

Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

_____ Artículo Original _____

Ceramida como mediador de la resistencia a insulina producida por el factor de necrosis tumoral alfa en adipocitos marrones*

ROSARIO HERNANDEZ, TERESA TERUEL Y MARGARITA LORENZO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040-Madrid.

RESUMEN

La resistencia a la acción de la insulina es la característica fundamental de la Diabetes tipo 2, que afecta al 6% de la población, siendo la Obesidad el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la misma. El nexo de unión entre ambas patologías puede ser el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, una citoquina antilipogénica secretada por el propio tejido adiposo. En estudios previos hemos demostrado que el TNF-alfa produce resistencia a la insulina en adipocitos marrones fetales en cultivo primario. TNF-alfa activa varias cascadas de señalización incluyendo la estimulación de esfingomielinasas y la producción de ceramidas tras 30 min de tratamiento. Hemos estudiado el efecto de un análogo de ceramida permeable, de cadena corta (C2-ceramida) añadido exógenamente, sobre los efectos metabólicos de la insulina y su señalización. Este compuesto completamente impide la estimulación del transporte de glucosa por insulina, impidiendo la translocación de GLUT4 a la membrana, tanto determinada por Western blot o por la localización inmunofluorescente de GLUT4. El pretratamiento de las células con C2-ceramida previno la fosforilación de Akt total y de las dos isoformas expresadas en los adipocitos marrones, Akt1 y Akt2, pero no inhibió la actividad PI3-quinasa total ni la activación de PKCzeta. La ceramida está activando una fosfatasa implicada en

* Premio "ex aequo" del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Año 2001

defosforilar Akt, como se desprende de las observaciones siguientes: 1) el tratamiento con ceramida o con TNF-alfa aumenta la actividad fosfatasa PP2A, 2) el tratamiento con ácido okadaico junto con ceramida restaura completamente la fosforilación de Akt por insulina y 3) la transfección transitoria de una forma constitutivamente activa de Akt no restablece la fosforilación de Akt. Estos resultados indican que la ceramida producida por el TNF-alfa induce un estado de resistencia a insulina en los adipocitos marrones, manteniendo Akt en un estado defosforilado e inactivo.

Palabras clave: Transporte de glucosa-TNF-ceramida-adipocito-Resistencia a Insulina

SUMMARY

Ceramide mediates Insulin resistance by Tumor Necrosis Factor alpha in brown adipocytes

Tumor necrosis factor (TNF) alpha caused insulin resistance on glucose uptake in fetal brown adipocytes. We have explored the hypothesis that some effects of TNF-alpha could be mediated by the generation of ceramide, since TNF-alpha treatment induced the production of ceramide in these primary cells. A short-chain ceramide analogue, C2-ceramide, completely precluded insulin-stimulated glucose uptake and insulin-induced GLUT4 translocation to plasma membrane, either determined by Western blot or by immunofluorescent localization of GLUT4. These effects were not produced in the presence of a biologically inactive ceramide analogue, C2-dihydroceramide. Analysis of the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase signaling pathway indicated that C2-ceramide was precluding insulin stimulation of Akt kinase activity, but neither PI3-kinase nor PKCzeta activities. C2-ceramide completely abolished insulin-stimulated Akt/PKB phosphorylation on both regulatory residues Thr308 and Ser473 as TNF-alpha did, as well as inhibited insulin-induced mobility shift in Akt1 and Akt2 separated in PAGE. Moreover, C2-ceramide seems to be activating a phosphatase involved in dephosphorylating Akt since 1) a PP2A activity was increased in C2-ceramide and TNF-alpha-treated cells, 2) treatment with okadaic acid concomitantly with C2-ceramide completely restored Akt phosphorylation by insulin and 3) transient transfection of a constitutively active form of Akt did not restore Akt activity. Our results indicate that ceramide produced by TNF-alpha induced insulin resistance in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state.

Key words: Glucose transport-TNF-ceramide-adipocyte-Insulin resistance

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica con múltiples defectos metabólicos, caracterizada por hiperglucemia resultante de una inadecuada actividad de la insulina. Se distinguen dos tipos fundamentales de diabetes: Diabetes tipo 1 o insulino-dependiente, desorden en el que existe un defecto en la producción de insulina debido a una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, y la Diabetes tipo 2 o insulino-independiente (NIDDM), con un componente de predisposición genética, pero en la que el estilo de vida, la edad y la Obesidad juegan un papel muy importante para el inicio y severidad de la enfermedad. La Diabetes tipo 2 comienza con una disminución en la sensibilidad de los tejidos periféricos (hígado, tejido adiposo, músculo) a la insulina circulante. El organismo responde con un aumento en la secreción basal y post-prandial de insulina por el páncreas dando como resultado una situación de hiperglucemia e hiperinsulinemia que termina por provocar fallo pancreático y pérdida de la secreción de insulina (Figura 1).

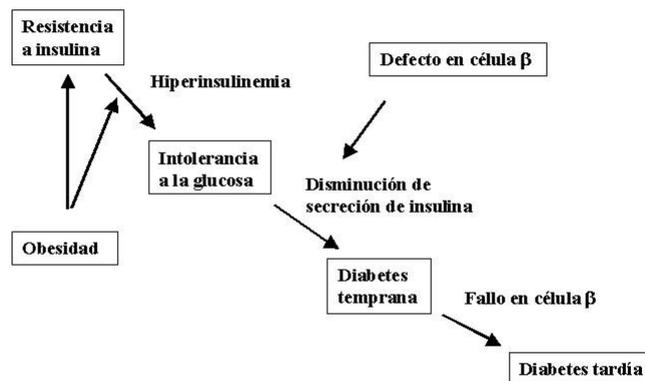


Figura 1.- Etapas en el desarrollo de la Diabetes tipo 2

La organización mundial de la salud (OMS) considera la Diabetes como una epidemia global. En 1995 el número de enfermos diagnosticados de Diabetes ascendía a 110 millones, siendo de tipo 2 en el 95% de los casos. La Diabetes Mellitus se asocia con un elevado riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y actualmente se considera la cuarta causa de muerte por enfermedad en los Estados Unidos. Por todo ello se están realizando grandes esfuerzos de investigación encaminados a prevenir la Diabetes tipo 2 y al desarrollo de nuevos fármacos que impidan la progresión de la misma. Para ello, es importante conocer las bases mole-

