



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA BIOMEDICAS



Tesis

Evaluación de la línea celular Huh7 como modelo de resistencia a la insulina determinado por diversos biomarcadores en comparación con HepG2.

PRESENTA:

JESÚS ISIMAR SERAFÍN FABIÁN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MÓNICA RAMÍREZ RUANO

CODIRECTORA

DRA. EUGENIA FLORES ALFARO

COMITÉ TUTORAL

DR. OSCAR DEL MORAL HERNÁNDEZ

DRA. OLGA LILIA GARIBAY CERDENARES

DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Chilpancingo, Gro., enero del 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 25 días del mes de octubre de dos mil diecinueve se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Evaluación de la línea celular Huh7 como modelo de resistencia a la insulina determinado por diversos biomarcadores en comparación con HepG2", presentada por el alumno Jesús Isimar Serafín Fabián, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Mónica Ramírez Ruano
Dirección de tesis

Dra. Eugenia Flores Alfaro
Codirección de tesis

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dr. Eduardo Martínez Martínez

Vc. Bo

Vc. Bo

Agradecimientos a CONACYT

Me llena de orgullo el haber sido becario CONACYT y formar parte de este gran grupo selecto, agradezco profundamente a la relación que existe entre CONACYT y mi universidad la UAGro, por los apoyos brindados durante estos dos largos años llenos de aprendizaje, de no haber sido por su apoyo, este éxito no se habría podido llevar a cabo., además de formar parte del inicio de un proyecto financiado por CONACYT, el cual es: Efecto de la metformina sobre el perfil de expresión lncRNA circulantes en vesículas extracelulares en un modelo in vitro de resistencia a la insulina con numero de solicitud: 283801.

Agradecimientos personales:

Me gustaría iniciar agradeciendo a las personas que fueron clave en el desarrollo de este trabajo, a mis directoras de tesis que sin su apoyo y dedicación esto no hubiese sido posible, Dra. Mónica, muchas gracias por darme la libertad de trabajar y creer en mí (aunque la regara una y otra vez), aprendí mucho a su lado, tanto laboralmente como personalmente, es una gran persona e investigadora, también he de agradecer a mi codirectora, la Dra. Eugenia que sin su comprensión, su siempre disponibilidad para escucharme y orientarme no hubiese sido posible este logro, además de demostrar su gran compromiso conmigo y con el proyecto, muchas gracias, también agradezco a mi comité tutorial que siempre me apoyo tanto técnicamente como personalmente, gracias Dra. Olga por siempre mostrar todo su apoyo hacia mi persona, se lo agradezco infinitamente, gracias Dr. Óscar por siempre escucharme cuando teníamos tutorías y siempre ser un buen ejemplo a seguir, muchas gracias al Dr. Eduardo por mostrar siempre disponibilidad y apoyar en lo que se necesitara, gracias totales.

También quisiera agradecer a el Dr. Marco Vargas por ser un gran mentor y siempre apoyarme, he aprendido mucho de ti, muchas gracias, eres una gran persona y me atrevo a considerarte un buen amigo. Además, agradezco a las personas con las que vivimos esta gran vivencia que fue el posgrado, principalmente a mis amigos Luis, Urucha, Mele, Chema y mis amigas Alin, Jessica, Miriam, Brianda, los quiero muchísimo y siempre recordare nuestras grandes vivencias animaniacs.

También quiero agradecer a las personas que me apoyaron durante estos dos años, a mis amigos de siempre Víctor, Onni, Poncho, Cristian, Jairo, Eduardo y mis amigos del lavado por hacer a meno el camino.

Por último, quiero agradecer a las personas que más amo y que les debo todo, a mis padres, gracias papás por creer en mi y siempre apoyarme, no sería nada sin ustedes, esto es para ustedes y por ustedes.

Índice

I.- Resumen	1
II.- Abstract.....	1
III. - Introducción.....	2
IV.- Materiales y métodos.....	5
V.- Resultados.....	9
VI.- Discusión	14
VII.- Conclusión.....	18
VIII.- Referencias.....	19

I.- Resumen

La resistencia a la insulina (RI) se define como la incapacidad de la insulina para internalizar a la glucosa en sus células blanco, favoreciendo el desarrollo de enfermedades metabólicas. El hígado juega un papel importante en el desarrollo de RI, por lo tanto, es necesario implementar modelos de estudio representativos de esta patología. En este trabajo se propuso a la línea celular Huh7 como modelo de resistencia a insulina, evaluando diversos biomarcadores característicos de la RI y comparando los resultados con un modelo ya establecido, como lo es HepG2. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones elevadas de insulina conducen a las células Huh7 a un estado de RI, demostrado por la disminución en la captación de glucosa, en el contenido de glucógeno y en la fosforilación del receptor de insulina, además del incremento de lípidos, representando un modelo apto para estudios metabólicos y farmacológicos en un estado de RI.

II.- Abstract

Insulin resistance (RI) is defined as the inability of insulin to internalize glucose in its target cells, favoring the development of metabolic diseases. The liver plays an important role in the development of RI; hence, it is necessary to implement study models representative of this pathology. In this work, the Huh7 cell line was proposed as a model of insulin resistance, evaluating various biomarkers characteristic of RI and comparing the results with an established model, such as HepG2. The results show that the high concentrations of insulin drive the Huh7 cells to a state of RI, demonstrated by the decrease in glucose uptake, glycogen content and insulin receptor phosphorylation, also of increase of lipids, representing a model suitable for metabolic and pharmacological studies in a state of RI.

III. - Introducción

La insulina es una hormona producida por las células β pancreáticas, capaz de regular la captación y almacenamiento de glucosa (Dodd, 2017), procesos que inician con la unión de la hormona al receptor de insulina (IR) en la membrana plasmática. El receptor de la insulina está constituido por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembranales, la unión de insulina a la subunidad α da como resultado la dimerización del receptor y la autofosforilación de la subunidad β , esta activación del IR permite el reclutamiento y fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS), que interactúa con diversas proteínas río abajo, como PI-3K, la cinasa dependiente de fosfoinositol (PDK), mTOR y AKT, que regulan señales diversas capaces de mediar la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4), la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas (Guo, 2014; Beale, 2013; Carey *et al.*, 2013). De esta forma, deficiencias en la señalización de la insulina conducen a un estado de resistencia a insulina (RI), que favorece el desarrollo de diversos procesos patológicos (Samuel y Shulman, 2016).

Las causas de la RI se asocian con la hiperglucemia, hiperinsulinemia, estrés oxidativo, hiperlipidemia, inflamación crónica y factores genéticos, afectando la función de la insulina desde la secreción, hasta la vía de señalización en diversos tejidos (Brown y Walker, 2016; Beale, 2013). Se ha descrito que el hígado es el órgano central en la regulación de los niveles de glucosa sérica y la homeostasis de lípidos (Guo, 2014).

El mecanismo por el que se almacena la glucosa en el tejido hepático es determinado por los transportadores GLUT2, capaces de internalizar a la glucosa sin la participación de la insulina, sin embargo, la insulina en el hígado es necesaria para promover la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, además de suprimir la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Guo, 2014). Se ha demostrado en modelos experimentales que el papel del hígado es crucial para el desarrollo de RI, además, se sugiere que la RI hepática es el paso inicial para desarrollar RI en tejidos periféricos (Meshkani y Adeli, 2009).

