parecen sugerir que los ácidos grasos a altas concentraciones (800  $\mu\text{M}$ ) inactivan a la ACC a lo largo del tiempo de manera independiente de AMPK.

Respecto a la captación celular de glucosa (Figura 5), no se observa una respuesta a la acción de la insulina mucho mayor que el transporte basal. De hecho, independientemente de los estímulos utilizados no hay una respuesta estadísticamente significativa.



**Figura 4.** Estudio de distintas proteínas relacionadas con los ácidos grasos durante una curva de tiempo y un experimento de dosis-respuesta, frente a estímulos con ácido oleico.



**Figura 5.** Captación celular de glucosa en células estimuladas con Insulina (10-100 nM) y Wortmanina (40 nM) (A) y en células estimuladas con Insulina (10-100 nM), Ácido oleico (800  $\mu$ M) y LY 294002 (10 nM). (B) Los valores se expresan como media+SEM.

#### 4. DISCUSIÓN

Durante el período fetal y neonatal, hasta que se realiza el cambio a un metabolismo adulto, el corazón y por tanto los cardiomiocitos, tienen principalmente un metabolismo glucídico (14).

En la línea celular obtenida en este trabajo, se observa que hay un estímulo causado por la insulina a las concentraciones más altas utilizadas en el experimento (Figura 3), luego en principio estas células serían sensibles a la acción de la insulina.

En el caso de los ácidos grasos representados en este trabajo por el ácido oleico (Figura 4), se observa que la activación del metabolismo oxidativo ocurre muy rápidamente. Hay que tener en cuenta que este experimento se realizó en unas condiciones que intentan mimetizar el medio diabético. En los primeros estudios del sustrato metabólico del corazón humano, en los que se incluyeron pacientes

diabéticos, ya se observó que en ellos se produce un descenso de la asimilación de glucosa, mientras que la asimilación de ácidos grasos aumenta (15). Este hecho podría relacionarse con el hecho de que la quinasa dependiente de AMP cíclico (AMPK) sufra un descenso de la relación forma activa/inactiva; de forma que a medida que vaya aumentando su forma inactiva, dejará de ejercer su efecto inhibitor sobre la Acetil- CoA Carboxilasa (ACC). Sin embargo, la ACC se mantiene fosforilada e inactiva a lo largo del tiempo, a altas concentraciones de ácidos grasos, lo cual sugiere una inactivación de la ACC independiente de la AMPK. Ello, supondría mantener inactiva la ACC y por tanto, aumentado el acceso de los ácidos grasos a la mitocondria y su consiguiente oxidación.

Se sabe que los ácidos grasos empeoran la asimilación de glucosa mediada por insulina. De hecho, se ha mostrado de forma repetida y consistente que la alimentación alta en grasas empeora la tolerancia a la glucosa y disminuye la sensibilidad a la acción de la insulina en músculo (16, 17), aunque el mecanismo exacto por el que los ácidos grasos inhiben la acción de la insulina todavía es desconocido. Estudios recientes sugieren un papel de varias isoformas de la proteína proteína quinasa C (PKC), especialmente de PKC  $\theta$  y PKC  $\epsilon$  (18). Estas quinasas podrían activarse de dos formas, o bien directamente debido a la alta generación de diacilglicerol, o indirectamente por un incremento de las concentraciones de acil-CoA de cadena larga. Este incremento del acil-CoA estaría causado por un desequilibrio de las tasas de disponibilidad y/o asimilación de los ácidos grasos y la  $\beta$ -oxidación de los mismos. La relación de ácidos grasos y de la actividad PKC ha sido observada en músculo esquelético resistente a la acción de la insulina de rata (19).

Se sabe que los ácidos grasos estimulan la vía ERK/MAPK en cardiomiocitos neonatales de ratón y también que tienen un papel protector a través de esta vía en situaciones de isquemia y reperfusión (20). Por tanto, no es sorprendente que en presencia de ácido oleico en el medio, a los 5 minutos de exposición, se produzca una gran activación de estas proteínas; activación que se hace máxima a los 10 minutos, pero que sin embargo decae de forma muy rápida a tiempos posteriores.