culares de esta patología. El primer defecto que ocurre es una resistencia generalizada a la acción de la insulina, impidiendo la captación de glucosa por los tejidos periféricos (músculo esquelético, y tejidos adiposos, tanto blanco como marrón), que en condiciones fisiológicas responden a dicha hormona por tener receptores para la misma y expresar el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 [1]. Tanto factores genéticos como adquiridos pueden influir en la sensibilidad a la insulina. En el primer caso la carencia de receptores de insulina (IR) produce resistencia a la insulina y muerte fulminante por cetosis inmediatamente tras el nacimiento, sin embargo el conjunto de casos de NIDDM por mutaciones en el IR representa entre un 1-5% del total de casos descritos en la literatura científica, por lo que no parece una causa esencial de resistencia a la insulina en pacientes diabéticos [2]. La Diabetes tipo 2 se considera una enfermedad poligénica, y los modelos animales con inactivación funcional de genes blanco de señalización generados por recombinación homóloga nos da idea de la complejidad de la enfermedad. Los ratones delecionados para el IR presentan un desarrollo intrauterino normal pero mueren rápidamente tras el nacimiento por cetosis [3]. La inactivación específica de IR en el músculo (ratón MIRKO) produce una resistencia moderada a la insulina, pero los animales no llegan a desarrollar diabetes, posiblemente porque los receptores de IGF-I sean capaces de compensar [4]. Por el contrario, la deleción específica del IR en el tejido adiposo marrón (BATIRKO) da un fenotipo diabético sin resistencia a insulina [5]. Sin embargo la inactivación funcional de ambos receptores para IGF-I e insulina en el músculo (ratón MKR) produce resistencia a insulina y diabetes, estando fuertemente afectado el transporte de glucosa tanto en músculo como en el tejido adiposo marrón [6]. Curiosamente, mientras que el animal delecionado para GLUT4 no sufría diabetes, sin embargo la ablación específica de GLUT4 en el músculo o en el tejido adiposo produce una severa intolerancia a la glucosa [7] [8]. Estos datos de modelos animales nos indican la importancia de identificar nuevos factores que estimulen el transporte de glucosa en células musculares y adiposas. La Obesidad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la diabetes tipo 2 [9]. Los obesos humanos presentan niveles de expresión disminuidos del receptor de insulina, y de IRS-1 en casos severos [10], así como presentan estas proteínas fosforiladas en Ser, lo que atenúa la fosforilación en Tyr

por la insulina. También se han descrito casos donde la actividad tirosina fosfatasa PTP1B estaba aumentada [11]. Esto hace pensar que además de factores genéticos, existen factores adquiridos que pueden contribuir a la resistencia a la acción de la insulina. Entre ellos destacan la hiperinsulinemia, la propia hiperglucemia [10] así como los metabolitos derivados de la ruta de las hexosaminas.

Los factores secretados por el tejido adiposo, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), leptina y la recientemente descrita resistina [12], o los ácidos grasos libres procedentes de la lipólisis del mismo, son importantes candidatos para causar resistencia a la acción de la insulina [13]. Se ha propuesto al TNF-alfa como el nexo de unión entre adiposidad y desarrollo de resistencia a insulina ya que 1) la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos y tienen aumentada la expresión de TNF-alfa en sus adipocitos y 2) los animales obesos delecionados para la función del TNF-alfa no desarrollan resistencia a la insulina [14]. Se ha descrito que el TNF-alfa produce la fosforilación en Ser del IRS-1 prohibiendo su fosforilación en Tyr por la insulina [15]. Muy recientemente se ha generado un animal transgénico en el que la inactivación funcional de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) protege contra la resistencia a la insulina muscular inducida por obesidad [16]. Por otro lado los ácidos grasos son también importantes candidatos a mediar la resistencia a insulina en obesidad. Su acción puede ser a través de la formación de ceramidas, o bien induciendo la activación de una cascada de quinasas que implique a la IKKbeta [17]. En este sentido se ha descrito hace solo unos meses que en animales obesos dosis altas de salicilato, capaces de inhibir el factor nuclear NFkB y su activador IKKbeta, representan un tratamiento potencial para la diabetes [18]. Las tiazolidindionas (TZD) son fármacos sensibilizadores a la acción de la insulina que actúan a través de su unión al factor de transcripción PPARgamma, aunque el mecanismo por el que median la sensibilización a la acción de la insulina no está todavía definido [19]. Estudios “in vivo” demuestran que tratamientos crónicos con estos compuestos aumentan la expresión de PPAR gamma en el músculo [20] y mejoran los efectos metabólicos de la insulina en ratas obesas resistentes a la acción de la insulina [21].

Las rutas de señalización de la insulina que participan en el transporte de glucosa no están totalmente establecidas: la vía de la fosfatidil inositol (PI) 3-quinasa ha demostrado ser necesaria pero no suficiente y otras vías paralelas han sido recientemente propuestas. Los efectores por debajo de PI3-quinasa implicados en el transporte de glucosa son controvertidos. Existen datos a favor y en contra de Akt y de la isoforma atípica de la proteína quinasa C (PKC) zeta como mediadores de los efectos de la insulina sobre la translocación de GLUT4. Por otro lado tampoco se conoce con exactitud como dichas vías pueden estar alteradas durante la resistencia a la insulina, aunque acabamos de apuntar algunos de los pasos de señalización que se pueden ver comprometidos.