Para el desarrollo de estrategias de diagnóstico o tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas a la RI hepática, es necesario implementar modelos de estudio experimentales que presenten la mayoría de los biomarcadores posibles observados en la RI (Sah *et al.*, 2016). Los principales biomarcadores de resistencia a la insulina en modelos *in vitro* e *in vivo* son los niveles elevados de glucosa, disminución de los niveles de glucógeno, así como el aumento de los niveles de lípidos y lipoproteínas (Lo *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha vinculado el desarrollo de la RI con el aumento de exosomas en plasma de individuos con diabetes y obesos (Freeman *et al.*, 2018, Pardo *et al.*, 2017). Los exosomas son microvesículas que participan en la comunicación célula a célula y están involucrados en diversos procesos fisiológicos o patológicos. Los exosomas son formados a partir de la fusión del endosoma con la membrana plasmática y liberados al medio extracelular, estas microvesículas tienen la capacidad de transportar proteínas, DNA y diversos tipos de RNA (Lawson *et al.*, 2016). Los exosomas contribuyen a la RI mediante el transporte de RNA's, los cuales pueden interferir desde el inicio de la señalización de la insulina con su receptor, hasta la inhibición de los sustratos de la vía de la insulina en diversos tejidos, provocando un desbalance en la homeostasis de la glucosa (Mullins *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Ying *et al.*, 2017), por lo tanto, la secreción de exosomas y su contenido debe analizarse con la finalidad de establecer la relación de estas vesículas con la RI (Müller, 2012).

Es imprescindible el desarrollo de modelos experimentales para el entendimiento de los mecanismos relacionados a la RI hepática, determinada principalmente por condiciones representativas de la RI, como la hiperinsulinemia y la hiperglucemia por su relevancia biológica (Liu *et al.*, 2017). El modelo *in vitro* ideal para caracterizar los mecanismos fisiológicos del hígado es el cultivo primario de hepatocitos humanos, sin embargo, este modelo tiene la limitante de la pérdida irreversible del fenotipo hepático, además de una capacidad proliferativa limitada y dificultad para su mantenimiento (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 2010). Uno de los modelos celulares más utilizados para analizar la RI hepática es la línea celular HepG2, derivada de un carcinoma hepatocelular, en esta línea celular se ha inducido RI a través de la exposición a ácidos

grasos, citocinas proinflamatorias, así como por concentraciones elevadas de glucosa o de insulina, (Maier *et al.*, 2010). Aun cuando la línea celular HepG2 conserva numerosas funciones metabólicas de los hepatocitos primarios, tiene una tasa baja de secreción de triglicéridos, mayores tasas de glucólisis y lipogénesis *de novo*, debido a un fenotipo fetal que se caracteriza por la expresión alta de IGF-1 que sobreactiva moléculas asociadas a la vía de señalización de la insulina, por lo que no se representa en su totalidad el efecto propio de la RI (Gunn *et al.*, 2017; Nikolaou *et al.*, 2016; Samanez *et al.*, 2012; Maier *et al.*, 2010; Ogino *et al.*, 2002).

Por lo anterior, el establecimiento de un modelo celular para RI hepática similar a los hepatocitos primarios, es relevante para extrapolar los mecanismos moleculares observados en modelos celulares, a la fisiopatología de la RI en humanos. Por otro lado, la línea celular hepática Huh7, derivada de un paciente con hepatocarcinoma, posee características metabólicas similares a hepatocitos primarios, y se ha establecido como un modelo de estudios metabólicos debido a su captación facilitada de glucosa y fructosa por el transportador GLUT2 transmembranal, estas células proporcionan un modelo conveniente para estudios de lipogénesis, tienen una producción representativa de alfa-feto proteína y albumina, además, es una línea celular utilizada principalmente para el estudio del metabolismo de fármacos. Por otra parte, la línea celular Huh7 tiene susceptibilidad elevada a la infección por el virus de hepatitis C *in vitro*, infección que ha sido asociada a la RI (Kasai *et al.*, 2018; Windemuller *et al.*, 2016). Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar la inducción de resistencia a la insulina en la línea celular Huh7 por concentraciones elevadas de insulina en comparación con la línea celular HepG2, un modelo celular de RI ya descrito.

IV.- Materiales y métodos

Cultivo celular de Huh7 y HepG2

Las células Huh7 fueron cultivadas con medio William's Eagle Medium (W4125 Sigma-Aldrich) suplementado al 10% con GlutaMAX (35050061 Thermo Fisher Scientific), suero fetal bovino (SFB) al 10% (90020 Byproducts) y antibiótico-antimicótico al 1% (15240096 Thermo Fisher Scientific, 10,000 U/ml de penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B). Las células HepG2 fueron sembradas con medio cultivo DEMEN F12 (12500096 Thermo Fisher Scientific) suplementado con al 10% y antibiótico-antimicótico al 1% (10,000 U/ml de penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B). Las células se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo con el 5% de CO₂, se realizó el cambio de medio cada 2 o 3 días.

Inducción de RI

Una vez obtenida la confluencia celular deseada para cada línea celular, se retiró el medio y se hicieron lavados con PBS, posteriormente se añadió el medio correspondiente sin suplementar y se expusieron las células a una dosis de 10⁻⁶ mol/L de insulina (Sigma-Aldrich, I35 36) durante 24 h, a 37 °C, en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%, como previamente fue reportado por Liu *et al.*, 2015. Las células control no fueron expuestas a la insulina. Posteriormente, las células se estabilizaron por 24 h en el medio correspondiente suplementado con SFB, hasta la realización del experimento.

Captación de glucosa

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, después de la inducción a resistencia a insulina se determinó la captación de glucosa en las células Huh7 o HepG2 utilizando el kit Glucose uptake assay kit (Abcam, ab136955). Las células se cultivaron en el medio correspondiente sin SFB durante 24 h, posteriormente se retiró el medio y las células se lavaron con PBS, para ser incubadas en buffer KRPH/2 %/BSA por 40 minutos, después las células se estimularon con 100 nM de insulina durante 20 minutos, pasado el tiempo de la estimulación las células fueron incubadas

con 20 nM de 2-desoxi-D-glucosa durante 20 minutos, por último las células fueron tratadas con 8 µL del buffer de ensayo y 2 µL de mix de enzimas a 37°C durante 1 h, Posteriormente las células fueron extraídas con el buffer de extracción y congeladas a -80°C durante 40 minutos, posterior a la congelación se añadieron 10 µL del buffer de neutralización y centrifugadas a 500 rpm por 1 minuto, se tomó el sobrenadante y se colocó con 20 µL de glutatión reductasa, 16 µL de sustrato y 2 µL del recycling mix, se dejó reposar 40 min y se determinó el producto de la reacción en el equipo Epoch 2 microplate reader a una longitud de 412nm, con una cinética de 2 a 3 min, a una temperatura de 37°C.