En cuanto al transporte de glucosa (Figura 5), el efecto causado por los distintos estímulos, posiblemente se ve minimizado por el alto

transporte basal encontrado. Lo que provoca que nos hagamos la pregunta de ¿por qué existe esa alta captación de glucosa en el estado basal? La respuesta podría estar en el balance de los transportadores de glucosa, teniendo en cuenta que las partes anteriores de la cascada de señalización intracelular de la insulina ya fueron analizadas, y aparentemente tenían un comportamiento normal que indicaba una sensibilidad a la acción de la hormona. Si el ratio GLUT1/GLUT4 se ve desplazado hacia el primero, causaría que el transporte se viera facilitado de forma independiente de insulina y por ello, al estimular con la hormona la cantidad de GLUT4 disponible para el transporte sería tan baja que apenas repercutiría en el transporte inespecífico de GLUT1. De la misma forma, no se vería afectado por los inhibidores de la PI3K. El hecho de que GLUT1 esté aumentado se explica porque es el principal transportador de la insulina en el corazón embrionario, aunque poco después del nacimiento ocurre un cambio de expresión, disminuyendo las concentraciones de GLUT1 y aumentando las de GLUT4, aunque de todas formas, esto no evita que GLUT1 sea un transportador muy importante en el corazón neonatal (21).

Otra posibilidad es que falle la maquinaria de translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y por ello, aunque las concentraciones de GLUT1 sean altas y el transporte basal sea también alto, el que GLUT4 no funcione hace que no se produzca la captación de glucosa.

La tercera posibilidad es que a pesar de ser cardiomiocitos neonatales y en principio su metabolismo sea glucídico, puede que una parte muy importante de la obtención de energía se produzca a través de las enzimas  $\beta$ -oxidativas, como puede ser la AMPK. En un estudio realizado en cardiomiocitos con biguanidas e insulina, se describió que existe un transporte de insulina comparable a través de la insulina y a través de la AMPK, y que ambos transportes serían inhibidos por LY 294002, luego ambos transportes inducidos de la glucosa serían PI 3 quinasa-dependientes. Además, en ausencia de insulina, la AMPK tendría un efecto aditivo con la activación de Akt (22). Esto podría explicar que en nuestras células no haya transporte de glucosa importante en presencia de insulina, ni que lo haya en presencia de oleico, ya que este ácido graso a altas concentraciones provoca una inactivación de la AMPK de manera tiempo-dependiente.



En resumen:

1. Hemos obtenido una nueva línea de cardiomiocitos neonatales capaces de estimular las cascadas de señalización dependientes de insulina. Igualmente, responden a los ácidos grasos libres. En consecuencia, la nueva línea celular es válida para estudiar la señalización celular en respuesta a la insulina y su regulación por ácidos grasos libres.
2. Los cardiomiocitos neonatales no aumentan el consumo de glucosa en respuesta a insulina o ácidos grasos libres, debido a los bajos niveles de expresión de GLUT-4. En consecuencia, los cardiomiocitos neonatales muestran una clara resistencia a la insulina en lo que al consumo de glucosa se refiere.
3. Dado que los cardiomiocitos de los pacientes diabéticos muestran bajos niveles de GLUT-4 y resistencia a la insulina, los cardiomiocitos neonatales de ratón pueden ser un modelo válido para el estudio de la resistencia de la insulina en el consumo de glucosa.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido llevado a cabo dentro del proyecto SAF2005/0014 en colaboración con el Fondo Social Europeo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Haffner, S. & Taegtmeier, H. (2003) Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation*. 108 (13): 1541-1545.
2. Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 104 (4): 517-529.
3. Depre, C., Vanoverschelde, J.L. & Taegtmeier, H. (1999) Glucose for the heart. *Circulation*. 99 (4): 578-588.
4. Taegtmeier, H., McNulty, P. & Young, M.E. (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation*. 105 (14): 1727-1733.
5. Young, M.E., McNulty, P. & Taegtmeier, H. (2002) Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation*. 105 (15): 1861-1870.