Los adipocitos marrones fetales en cultivo primario son un excelente sistema celular para el estudio de la implicación de las diferentes vías de señalización de la insulina en procesos como proliferación, diferenciación, supervivencia, y transporte de glucosa, puesto que presentan un elevado número de receptores de insulina y responden a ella a concentraciones fisiológicas [22]. Estudios previos de nuestro grupo de investigación habían establecido la implicación de la ruta de PI3-quinasa en la expresión génica de GLUT4 por insulina en cultivos primarios de adipocitos marrones [23]. Entre las dianas que se conocen por debajo de PI3-quinasa que podrían estar implicadas en el transporte de glucosa inducido por insulina, se encuentran la Ser/Thr quinasa Akt/PKB y la PKCzeta. En este sentido, PKCzeta se ha descrito recientemente como un eslabón importante en la ruta de la insulina que conduce al aumento en la captación de glucosa tanto en los adipocitos blancos [24] como en los marrones [25]. Sin embargo, la implicación de Akt en dicho proceso no había sido explorada. Datos de nuestro laboratorio indican que el TNF-alfa también produce resistencia a insulina en adipocitos marrones, ya que bloquea la acción de la insulina a nivel de IRS-2, por lo que pensamos explorar más en profundidad este mecanismo [26].

En este trabajo nos hemos planteado estudiar la implicación de Akt/PKB en la regulación por insulina del transporte de glucosa y de la expresión génica de GLUT4 en adipocitos marrones fetales de rata en cultivo primario. Un segundo aspecto que nos ha interesado investigar es el mecanismo de inducción de resistencia a la insulina por TNF-alfa sobre

el transporte de glucosa y sobre la expresión génica de GLUT4 en adipocitos marrones a través de la generación de ceramidas.

RESULTADOS Y DISCUSION

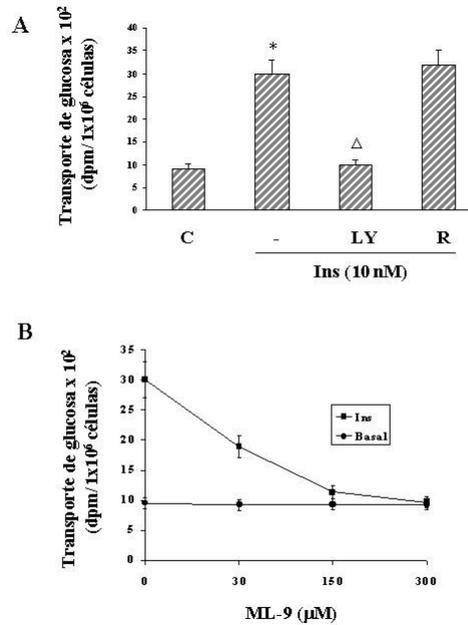
IMPORTANCIA DE AKT/PKB EN LA REGULACIÓN POR INSULINA DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUT4 EN ADIPOCITOS MARRONES FETALES DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO

Como el transporte de glucosa en adipocitos marrones fetales es estimulado por la insulina, quisimos estudiar en primer lugar si era inhibido en presencia de inhibidores químicos de la ruta de señalización de la insulina. Para ello, partimos de un cultivo primario de adipocitos marrones fetales cultivados en un medio con 10% de suero fetal durante 5 horas. A continuación se retiró el suero a las células y se mantuvieron durante 20 horas en un medio suplementado con 0.2% de BSA. Para la medida del transporte de glucosa las células control o pretratadas durante 30 minutos con LY294002 10 μ M o rapamicina 25 ng/ml en el medio KRP, se estimularon con insulina 10 nM durante 30 minutos. La incorporación de 2-deoxi-D-(1- H^3) glucosa se midió durante los últimos 10 minutos del cultivo. La figura 2A muestra que las células tratadas con insulina presentan un aumento en la incorporación de glucosa de tres veces respecto a las células control. Por otra parte el compuesto LY494002, que inhibe la actividad PI3-quinasa estimulada por insulina y consecuentemente la fosforilación de las dianas que están por debajo de ella, como Akt/PKB y p70S6 quinasa inhibe completamente los efectos de la insulina sobre el transporte de glucosa. La proteína p70S6 quinasa es fosforilada en respuesta a insulina, sin embargo bloqueando únicamente su fosforilación con la rapamicina no se observan cambios en la incorporación de glucosa inducida por insulina. Estos resultados indican que la insulina aumenta el transporte de glucosa en los adipocitos marrones a través de una vía de señalización que implica a la PI3-quinasa y a otras dianas situadas por debajo de ella diferentes de p70S6 quinasa.

Utilizando un compuesto químico (ML-9) recientemente propuesto como inhibidor de la actividad Akt, [27] pudimos comprobar que efectivamente en los adipocitos marrones en cultivo dicho compuesto

tivamente en los adipocitos marrones en cultivo dicho compuesto inhibía tanto la fosforilación de Akt en el residuo Ser 473 como su actividad en respuesta a insulina, sin afectar a la actividades PI3-quinasa ni PKC zeta [28]. El transporte de glucosa inducido por insulina, medido mediante la incorporación de 2-deoxi-D-(1-H³) glucosa a las células, se vio totalmente bloqueado en células pretratadas con dicho inhibidor (Fig. 2B).