Contenido de lípidos intracelulares por rojo oleoso

La determinación del contenido de lípidos intracelulares se llevó a cabo por la tinción de rojo oleoso de acuerdo con lo descrito previamente por Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2011). Posterior al tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS por 30 min, posteriormente las células se tiñeron con rojo oleoso O (3 mg/mL) por 30 min a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de colorante lavando con agua destilada. Para el análisis cuantitativo de los lípidos celulares, se agregó 1 mL de isopropanol, se recuperó el sobrenadante teñido y se midió la absorbancia por espectrofotometría a 510 nm. El contenido de lípidos se muestra como el cambio promedio respecto a las células control. Además, el contenido de lípidos intracelulares se normalizó con la concentración de proteínas totales. La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante curva de Bradford/BSA.

Ensayo de contenido de glucógeno con el reactivo Antrona

Las células HepG2 y Huh7 fueron sembradas en frascos de 75 cm² e inducidas a resistencia a insulina, pasado el tiempo de inducción se estabilizaron en medio basal sin SFB durante 48 h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, desprendidas y colocadas en microtubos, posteriormente se añadió KOH al 30% y se hirvieron durante 20 minutos, después las células fueron centrifugadas a 12000 g por 15 min, el pellet obtenido se dejó secar alrededor de 20 min y se rehidrato con 1 ml de H₂O DD y 2 ml de etanol, posteriormente se centrifugó a 12 000 g por 15 min, por

último el pellet se resuspendió en 500 μ L de H₂O DD y se agregaron 2 mL de Antrona (0.2% p/v en 99% de H₂SO₄), la disolución fue hervida 30 minutos, las muestras fueron analizadas en el equipo Nanodrop 2000c, a una longitud de onda de 620 nm y los resultados fueron normalizados con la concentración de proteínas totales de cada muestra.

Determinación de la activación del receptor de la insulina y de Akt por inmunoblot

Finalizada la inducción de resistencia a insulina, las células fueron expuestas a 10 nM de insulina durante 20 min. Posteriormente fueron lavadas con PBS y lisadas en buffer RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher S, 78440). Estos extractos proteicos fueron utilizados para el western blot a una concentración de 40 μ g.

Las muestras fueron procesadas por el método de SDS-PAGE y transferidas electroforéticamente en membranas de nitrocelulosa, posteriormente, la membrana se incubó por 12 h con el anticuerpo primario (anti-insulin receptor β (phospho Y1185; Abcam, ab62321 o anti phosphoAkt ser 473; Abcam, ab81283), diluido en TBST 1x. Después, se realizaron lavados de 10 min con TBS-Tween 20, posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo secundario, durante 2 h. La membrana se lavó 3 veces durante 10 min con TBS-T. Finalmente la detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia en el equipo Chemidoc MP (Bio-Rad).

Aislamiento de exosomas (EVs) de cultivo celular

A partir de los cultivos de las células Huh7 o HepG2 con o sin resistencia a la insulina, se realizó el aislamiento de exosomas utilizando el protocolo basado en ultracentrifugación descrito por Kowal *et al.*, (2017). Posterior al tratamiento, las células fueron cultivadas en el medio correspondiente suplementado con SFB libre de exosomas durante 48 h, hasta alcanzar una confluencia de 70-80%, el medio condicionado se transfirió a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 200 g por 15 min, el sobrenadante se recolectó en tubos nuevos de 50 mL, se centrifugaron nuevamente a 2000 g por 10 min (para sedimentar células muertas), después, el

sobrenadante se colocó en nuevos tubos de 50 mL, para centrifugar a 10 000 g por 30 min a 4°C (para sedimentar EVs grandes), finalmente el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de 30 mL y fueron centrifugados (Thermo Scientific Sorvall MX 120 Plus) a 100,000 g por 120 min a 4°C, se retiró el sobrenadante dejando solo el sedimento, posteriormente se resuspendió el pellet en 1.5 mL de PBS para cada tubo, homogenizando todo el PBS a través del tubo para recolectar todos los exosomas adheridos al tubo, la mezcla se transfirió a microtubos de 1.5 y se centrifugaron a 120,000 g por 60 min a 4°C, se aspiró todo el sobrenadante para resuspender el sedimento que contiene las EVs pequeñas (exosomas) en 40 µL de RIPA con inhibidores de proteasas.

Western blot para identificación de EVs

Una vez obtenidos los exosomas se preparó la muestra para realizar el western blot en condiciones desnaturizantes, estos extractos fueron utilizados con una concentración de 40 µg. Se realizó la electroforesis a 100 V durante 1h, para después realizar la transferencia en una membrana PVDF a 70 V durante 3h. Una vez transferidas las proteínas a la membrana se colocó en TBS-T-1%-ASB y se bloqueó por 1 h, después se lavó y agregó el anticuerpo primario (anti-CD9 o anti-CD63) diluido en 2 mL de TBS-T y se incubó a 4°C con agitación por 12 h. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T por 10 min, después se incubó con el anticuerpo secundario en TBS-T por 2 h. Finalmente, la membrana se lavó 4 veces durante 10 min con TBS-T a temperatura ambiente. La detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia en el equipo Chemidoc MP.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico STATA v.14.0. Los datos son reportados en medias \pm desviación estándar. Para la comparación de los promedios de los distintos biomarcadores de RI se utilizó la prueba de t de student con un nivel de significancia de 0.05. Las figuras fueron preparadas con el software GraphPad v.7.

V.-Resultados

La Inducción de resistencia a insulina disminuye la captación de glucosa en células HepG2 y Huh7

Evidencias indican que las concentraciones elevadas de insulina en cultivos celulares de adipocitos y hepatocitos conducen a un estado de RI, con este propósito, se trataron las células Huh7 y HepG2 con 100 nm de insulina durante 24h, para inducir RI y se validó por medio del ensayo de captación de glucosa (**2-DG6P**), estimulando nuevamente a las células con 100 nM de insulina posterior a la inducción, para observar la activación del receptor. Los resultados obtenidos muestran una disminución en la captación de glucosa de las células Huh7 con RI con respecto a las células Huh7 control.