6. Severson, D.L. (2004) Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82 (10): 813-823.
7. Randle, P.J., Garland, P. B., Hales, C.N. & Newsholme, E. A. (1963) The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1: 785- 789.
8. Taegtmeyer, H., Hems, R. & Krebs, H. A. (1980) Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* 186 (3): 701-711.
9. Saha, A. K., Vavvas, D., Kurowski, T. G., Apazidis, A., Witters, L. A., Shafir, E. & Ruderman, N. B. (1997) Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 272: E641-648.
10. DeFronzo, R.A. (1988) The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 37 (6): 667-687.
11. Belke, D. D., Betuing, S., Tuttle, M. J., Graveleau, C., Young, M. E., Pham, M., Zhang, D., Cooksey, R. C., McClain, D. A., Litwin, S. E., Taegtmeyer, H., Severson, D., Kahn, C.R. & Abel, E. D. (2002) Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J. Clin. Invest.* 109 (5): 629-639.
12. Abel, E. D. (2004) Glucose transport in the heart. *Front. Biosci.* 9: 201-215.
13. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Hocquette, J. F., Sauerwein, H., Higashiyama, Y., Picard, B. & Abe, H. (2006) Prenatal developmental changes in glucose transporters, intermediary metabolism and hormonal receptors related to the IGF/insulin-glucose axis in the heart and adipose tissue of bovines. *Reprod. Nutr. Dev.* 46 (3): 257-272.
15. Ungar, I., Gilbert, M., Siegel, A., Blain, J. M. & Bing, R. J. (1955) Studies on myocardial metabolism. IV. Myocardial metabolism in diabetes. *Am. J. Med.* 18 (3): 385- 396.
16. Kim, J. Y., Nolte, L. A., Hansen, P. A., Han, D. H., Ferguson, K., Thompson, P. A. & Holloszy, J.O. (2000) High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (6): R2057-2065.
17. Storlien, L. H., James, D. E., Burleigh, K. M., Chisholm, D. J. & Kraegen, E. W. (1986) Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251 (5 Pt 1): E576-583.
18. Itani, S. I., Zhou, Q., Pories, W. J., MacDonald, K. G. & Dohm, G. L. (2000) Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes.* 49 (8): 1353-1358.
19. Laybutt, D. R., Schmitz-Peiffer, C., Saha, A. K., Ruderman, N. B., Biden, T. J. & Kraegen, E. W. (1999) Muscle lipid accumulation and protein kinase C activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am. J. Physiol.* 277 (6 Pt 1): E1070- 1076.
20. Engelbrecht, A. M., Engelbrecht, P., Genade, S., Niesler, C., Page, C., Smuts, M. & Lochner, A. (2005) Long-chain polyunsaturated fatty acids protect the heart against ischemia/reperfusion-induced injury via a MAPK dependent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (6): 940-54.

21. Smoak, I. W. & Branch, S. (2000) Glut-1 expression and its response to hypoglycemia in the embryonic mouse heart. *Anat. Embryol. (Berl)*. 201 (5): 327-333.
22. Bertrand, L., Ginion, A., Beauloye, C., Hebert, A. D., Guigas, B., Hue, L. & Vanoverschelde, J. L. (2006) AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (1): H239-50.

**\*Información de Contacto:**

Dr. Manuel Benito de las Heras.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. UCM.  
Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid

Telf: 91 394 17 77. Fax: 91 394 17 79

Email: [benito@farm.ucm.es](mailto:benito@farm.ucm.es)

**Lista de abreviaturas:** **NEFA**, ácidos grasos no esterificados; **CIRKO**, ratón con delección del receptor de insulina en el corazón; **ACC**, acetil-CoA carboxilasa; **AMPK**, quinasa dependiente de AMP cíclico; **PKC**, proteín quinasa C; **PKB**, proteín quinasa B; **MAPK**, proteín quinasas activadas por mitógenos.