La insulina estimula la incorporación de glucosa a las células principalmente por su capacidad de reclutar el transportador de glucosa GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la superficie celular. Por ello quisimos determinar si los efectos inhibitorios del ML-9 en el transporte de glucosa inducido por insulina eran debidos al bloqueo de la capacidad de la insulina para translocar el transportador GLUT4. Utilizamos dos aproximaciones distintas: 1.- medida de la cantidad de GLUT4 en las fracciones subcelulares de membrana interna y membrana plasmática por Western blot en adipocitos marrones pretratados con el inhibidor y posteriormente estimulados con insulina, y 2.- estudios de translocación por inmunofluorescencia en células HeLa cotransfectadas con el plásmido de expresión GFP-GLUT4 (GLUT4 unido a una proteína verde fluorescente, que permite visualizar su localización mediante microscopía de fluorescencia) y con la construcción dominante negativa de Akt [29] (Fig. 3). Los resultados de dichos experimentos confirmaron que la activación de

Akt es necesaria para el transporte de glucosa y la translocación de GLUT4 inducidos por insulina en los adipocitos marrones fetales.

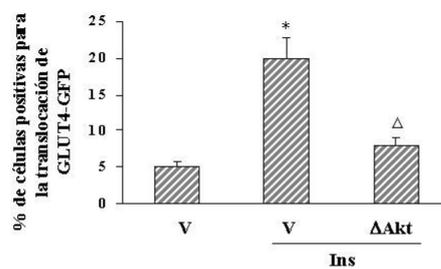


Figura 3.- Akt con actividad dominante negativa (Δ Akt) inhibe la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática inducida por insulina.

Las células HeLa se cotransfectaron transitoriamente con 10 μ g de GLUT4-GFP y 10 μ g de Δ Akt o 10 μ g del vector vacío (V). A continuación las células se cultivaron durante 24 horas en un medio de cultivo con 10% de suero fetal, se privaron de suero durante una noche y se incubaron en presencia o ausencia de insulina 500 nM (Ins) durante 30 minutos para visualizar la translocación de GLUT4-GFP por microscopía de fluorescencia. Las células se consideraron positivas para la translocación de GLUT4 si se observaba un anillo de fluorescencia en la periferia celular. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas (medias \pm SEM de 4 experimentos distintos). El estudio para calcular el grado de significación estadística se ha realizado como en la Fig. 2. Las diferencias entre los valores en presencia de insulina vs. controles se representan por (*) y las diferencias entre los valores en presencia de insulina más Δ Akt vs. insulina se representan por (Δ); *, Δ p<0.01.

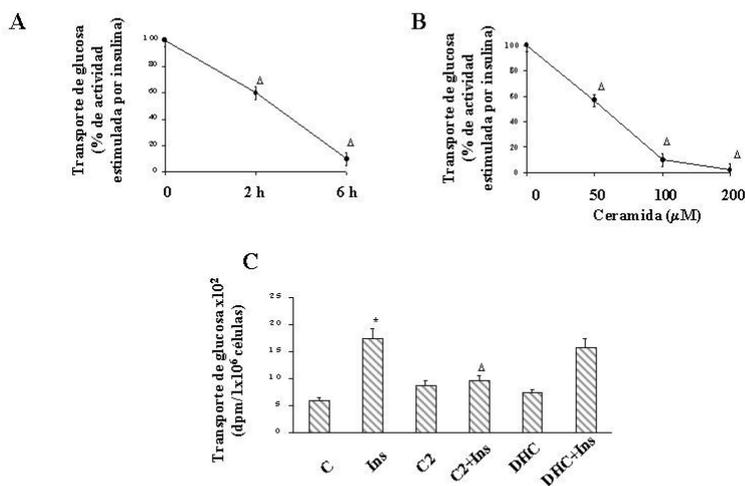
Además de los efectos agudos de la insulina sobre la translocación de GLUT4, el transporte de glucosa en los tejidos insulino-dependientes también puede estar regulado por cambios en la expresión génica de los transportadores de glucosa inducidos por tratamientos crónicos con insulina. En este sentido nuestro grupo de investigación había descrito previamente que la insulina aumenta la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones de manera dependiente de PI3-quinasa. Puesto que Akt está situada por debajo de PI3-quinasa, quisimos investigar la posible implicación de Akt en dicho efecto. Con ese propósito bloqueamos la actividad Akt mediante el empleo del inhibidor químico ML-9 y realizamos ensayos de Northern blot para medir la cantidad del mRNA de GLUT4 en respuesta a insulina. Asimismo, para determinar si los efectos eran a nivel de la transcripción del gen, cotransfectamos las células con la construcción GLUT4-CAT (donde el gen CAT está bajo el control del promotor de GLUT4), y con el plásmido de expresión para la proteína Akt con actividad dominante negativa. Los resultados obtenidos en dichos experimentos demostraron que, por debajo de PI3-quinasa, Akt participa en la vía de señalización implicada en los efectos crónicos de la insulina que conllevan a un aumento en la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones.