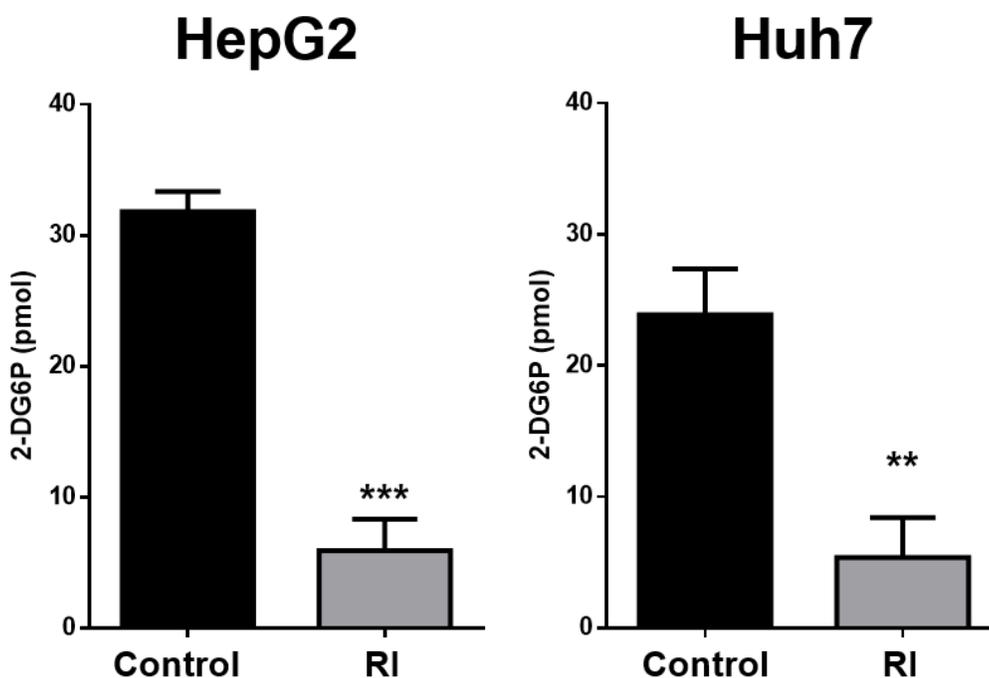


Figura 1. Captación de 2-DG6P en células Huh7 y HepG2. La captación de glucosa se determinó a las 48 h posterior a la inducción de RI. Los resultados se graficaron en medias y desviación estándar, el ensayo se realizó por triplicado en tres momentos independientes. La prueba de t-student muestra una diferencia significativa de $***p < 0.001$ y $**p < 0.01$ con respecto al control.

Determinación de lípidos intracelulares en células HepG2 y Huh7

El incremento en la producción de lípidos intracelulares es una de las características principales de resistencia a insulina hepática. En este estudio se determinó la cantidad de lípidos intracelulares por la tinción de rojo oleoso, una técnica de uso rutinario para la cuantificación de lípidos en modelos *in vitro*. Se generó resistencia a la insulina en las células HepG2 y Huh7 por medio de concentraciones elevadas de insulina durante 24 h, posteriormente se determinó la producción de lípidos intracelulares a las 48 h, y se observó un incremento significativo en los niveles de lípidos en ambas líneas celulares con resistencia a insulina con respecto al control.

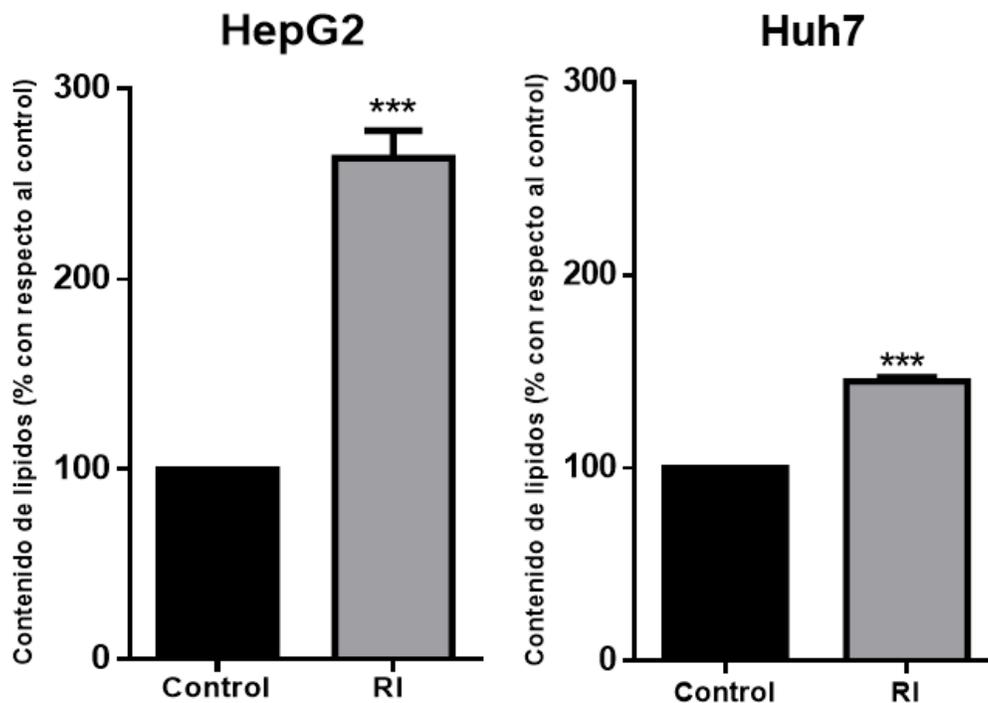


Fig. 2. Contenido de lípidos de HepG2 y Huh7 resistentes a insulina. Las células fueron inducidas a resistencia a insulina durante 24 h, posteriormente se evaluó la producción de lípidos a 48 h. Los resultados se graficaron en medias y desviación estándar, el ensayo se realizó por triplicado en tres momentos independientes. La prueba de t-student muestra una diferencia significativa de *** $p < 0.001$ con respecto al control.

Contenido de glucógeno en las células HepG2 y Huh7 con RI

Uno de los biomarcadores que se ven afectados por la resistencia a insulina es la disminución de los niveles de glucógeno, debido a la función ineficiente de la insulina sobre la glucógeno sintasa, para determinar los cambios en el almacenamiento de glucógeno se realizó la cuantificación de glucógeno en las células Huh7 y HepG2 con resistencia a insulina, y se observó la disminución (%)?? de los niveles de glucógeno en las células con resistencia a insulina en comparación con las células control.

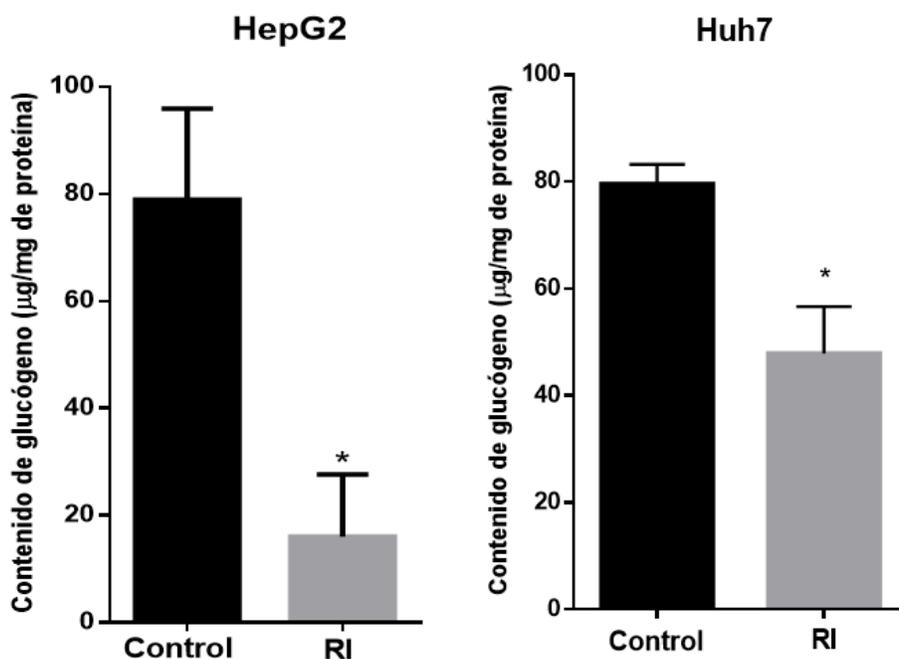


Fig. 3. Contenido de glucógeno de la línea celular Huh7 y HepG2 inducidas con resistencia a insulina. Las células Huh7 y HepG2 se indujeron a resistencia a la insulina durante 24 h, posteriormente se evaluó la producción de glucógeno a 48 h. Se graficaron la media y desviación estándar, el ensayo se realizó por triplicado en tres momentos independientes. La prueba de t-Student muestra una diferencia significativa de $*p < 0.05$ con respecto al control.