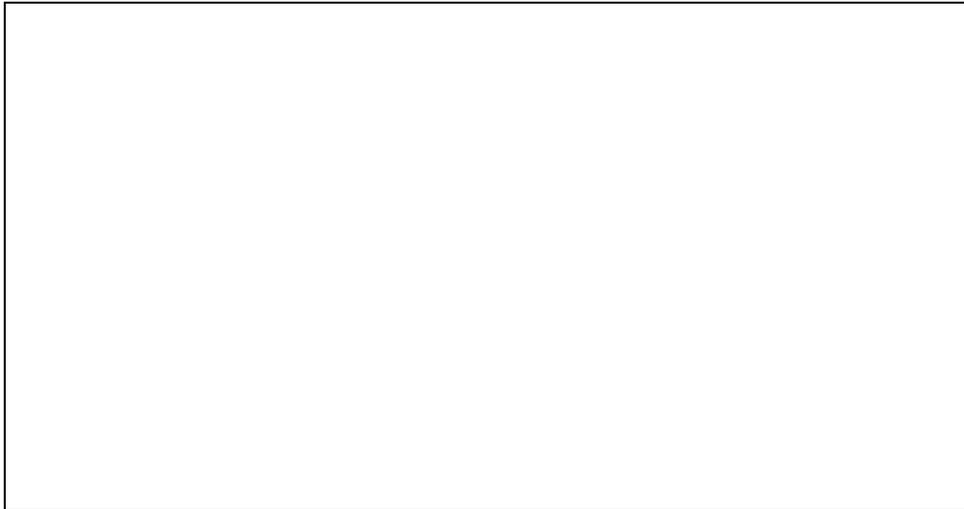
MECANISMO DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA POR TNFALFA EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA Y EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUT4 EN ADIPOCITOS MARRONES A TRAVÉS DE LA GENERACIÓN DE CERAMIDAS.

Como se ha comentado anteriormente, la Resistencia a la acción de la insulina es la característica fundamental de la Diabetes tipo 2, y dicho defecto se ha relacionado estrechamente con la Obesidad. El nexo de unión entre ambas patologías puede ser el TNF-alfa, una citoquina antilipogénica secretada por el propio tejido adiposo. Se ha demostrado previamente que la expresión del TNF-alfa en tejido adiposo está elevada en una variedad de modelos experimentales de obesidad y en personas

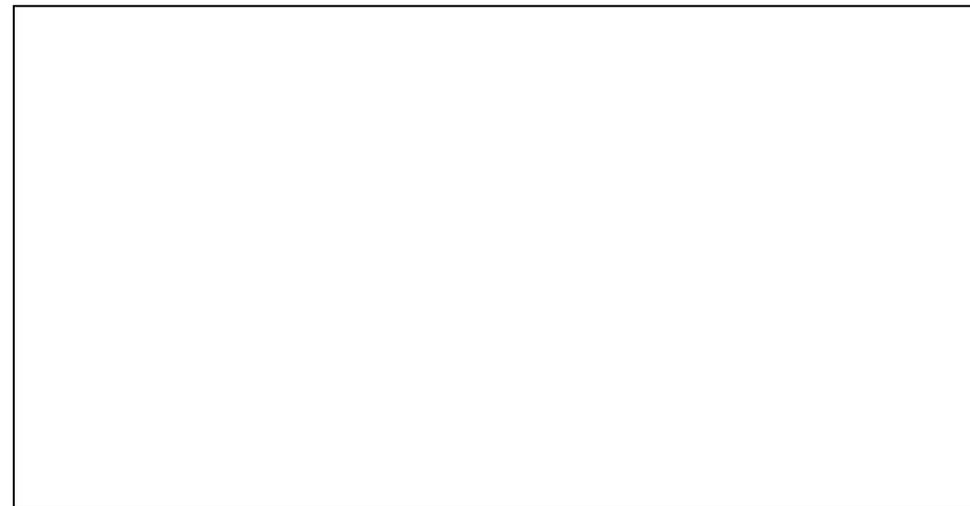
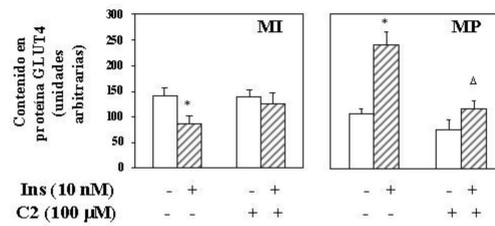
obesas. Ratones deficientes en TNF-alfa (TNF- $\alpha^{-/-}$) donde se les indujo la obesidad de modo genético o a través de una dieta rica en grasa, no presentaban resistencia a la acción de la insulina viendo mejorada la sensibilidad a la misma. Además estos ratones presentaban niveles bajos de ácidos grasos libres circulantes pudiendo resultar esto de la pérdida de los efectos lipolíticos del TNF-alfa en el tejido adiposo, o alternativamente podría reflejar el aumento de la eficiencia de la insulina para suprimir la lipólisis en ausencia de TNF-alfa [14]. Estos resultados indican que el TNF-alfa es un importante mediador de la resistencia a la acción de la insulina en la obesidad. El TNF-alfa actúa por unión a receptores de membrana, activando varias cascadas de señalización, entre ellas la activación de esfingomielinasas que hidrolizan la esfingomielina para dar lugar a ceramidas, que podrían ser el mediador celular de los efectos biológicos del TNF-alfa. Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el TNF-alfa produce resistencia a la insulina en adipocitos marrones fetales en cultivo primario, disminuyendo el transporte de glucosa inducido por insulina y la expresión génica de GLUT4 estimulada por insulina [26]. Nosotros nos propusimos estudiar si las ceramidas mediaban la inhibición del TNF-alfa sobre los efectos agudos y crónicos ejercidos por la insulina en los adipocitos marrones fetales. En primer lugar, comprobamos si en este sistema celular, el TNF-alfa inducía la producción de ceramidas. Para ello, las células fueron tratadas con TNF-alfa (0,6 nM) a distintos tiempos (0, 15, 30, 60 min, 6 y 24 horas) y la cantidad intracelular de ceramidas se midió mediante tratamiento de la fracción lipídica con el enzima diacilglicerol quinasa, capaz de fosforilar tanto el diacilglicerol (dando lugar a ácido fosfatídico), como las ceramidas (generando ceramida-1-fosfato). El TNF-alfa produjo un pico máximo de ceramidas a los 30 min volviendo a niveles basales al cabo de 1h, para volver a incrementarse a las 6 horas y permanecer elevados tras 24 horas de tratamiento. El primer pico de generación de ceramida puede ser debido a la activación por TNF-alfa de una esfingomielinasa como se ha propuesto por varios autores, mientras que el aumento de los niveles de ceramida a tiempos más largos de tratamiento con TNF-alfa (6 y 24 horas) podría ser el resultado de la síntesis *de novo* a partir de ácidos grasos como consecuencia del efecto lipolítico del TNF-alfa en el tejido adiposo.

Puesto que en respuesta a TNF-alfa, se produce un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas, se planteó la hipótesis de que dichas ceramidas podrían mediar algunos efectos del TNF-alfa en los adipocitos marrones. Estudiamos en primer lugar los efectos de las ceramidas añadidas exógenamente a distintos tiempos y diferentes dosis sobre el transporte de glucosa. Debido a la naturaleza hidrofóbica de las ceramidas naturales, éstas son muy insolubles, por lo que empleamos un análogo de ceramida permeable de cadena corta, denominado C2-ceramida, así como un análogo biológicamente inactivo (C2-dihidroceramida) como control negativo. El transporte de glucosa inducido por insulina se vio inhibido tras pretratamiento de las células con C2-ceramida de forma dependiente del tiempo y de la dosis, siendo 6 horas de pretratamiento y la dosis de 100 μ M las condiciones de máxima inhibición (100%) y por tanto las utilizadas en todos los experimentos posteriores (Fig. 4). Por el contrario la C2-dihidroceramida no afectó el transporte de glucosa.





Los resultados obtenidos con ceramida en el transporte de glucosa fueron corroborados con experimentos de translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por técnicas de inmunofluorescencia y de fraccionamiento celular, en los que se comprobó que la inducción de la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática por insulina no se producía en células pretratadas con C2-ceramida (Fig. 5).



Como la ceramida afectaba al transporte de glucosa y a la translocación de GLUT4 estimulados por insulina, quisimos estudiar a conti-

nuación a que nivel de la ruta de señalización por la que la insulina ejerce dichos efectos estaba actuando la ceramida. Por ello determinamos en primer lugar la actividad de la PI3-quinasa tras estimulación con insulina en células pretratadas con ceramida. La ceramida no modificó la estimulación por insulina de PI3-quinasa, tanto la asociada a IRS-1 como a IRS-2 indicando que la ceramida no interfiere con la insulina a este nivel. Por debajo de PI3-quinasa, la siguiente diana estudiada fue Akt. Akt/PKB se fosforila fuertemente en el residuo Ser473 y algo menos en Thr308 tras estimulación con insulina. Ambas fosforilaciones son necesarias para la activación de dicha enzima. Sin embargo, tras el pretratamiento de las células con C2-ceramida la insulina no fue capaz de fosforilar ni activar Akt, mientras que el análogo inactivo C2-dihidroceramida no produjo ningún efecto negativo. Puesto que los adipocitos marrones expresan la proteína PKCzeta que también ha sido relacionada con el transporte de glucosa estimulado por insulina, analizamos si las ceramidas estaban afectando su actividad enzimática. Sin embargo, C2-ceramida no sólo no inhibió la activación de PKCzeta por insulina sino que la estimuló *per se*, siendo el efecto aditivo en presencia de los dos tratamientos. Ya se había descrito anteriormente que la ceramida por sí sola estimulaba la actividad PKCzeta [30]. Por ello estos resultados excluyen a la PKCzeta como diana de la ceramida para producir resistencia a la acción de la insulina.

El tratamiento con ceramida inhibió la actividad Akt/PKB, pero no la actividad PI3-quinasa ni PKCzeta, por lo que decidimos investigar los mecanismos de esa inhibición. Nos planteamos dos posibles mecanismos para explicar los efectos de la ceramida: La ceramida podría estar inhibiendo la actividad PDK1 y PDK2 necesarias para la fosforilación y posterior activación de Akt/PKB y/o, podría estar activando una fosfatasa que defosforilase Akt/PKB y por lo tanto estuviese inhibida la actividad de Akt/PKB. El primer posible mecanismo fue descartado tras analizar la actividad de Akt/PKB en células transfectadas con un plásmido de expresión para una forma permanentemente activa de Akt/PKB (pSG5-PKB_{gag}, GagAkt) y comprobar que la actividad Akt/PKB presente en las células control transfectadas estaba inhibida tras el tratamiento con ceramida. La segunda hipótesis fue estudiada impidiendo la defosforilación de Akt/PKB con un inhibidor de serina/treonina fosfatasas, el ácido okada-

co. El pretratamiento conjunto de ácido okadaico más C2-ceramida restauró completamente la fosforilación por insulina de Akt/PKB en los dos residuos de Ser473 y Thr308 que se ve inhibida completamente en las células pretratadas con C2-ceramida sólo. Estos resultados muestran que la ceramida es capaz de inhibir también la forma constitutivamente activa de Akt/PKB; mientras que la defosforilación de Akt/PKB por ceramida se revierte al tratar las células con un inhibidor de proteínas fosfatasas (ácido okadaico) [31]. En este sentido podríamos concluir que la ceramida inhibe la ruta de señalización de la insulina responsable de la translocación de GLUT4, manteniendo a Akt/PKB en un estado inactivo y defosforilado (Fig. 6).