Fosforilación del receptor de insulina en células HepG2 y Huh7

Para determinar si la concentración de insulina afecta a la vía de señalización de la insulina se determinó la fosforilación del receptor de insulina por western blot, el proceso de fosforilación es fundamental para las funciones biológicas de la insulina y una disminución en la fosforilación indica un estado de resistencia a la insulina. Las células Huh7 y HepG2 con inducción de resistencia a la insulina y transcurridas 48 h, fueron estimuladas con 100 nM de insulina durante 15 minutos para activar la fosforilación del receptor y realizar la extracción de proteínas. En ambas líneas celulares se observa una disminución de la fosforilación relativa de alrededor del 50% en comparación con el grupo control, comprobando que efectivamente existe un estado de resistencia a la insulina (Figura 4)

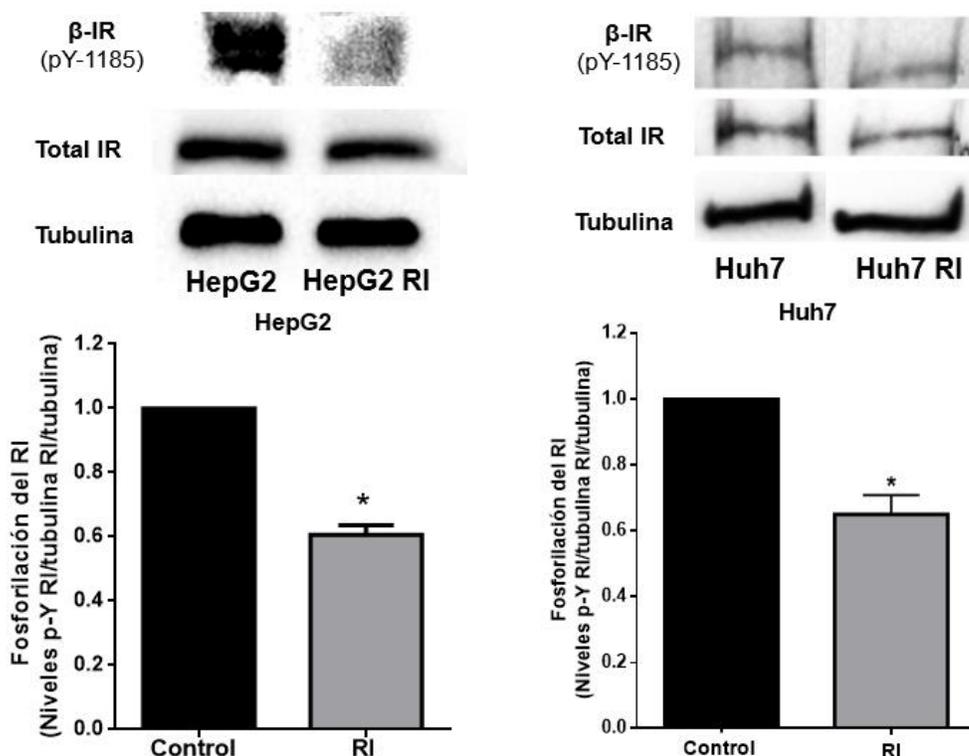


Figura 4. Expresión relativa del receptor de insulina fosforilado en células Huh7 y HepG2. Se indujo resistencia a insulina durante 24 h, posteriormente se estabilizaron durante 48 horas para la extracción de proteínas y se determinó la fosforilación por western blot. Se graficaron la media y desviación estándar, el ensayo se realizó por triplicado en tres momentos independientes. La prueba de t-Student muestra una diferencia significativa de $*p < 0.05$ con respecto al control. Total IR: Receptor de insulina total, β -IR: Fracción beta del receptor de insulina

Expresión de CD9 en exosomas de células Huh7 y HepG2 con RI

Recientemente se ha asociado el incremento en el número de microvesículas en plasma de pacientes con RI y obesidad, por lo tanto, ha incrementado el interés de estudiar su posible relación. El aumento en la secreción de exosomas se determinó por western blot por medio de la detección de la proteína CD9, un marcador específico de estas microvesículas. Se recolectó el medio condicionado de las células Huh7 y HepG2 con inducción de resistencia a la insulina y posteriormente se procedió a aislar los exosomas por el método de ultracentrifugación para realizar la extracción de proteínas. El resultado obtenido muestra que hay un ligero incremento en la expresión de CD9 entre el grupo control y el RI de ambas líneas celulares.

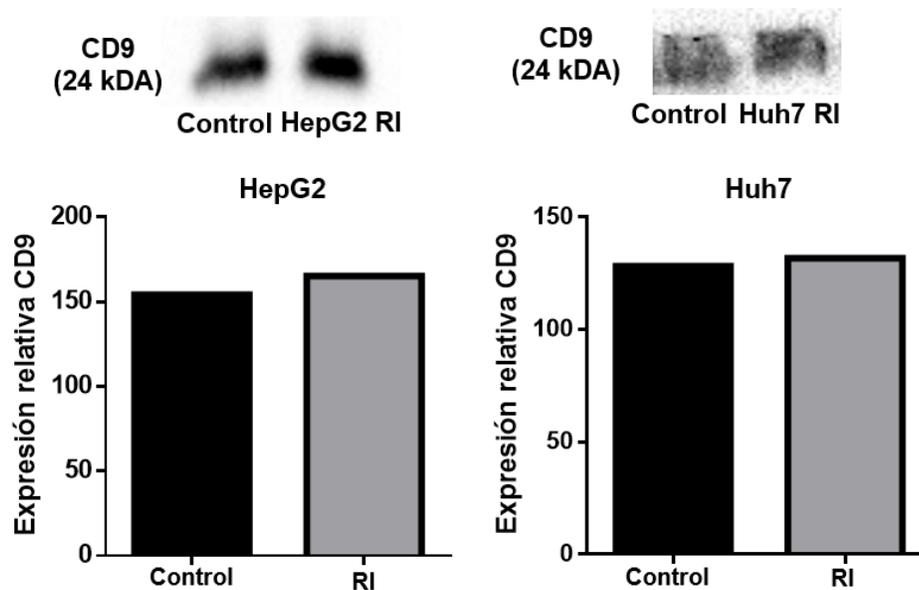


Figura 5. Expresión relativa de CD9 en células Huh7 y HepG2. Se indujo resistencia a insulina durante 24 h, posteriormente se cultivaron durante 48 horas y se recolectó el medio de cultivo para el aislamiento de exosomas, después se realizó la extracción de proteínas y se determinó CD9 por western blot.