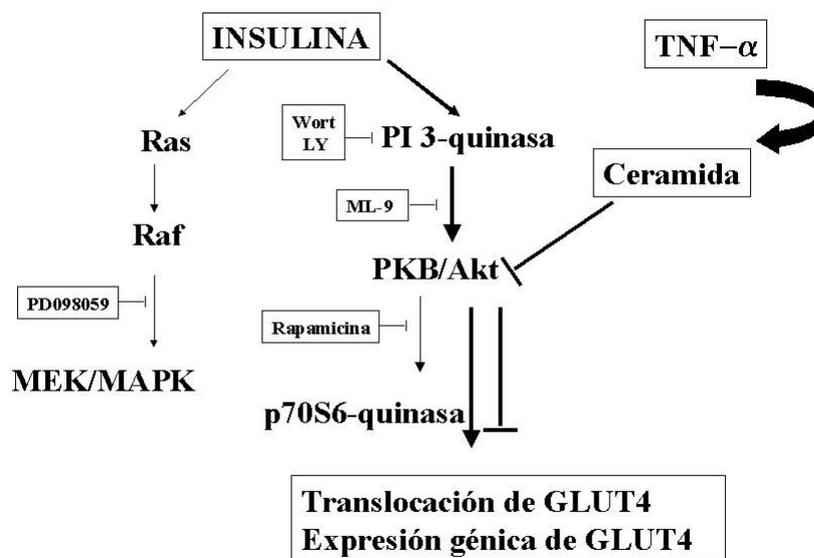


Figura 6. – Rutas de señalización implicadas en el transporte de glucosa insulín dependiente: Resistencia a la insulina por TNF-alfa

En líneas celulares adipogénicas como 3T3-L1, el TNF-alfa inhibe el proceso de diferenciación adipogénica, previniendo la expresión de genes específicos de adipocitos, entre ellos el gen de GLUT4. Quisimos estudiar el efecto del TNF-alfa y su mediador, la ceramida, en la señalización de la insulina que conduce a la expresión génica de GLUT4 en los adipocitos marrones fetales. Realizando ensayos de Northern blot comprobamos que el tratamiento con TNF-alfa o C2-ceramida por sí solos no modificaba la expresión basal de mRNA de GLUT4 pero disminuía completamente la acumulación de GLUT4 inducida por insulina. Estos resultados indicaban que tanto TNF-alfa como C2-ceramida estaban interfiriendo en la regulación transcripcional de este gen por insulina. En consecuencia decidimos estudiar el efecto de ambos compuestos en la transactivación del promotor de GLUT4 mediante el empleo de la construcción GLUT4-CAT. El tratamiento con insulina de células transfectadas produjo un incremento de seis veces en la actividad CAT. Sin embargo, la transactivación del promotor de GLUT4 estimulada por insulina no se produjo en presencia de TNF-alfa o C2-ceramida. Los factores de transcripción específicos involucrados en la transactivación por insulina del promotor de GLUT4 no han sido todavía identificados, pero se ha descrito la existencia de elementos de respuesta a los factores de transcripción de la familia de los C/EBPs en el promotor del gen de GLUT4. Además se ha comprobado que el TNF- α reduce los niveles de C/EBP α en líneas celulares adipocíticas 3T3-L1 [32], por lo que decidimos estudiar el efecto del TNF-alfa/ceramida en la acumulación del mRNA de C/EBP α por Northern blot. El tratamiento con insulina durante 24 horas produjo una inducción en los niveles de expresión de C/EBP α , siendo este efecto totalmente inhibido por el tratamiento con TNF-alfa o C2-ceramida. Estos resultados coinciden con la disminución del mRNA de GLUT4 tras la estimulación con los mismos factores y sugieren la posible existencia de un mecanismo indirecto por el cual la ceramida interfiere en la ruta de señalización de la insulina inactivando Akt/PKB y posiblemente su translocación al núcleo tal y como proponen Salinas y col. [33] causando una disminución en la expresión del factor de transcripción C/EBP α necesario para la expresión génica de GLUT4.

En conclusión, la secreción de TNF-alfa por el tejido adiposo blanco de personas obesas relaciona la obesidad con el desarrollo de resistencia a la insulina. Esta citoquina activa esfingomielinasas a corto plazo produciendo ceramidas, mientras que a largo plazo tiene efectos lipolíticos en el tejido adiposo generando ácidos grasos libres necesarios para la síntesis de ceramidas. Estas ceramidas podrían mediar la resistencia a la insulina en células musculares y en adipocitos blancos tal y como ha sido propuesto, y como exponemos en este trabajo en los adipocitos marrones. El mecanismo por el que las ceramidas producen resistencia a la insulina en adipocitos marrones es porque mantienen Akt/PKB en un estado inactivo y defosforilado, impidiendo su función fisiológica en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y en la expresión génica de GLUT4. Además, como las ceramidas producen apoptosis en muchos tipos celulares, podrían causar apoptosis en las células beta pancreáticas, un sistema celular donde los ácidos grasos inhiben la supervivencia. Esta situación podría contribuir a la patogénesis de la Diabetes tipo 2 en pacientes obesos.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo se ha realizado con la ayuda de un proyecto de la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Programa Sectorial de PGC. Ministerio de Ciencia y Tecnología. PM98/0082. Rosario Hernandez disfruta de una beca de FPU del Ministerio de Educación y Cultura. Teresa Teruel es becaria postdoctoral de la Comunidad Autónoma de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) PESSIN, J.E. AND SALTIEL, A.R. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 106:165-169.
- (2) KAHN, C.R., VICENT, D. AND DORIA, A. (1996) Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu.Rev.Med.* 47:509-531.

- (3) ACCILI, D., DRAGO, J., LEE, E.J., JOHNSON, M.D., COOL, M.H., SALVATORE, P., ASICO, L.D., JOSE, P.A., TAYLOR, S.I. AND WESTPHAL, H. (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat.Genet.* 12: 106-109.
- (4) BRUNING, J.C., MICHAEL, M.D., WINNAY, J.N., HAYASHI, T., HORSCH, D., ACCILI, D., GOODYEAR, L.J. AND KAHN, C.R. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569.
- (5) GUERRA, C., NAVARRO, P., VALVERDE, A.M., ARRIBAS, M., BRUNING, J., KOZAK, L.P., KAHN, C.R. AND BENITO, M. (2001) Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108: 1205-1213.
- (6) FERNANDEZ, A.M., KIM, J.K., YAKAR, S., DUPONT, J., HERNANDEZ-SANCHEZ, C., CASTLE, A.L., FILMORE, J., SHULMAN, G.I. AND LE ROITH, D. (2001) Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev* 15:1926-1934.
- (7) ZISMAN, A., PERONI, O.D., ABEL, E.D., MICHAEL, M.D., MAUVAIS-JARVIS, F., LOWELL, B.B., WOJTASZEWSKI, J.F., HIRSHMAN, M.F., VIRKAMAKI, A., GOODYEAR, L.J., KAHN, C.R. AND KAHN, B.B. (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6:924-928.
- (8) ABEL, E.D., PERONI, O., KIM, J.K., KIM, Y.B., BOSS, O., HADRO, E., MINNEMANN, T., SHULMAN, G.I. AND KAHN, B.B. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733.
- (9) KAHN, B.B. AND FLIER, J.S. (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481.
- (10) VIRKAMAKI, A., UEKI, K. AND KAHN, C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 103:931-943.
- (11) SALTIEL, A.R. AND KAHN, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- (12) STEPPAN, C.M. AND LAZAR, M.A. (2002) *Resisting and obesity-associated insulin resistance.* Trends Endocrinol Metab 13:18-23.
- (13) HOTAMISLIGIL, G.S. (1999) *Mechanisms of TNF-alfa-induced insulin resistance* [see comments]. Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes 107:119-125.

- (14) UYSAL, K.T., WIESBROCK, S.M., MARINO, M.W. AND HOTAMISLIGIL, G.S. (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610-614.
- (15) RUI, L., AGUIRRE, V., KIM, J.K., SHULMAN, G.I., LEE, A., CORBOULD, A., DUNAIF, A. AND WHITE, M.F. (2001) Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 107:181-189.
- (16) PERREAULT, M. AND MARETTE, A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-1143.
- (17) YUAN, M., KONSTANTOPOULOS, N., LEE, J., HANSEN, L., LI, Z.W., KARIN, M. AND SHOELSON, S.E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 293:673-1677.
- (18) KIM, J.K., KIM, Y.J., FILLMORE, J.J., CHEN, Y., MOORE, I., LEE, J., YUAN, M., LI, Z.W., KARIN, M., PERRET, P., SHOELSON, S.E. AND SHULMAN, G.I. (2001) Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-446.
- (19) OLEFSKY, J.M. (2000) Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest* 106:467-472.
- (20) PARK, K.S., CIARALDI, T.P., LINDGREN, K., ABRAMS-CARTER, L., MUDALIAR, S., NIKOULINA, S.E., TUFARI, S.R., VEERKAMP, J.H., VIDAL-PUIG, A. AND HENRY, R.R. (1998) Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:2830-2835.
- (21) FURNSINN, C., BRUNMAIR, B., MEYER, M., NESCHEN, S., FURTMULLER, R., RODEN, M., KUHNLE, H.F., NOWOTNY, P., SCHNEIDER, B. AND WALDHAUSL, W. (1999) Chronic and acute effects of thiazolidinediones BM13.1258 and BM15.2054 on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Br.J.Pharmacol.* 128:1141-1148.
- (22) TERUEL, T., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1996) Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem.J.* 319:627-632.
- (23) VALVERDE, A.M., NAVARRO, P., TERUEL, T., CONEJO, R., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1999) Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem.J.* 337:397-405.
- (24) BANDYOPADHYAY, G., STANDAERT, M.L., SAJAN, M.P., KARNITZ, L.M., CONG, L., QUON, M.J. AND FARESE, R.V. (1999) Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

- and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta. *Mol.Endocrinol.* 13:1766-1772.
- (25) VALVERDE, A.M., LORENZO, M., NAVARRO, P., MUR, C. AND BENITO, M. (2000) Okadaic acid inhibits insulin-induced glucose transport in fetal brown adipocytes in an Akt-independent and protein kinase C zeta-dependent manner. *FEBS Lett.* 472:153-158.
- (26) VALVERDE, A.M., TERUEL, T., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Tumor necrosis factor- α causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin-induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 139:1229-1238.
- (27) SMITH, U., CARVALHO, E., MOSIALOU, E., BEGUINOT, F., FORMISANO, P. AND RONDINONE, C. (2000) PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 268: 315-320.
- (28) HERNANDEZ, R., TERUEL, T. AND LORENZO, M. (2001) Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett* 494:225-231.
- (29) POWELL, K.A., CAMPBELL, L.C., TAVARE, J.M., LEADER, D.P., WAKEFIELD, J.A. AND GOULD, G.W. (1999) Trafficking of Glut4-green fluorescent protein chimaeras in 3T3-L1 adipocytes suggests distinct internalization mechanisms regulating cell surface glut4 levels. *Biochem.J.* 344:535-543.
- (30) LONG, S.D. AND PEKALA, P.H. (1996) Lipid mediators of insulin resistance: ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 319:179-184.
- (31) TERUEL, T., HERNANDEZ, R. AND LORENZO, M. (2001) Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50:2563-2571.
- (32) JAIN, R., POLICE, S., PHELPS, K. AND PEKALA, P.H. (1999) Tumour necrosis factor- α regulates expression of the CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs) α and β and determines the occupation of the C/EBP site in the promoter of the insulin-responsive glucose-transporter gene in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem.J.* 338:737-743.
- (33) SALINAS, M., LOPEZ-VALDALISO, R., MARTIN, D., ALVAREZ, A. AND CUADRADO, A. (2000) Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol.Cell Neurosci* 15:156-169.