VI.-Discusión

El hígado es el órgano central que controla los niveles de glucosa sérica y la homeostasis de lípidos. La insulina en el hígado promueve la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, además de suprimir la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Guo, 2014). En este sentido, defectos en la vía de señalización de la insulina conducen al desarrollo de resistencia a la insulina hepática, desregulando el metabolismo de la glucosa y lípidos, provocando alteraciones de diversas biomoléculas que afectan la salud del paciente. Se han descrito modelos *in vitro*, que permiten analizar la fisiopatología de la resistencia a la insulina, con el fin de desarrollar estrategias novedosas para el diagnóstico y tratamiento de esta patología (Guo, 2014; Guo *et al.*, 2009). El cultivo primario de hepatocitos humanos representa el modelo óptimo *in vitro* para estudiar los mecanismos fisiológicos del hígado, sin embargo, estos modelos tienen la limitante de la pérdida irreversible del fenotipo hepático, además de una capacidad proliferativa limitada (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 2010). La línea celular HepG2 es uno de los modelos celulares establecidos para estudiar la fisiología de la RI, sin embargo, son células con características cancerígenas que pueden favorecer o alterar la RI, nuestro estudio evaluó las características metabólicas de Huh7 como modelo para estudios metabólicos y de resistencia a la insulina inducida por concentraciones elevadas de insulina, comparándolo con un modelo ya establecido como es la línea celular HepG2.

Con base en los resultados obtenidos, se observó que las concentraciones elevadas de insulina disminuyen la captación de glucosa y la fosforilación del receptor de insulina en las líneas celulares Huh7 y HepG2, además, el método de inducción representa el efecto de la hiperinsulinemia en el desarrollo de resistencia a la insulina.

Para comprobar el efecto producido por la RI se determinó, entre otros, la captación de glucosa, identificando una disminución significativa en la captación de glucosa de aproximadamente el 60% en las células con RI en comparación con el control de ambas líneas celulares. Estudios previos en 2012 de Hsieh *et al.*, en la línea celular Huh7 transfectada con la oncoproteína E2 del virus de hepatitis C, se identificó que la captación de glucosa disminuye en un 50% en comparación con las células control, lo

cual fue atribuido al mecanismo de replicación del virus que inhibe la señalización de la insulina mediante la disminución de la expresión del IRS, sugiriendo que el método utilizado por nosotros puede ser más contundente que con las transfección con la oncoproteína del virus de la hepatitis C (Hsieh *et al.*, 2012).

Se ha descrito que para determinar si un modelo celular es representativo del estado de resistencia a insulina, debe tener un aumento en el nivel de lípidos intracelulares, debido a que existe una estrecha relación entre la resistencia a insulina y su incremento a nivel hepático. Nuestros resultados del ensayo de rojo oleoso en la línea celular HepG2, indican un incremento significativo en los niveles de lípidos en las células inducidas con RI con respecto al control, aumento que es provocado por el estado de RI, debido a que la insulina tiene un efecto directo sobre la activación de la lipogénesis e inhibición de la lipólisis, en un estado de RI (Biddinger *et al.*, 2008). Los datos obtenidos del ensayo de rojo oleoso concuerdan con un experimento similar en HepG2 realizado por Zhu y colaboradores en 2018, en el que inducen RI con concentraciones elevadas de insulina y se observa un incremento en lípidos determinado por la tinción de rojo oleoso. Además, Ishi *et al.*, (2016), reportaron el incremento de lípidos al utilizar como método de inducción de RI concentraciones elevadas de ácidos grasos libres de cadena corta (palmitato, oleato, palmitolato, linoleato.), los resultados demostraron que en el modelo de resistencia a la insulina hubo un incremento en los niveles de lípidos con respecto al control (Ishi *et al.*, 2016).

Por otro lado, en la línea celular Huh7 se observó un incremento significativo en la producción de lípidos en el grupo con RI en comparación con el control, desgraciadamente no se encontró información relacionada entre el aumento de lípidos y RI en la literatura, sin embargo este acumulamiento de lípidos en hepatocitos se explica con el papel que juega la insulina en los hepatocitos, que además de activar vías de señalización para la lipogénesis también regula el ensamblamiento de algunas lipoproteínas (Rye, Barter, & Cochran, 2016).

Además, uno de los resultados importantes a resaltar fueron los niveles elevados de lípidos en el control de las células Huh7, en comparación con el control de la línea celular HepG2, estos datos se relacionan con los obtenidos por Gunn *et al.* (2017),

estudio en el que evaluaron los niveles transcripcionales y de proteínas, involucradas en el metabolismo de lípidos entre las células HepG2 y Huh7 cultivadas con SFB y suero humano, observando que independientemente del suero con el que sean cultivadas, las células Huh7 presentan una producción mayor de lípidos en comparación con las células HepG2 (Gunn *et al.*, 2017).

Además, para determinar en qué línea celular se observa de forma destacada la disminución de glucógeno provocada por el estado de resistencia a insulina, identificamos que en ambas líneas celulares con RI se presentó una disminución significativa de glucógeno. Respecto a los niveles en la Huh7 estos fueron similares a los obtenidos por Hsieh *et al.* (2012), quienes realizaron inducción de RI mediante la oncoproteína E2 del virus de la hepatitis C, reportando una disminución significativa de glucógeno en las células con resistencia con respecto a su control (Hsieh., *et al.*, 2012).

Por su parte, los resultados obtenidos de HepG2-RI se relacionan con los obtenidos por Lu *et al.* (2017), quienes obtuvieron una disminución en la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa, enzima que activa el proceso de síntesis de glucógeno y se relaciona directamente con la actividad de la insulina. Además, comparando los resultados obtenidos entre la línea celular Huh7 y HepG2 se observa que la disminución de glucógeno es mayor en la línea celular HepG2, este dato puede relacionarse con el análisis comparativo de Berger *et al.* (2015), al realizar un análisis *in silico* entre ambas líneas celulares, para determinar la relación que existe entre el metabolismo de glucosa y su participación en vías de señalización de cáncer hepático, observando una tasa metabólica y de proliferación elevada en la línea celular HepG2 en comparación con Huh7, característica que favorece al estado de resistencia a la insulina.

Recientemente, se ha descrito la participación de exosomas en la patogénesis y complicaciones en personas con diabetes tipo 2 (Xiao *et al.*, 2019), además, se ha vinculado el contenido de los exosomas con procesos de inflamación, desregulación de los transportadores de glucosa que favorecen el desarrollo de RI (Jeppesen *et al.*, 2019). Por lo tanto, nosotros evaluamos una posible diferencia en la cantidad de

exosomas secretados por ambas líneas celulares con y sin RI, a través de la cuantificación de la expresión de CD9, proteína específica de exosomas, observando que en ambas líneas celulares existe un ligero aumento en la expresión de CD9 en las células con RI en comparación con el grupo control, sin embargo, estos incrementos no fueron significativos, resultados que coinciden con los descritos por Lee *et al.* (2017), autores que realizaron un estudio en el que generan un modelo de hígado graso no alcohólico y por consecuencia RI en la línea celular Huh7 utilizando concentraciones elevadas de palmitato, identificando que la expresión de marcadores de exosomas como CD9 y CD63 no se modifican, sin embargo, el tratamiento con palmitato en las líneas celulares Huh7 y HepG2 incrementa el número de exosomas .

Las características que determinan si una línea celular es resistente a insulina son la disminución en la captación de glucosa y fosforilación del receptor de insulina, datos observados en la línea celular Huh7 expuesta a concentraciones elevadas de insulina, además los resultados de otros biomarcadores, como el nivel de lípidos y glucógeno, señalan a la línea celular Huh7 como un modelo de resistencia a la insulina. No obstante, es importante señalar que en la línea celular HepG2 con RI fue ligeramente mayor la disminución en la captación de glucosa, en el contenido de glucógeno y en la fosforilación del receptor, en comparación con la línea Huh7, este resultado confirma el hipermetabolismo característico de HepG2 debido a su estado cancerígeno, el cual potencia el efecto de la RI inducido por las concentraciones elevadas de insulina. Por lo anterior, proponemos a la línea Huh7 como un modelo de RI, de utilidad para estudios metabólicos y farmacológicos (Berger, Vega, Weiss-Gayet, y Géloën, 2015).

VII.- Conclusiones

Las concentraciones elevadas de insulina conducen a RI hepática en la línea celular Huh7.

La línea celular Huh7 presenta biomarcadores congruentes con las características de RI, como captación de glucosa, contenido de lípidos y de glucógeno, y la fosforilación del IR.

La línea celular Huh7 representa un mejor modelo celular para el estudio de RI en comparación con la línea celular HepG2, debido a que el hipercatabolismo de HepG2 sobreestima el efecto de la RI.

Perspectivas

Analizar el posible incremento en el número de exosomas en las líneas celulares con inducción a RI con respecto al control, como posible evento que favorece la RI.

Determinar si el contenido de los exosomas se asocia al desarrollo de RI en el modelo celular establecido.

VIII.- Referencias

Al-awar, A., Kupai, K., Veszeka, M., Szűcs, G., Attieh, Z., Murlasits, Z., Varga, C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>

Anderka, O., Boyken, J., Aschenbach, U., Batzer, A., Boscheinen, O., & Schmoll, D. (2008). Biophysical characterization of the interaction between hepatic glucokinase and its regulatory protein: Impact of physiological and pharmacological effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46). DOI: 10.1074/jbc.M805434200

Beale, E. G. (2013). Insulin Signaling and Insulin Resistance. *Journal of Investigative Medicine*, 61(1), 11–14. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e3182746f95>.

Bello-chavolla, O. Y., Rojas-martinez, R., Aguilar-salinas, C. A., & Hern, M. (2016). Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico, *Nutrition Reviews*, 75, 4–12. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw030>

Berger E, Vega N, Weiss-Gayet M, Geloan A. Gene network analysis of glucose linked signaling pathways and their role in human hepatocellular carcinoma cell growth and survival in HuH7 and HepG2 cell lines. *Biomed Res Int*. 2015;2015:821761

Berlanga, A., Guiu-Juradoa E., Porrassa J. A., Aragonèsa G., Augue T. (2016) 'Papel de las lipasas metabólicas y la lipotoxicidad en el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica', *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis. Sociedad Española de Arteriosclerosis*, 28(1), pp. 47–61. doi: 10.1016/j.arteri.2015.03.003.

Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Suzuki R, *et al*. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab*. 2008; 7(2):125-34. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.11.013

Brown, A. E., & Walker, M. (2016). Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Current Cardiology Reports*, 18(8). <https://doi.org/10.1007/s11886-016-0755-4>

Carey, M., Kehlenbrink, S. and Hawkins, M. (2013) 'Evidence for Central Regulation of Glucose Metabolism', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), pp. 34981–34988. doi: 10.1074/jbc.R113.506782

Ceelen, L., De Spiegelaere, W., David, M., De Craene, J., Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2011). Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochemical Pharmacology*, 81(10), 1255–1261.

Dadlani, V., Tamhane, S. U., Sun, A., Sharma, A., Delivanis, D. A., Thapa, P., Kudva, Y. C. (2017). High Glucose Variability in Hospitalized Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 19(10), 572–579. <https://doi.org/10.1089/dia.2017.0107>

Dodd, G. T. (2017). Insulin action in the brain: Roles in energy and glucose homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology*, 29(10), e12513. <https://doi.org/10.1111/jne.12513>

Dodson M., Kulkarni R.N., Postic C., Previs S.F., Shulman G.I., Magnuson M.A., Kahn C.R. (2000). Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell*, 6(1), 87–97. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00015-8)

Freeman, D., Hooten, N., Eitan, E., Green, J., Mode, N., Bodogai, M., Zhang, Y., Lehrmann, E., Zonderman, A., Biragyn, A., Egan, J., Becker, K., Mattson, M., Ejiogu, N. y Evans, M. (2018). Altered Extracellular Vesicle Concentration, Cargo and Function in Diabetes Mellitus. *Diabetes*, American Diabetes Association db171308. DOI: 10.2337/db17-1308

Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. (2010). General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640:1–40. DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7_1

Gunn PJ, Green CJ, Pramfalk C, Hodson L. (2017). In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. *Physiol Rep*, 5(24), e13532. <https://doi.org/10.14814/phy2.13532>.

Guo, S. (2014). Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *Journal Endocrinol*, 220(2), 1–36. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0327>.Insulin

Guo, S., Copps, K. D., Dong, X., Park, S., Cheng, Z., Poci, A., ... White, M. F. (2009). The Irs1 Branch of the Insulin Signaling Cascade Plays a Dominant Role in Hepatic Nutrient Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29(18), 5070–5083. DOI: 10.1128/MCB.00138-09

Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., ... Hall, M. N. (2012). Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metabolism*, 15(5), 725–738. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.03.015

Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R., & Granner, D. K. (2000). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30169–30175. DOI: 10.1074/jbc.M004898200

Hsieh, M. J., Lan, K. P., Liu, H. Y., Zhang, X. Z., Lin, Y. F., Chen, T. Y., & Chiou, H. L. (2012). Hepatitis C virus E2 protein involve in insulin resistance through an impairment of Akt/PKB and GSK3 β signaling in hepatocytes. *BMC Gastroenterology*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-74>

Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., ... Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428-445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>

Kasai F., Hirayama N., Ozawa M., Iemura M., Kohara A. 2016, Changes of heterogeneous cell population in the Ishikawa cell line during long-term culture; proposal of an in vitro clonal evolution model of tumor cells, *Genomics*, 107, 259–66. DOI: 10.1016/j.ygeno.2016.04.003

Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Arch Biochem Biophys*. 2015;566: 26–35. 10.1016/j.abb.2014.12.009

King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>

- Kowal EJK, Ter-Ovanesyan D, Regev A, Church GM. Extracellular vesicle isolation and analysis by western blotting. *Methods Mol Biol.* 2017;1660:143-152. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1_12
- Kumar, S., Singh, R., Vasudeva, N., & Sharma, S. (2012). Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovascular Diabetology*, 11(1), 9.
- Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2016). Microvesicles and exosomes: New players in metabolic and cardiovascular disease. *Journal of Endocrinology*, 228(2), R57–R71. DOI: 10.1530/JOE-15-0201
- Lee, Y. S., Kim, S. Y., Ko, E., Lee, J. H., Yi, H. S., Yoo, Y. J., ... Byun, K. S. (2017). Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03389-2>
- Liu J.F., Ma Y., Wang Y., Du Z.Y., Shen J.K., Peng H.L. Reduction of lipid accumulation in HepG2 cells by luteolin is associated with activation of AMPK and mitigation of oxidative stress. *Phytother Res.* 2011;25(4):588-96. DOI: 10.1002/ptr.3305
- Liu, L., Zhang, X., Chen, F., Hu, J., & Zeng, B. (2017). The establishment of insulin resistance model, 3005, 4–10. DOI: 10.1051/bioconf/2011CMSB20163005 3005
- Liu ZQ, Liu T, Chen C, Li M.Y., Wang Z.Y., Chen R.S. Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAy mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;285(1):61-70. DOI: 10.1016/j.taap.2015.03.011
- Lo, K. A., Labadorf, A., Kennedy, N. J., Han, M. S., Sing, Y., Matthews, B., ... Fraenkel, E. (2014). resistance. 5(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.039>.Analysis
- Lu, M., Satapati, S., & Chu, Q. (2014). A Noncanonical, GSK3-Independent Pathway Controls Postprandial Hepatic Glycogen Deposition, *Cell press* 18(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.001>.A
- M.J. Brill, J. Diepstraten, A. van Rongen, S. van Kralingen, J.N. van den Anker, C.A. Knibbe, Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adult and children, *Clin. Pharmacokinet.* 51 (5) (2012) 277–304 DOI: 10.2165/11599410-000000000-00000
- Magnuson, B., Ekim, B., & Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal*, 441(1), 1–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20110892>
- Maier, K., Hofmann, U., Reuss, M., & Mauch, K. (2010). Dynamics and Control of the Central Carbon Metabolism in Hepatoma Cells. *BMC Systems Biology*, 4(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-54>
- Maleckas, A., Venclauskas, L., Wallenius, V., Lönroth, H., & Fändriks, L. (2015). Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Surgery*, 104, 40–47. <https://doi.org/10.1177/1457496914561140Surgery>
- Maqsood, M. I., Matin, M. M., Bahrami, A. R., & Ghasroldasht, M. M. (2013). Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment. *Cell Biology International*, 37, 1038–1045. doi:10.1002/cbin.10137.

- Meshkani, R., & Adeli, K. (2009). Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*, 42(13–14), 1331–1346. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018>
- Monetti, M., Levin, M. C., Watt, M. J., Sajan, M. P., Marmor, S., Hubbard, B. K., ... Farese, R. V. (2007). Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metabolism*, 6(1), 69–78. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.05.005
- Müller, G. (2012). Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 5, 247–282. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S32923>
- Mullins, R. J., Mustapic, M., Goetz, E. J., & Kapogiannis, D. (2017). Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer’s disease. *Human Brain Mapping*, 38(4), 1933–1940. DOI: 10.1002/hbm.23494
- Nikolaou Nikolaos, Green Charlotte J., Gunn Pippa J., Hodson Leanne, Tomlinson Jeremy W. Optimizing human hepatocyte models for metabolic phenotype and function: effects of treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO) *Physiological Reports*. 2016;4(21):e12944. doi: 10.14814/phy2.12944.
- Ogino M, Nagata K, and Yamazoe Y (2002) Selective suppressions of human CYP3A forms, CYP3A5 and CYP3A7, by troglitazone in HepG2 cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 17:42–46. DOI <https://doi.org/10.2133/dmpk.17.42>
- Olivares Reyes, J. A. y Arellano Plancarte, A. (2008) ‘Bases moleculares de las acciones de la insulina’, *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), pp. 9–18
- Otero, Y. F., Stafford, J. M., & McGuinness, O. P. (2014). Pathway-selective insulin resistance and metabolic disease: The importance of nutrient flux. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20462–20469. DOI: 10.1074/jbc.R114.576355
- Pardo, F., Villalobos-Labra, R., Sobrevia, B., Toledo, F., & Sobrevia, L. (2017). Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.010>
- Perry RJ, Liang Peng, Gary W. Cline, Gina M. Butrico, Yongliang Wang, Xian-Man Zhang, Douglas L. Rothman, Kitt Falk Petersen, Gerald I. Shulman. Reversal of hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. *Cell Metab*. 2013;18(5):740–748. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.10.004
- Rye, K. A., Barter, P. J., & Cochran, B. J. (2016). Apolipoprotein A-I interactions with insulin secretion and production. *Current Opinion in Lipidology*, 27(1), 8–13. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000253>
- Sah, S. P., Singh, B., Choudhary, S., & Kumar, A. (2016). Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacological Reports*, 68(6), 1165–1177. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.07.010>
- Samuel, V. T. and Shulman, G. I. (2013). Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148(5), 852–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>. Integrating

Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 12–22. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>

Tomankova, V., Liskova, B., Skalova, L., Bartikova, H., Bousova, I., Jourova, L., Anzenbacher, P., Ulrichova, J. and Anzenbacherova, E. (2018). Altered cytochrome P450 activities and expression levels in the liver and intestines of the monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.04.014

Valverde, A. M., Burks, D. J., Fabregat, I., Fisher, T. L., Carretero, J., White, M. F., & Benito, M. (2003). Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes*, 52(9), 2239–2248.

Velez, M., Kohli, S., & Sabbah, H. N. (2014). MODELS OF INSULIN RESISTANCE AND HEART FAILURE. *Heart Failure Reviews*, 19(1), 10.1007/s10741–013–9387–6. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306206

Wang, L., Zhang, B., Zheng, W., Kang, M., Chen, Q., Qin, W., ... Wu, Y. (2017). Exosomes derived from pancreatic cancer cells induce insulin resistance in C2C12 myotube cells through the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. DOI: 10.1038/s41598-017-05541-4

Wang, X., Gu, C., He, W., Ye, X., Chen, H., Zhang, X., & Hai, C. (2012). Glucose oxidase induces insulin resistance via influencing multiple targets in vitro and in vivo: The central role of oxidative stress. *Biochimie*, 94(8), 1705–1717. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.03.024

Watt, M. J., Miotto, P. M., De Nardo, W., & Montgomery, M. K. (2019). The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocrine Reviews*, 40(5), 1367–1393. <https://doi.org/10.1210/er.2019-00034>

Windemuller F, Xu J, Rabinowitz SS, Hussain MM, Schwarz SM. Lipogenesis in Huh7 cells is promoted by increasing the fructose: glucose molar ratio. *World J. Hepatol.* 2016;8:838. doi: 10.4254/wjh.v8.i20.838

Xiao, Y., Zheng, L., Zou, X., Wang, J., Zhong, J., & Zhong, T. (2019). Extracellular vesicles in type 2 diabetes mellitus: key roles in pathogenesis, complications, and therapy. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1625677>

Ying, W., Riopel, M., Bandyopadhyay, G., Dong, Y., Birmingham, A., Seo, J. B., ... Olefsky, J. M. (2017). Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate in Vivo and in Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*, 171(2), 372–384.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.035

Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;64(3):207-15. DOI: 10.1016/j.jbbm.2005.08.001