UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Papel del Receptor de Glucocorticoide isoforma β en el metabolismo de glucosa en la línea celular HepG2

CLAUDIA SEPULVEDA QUIÑENAO

Santiago, Chile.
2018.

Universidad Andrés Bello
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Papel del Receptor de Glucocorticoide isoforma β en el metabolismo de glucosa en la línea celular HepG2

"Trabajo de Titulación presentado a la Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello en cumplimiento de los requisitos exigidos para optar al grado de Magister en Biotecnología"

Por

CLAUDIA SEPÚLVEDA QUIÑENAO

Director de tesis: Dr. Rodrigo Troncoso Cotal
Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2018

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Papel del Receptor de Glucocorticoide isoforma β en el metabolismo de glucosa en la línea celular HepG2

CLAUDIA SEPÚLVEDA QUIÑENAO

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Rodrigo Troncoso Cotal, en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile. Esta ha sido aprobada por los miembros de la Comisión de Evaluación.

Dr. Rodrigo Troncoso Cotal
Director de Tesis

Dr. Álvaro Elorza
Comisión de Tesis

Dr. Felipe Simón
Comisión de Tesis

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Actividad Física del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile y fue financiada por el Proyecto FONDECYT 11130285.

A Margarita y Francisco, mis abuelos.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero comenzar agradeciendo a mi director de tesis, Rodrigo Troncoso por su dedicación, paciencia y apoyo en la realización de mi tesis, además por dejarme trabajar y pensar autónomamente y ser un jefe comprensivo.

Quiero agradecer de igual forma a mis compañeros de laboratorio, LABINAF, por todos los buenos momentos que pasamos, por la paciencia mutua que nos tuvimos en este largo proceso. Agradecer a los varones del laboratorio por alegrar (y a veces amargarme) las largas tardes de espera de los experimentos y mimarme. De igual forma, quiero agradecer a mis compañeras de pupitre en estos dos años, Belén y Camila-pollo, por las gigantes charlas en la mañana, por los almuerzos donde nos reíamos de todo el INTA y por la linda amistad que he formado con ustedes… Las quiero.

Mamá y papá, me faltara vida y palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Solo ustedes y yo sabemos los costos económicos y emocionales que tuvimos que pasar en mis largos años universitarios. Agradecerles por educarme y criarme con tanto amor. Carolina-Hermana, chaltumay por tanto amor que me entregas a diario. Patricia, Nena, Chechi, Eva, Nelly y Claudia, gracias por todas sus enseñanzas y el amor que me han dado durante toda mi vida, gracias por formarme como mujer mapuche, fuerte e independiente. Francisco y Margarita, uf! Para mi es difícil dirigirme a ustedes mis abuelos queridos, todo esto en el resultado de su esfuerzo, el esfuerzo de francisco de hacer pan cada día durante 60 años y el esfuerzo de Margarita de lavar en alteza a pesar de su enfermedad, gracias por darme una linda familia y por enseñarnos que la única forma de superarnos es a través de la educación. Los amo a todos.

Tia Laurita y mi Belén, gracias por siempre estar a mi lado, en las buenas y en las malas. Y gracias también por el apoyo que siempre me han brindado.

Vata, amiga mía de mi alma, gracias por tu infinita paciencia (creo que nadie me tiene más paciencia que tú), por tu apoyo incondicional y por caminar junto a mí. Tú me has visto crecer, llorar, sufrir, reir, etc. En este camino que elegí, gracias por comprenderme tanto. Camilo y Vicky, lejos lo mejor de la universidad, gracias a la biotecnología nos conocimos, gracias por estar a mi lado y por los grandes momentos vividos…. Y por los que vendrán. A los tres los amo!

A mis compañeras de u, Cata, Poleto y Andrea uf!! Que momentos pasamos, gracias por hacer estos años muchos mas gratos!

I. ÍNDICE GENERAL

II. ÍNDICE DE FIGURAS IX

III. ÍNDICE DE TABLAS X

1. RESUMEN 11

SUMMARY 12

2. LISTADO DE ABREVIACIONES 13

3. INTRODUCCIÓN 16

3.1 Glucocorticoides 16

3.2 Receptor de Glucocorticoides 17

3.2.1 Receptor de Glucocorticoide isoforma α 18

3.2.2 Receptor de Glucocorticoide isoforma β 19

3.3 Metabolismo de la Glucosa 21

3.3.1 Gluconeogénesis 22

3.3.2 Glicólisis 22

3.3.3 Formación de Glicógeno 24

3.4 Glucocorticoides y resistencia a insulina 26

3.5 HIPÓTESIS 29

3.6 OBJETIVO GENERAL 29

3.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS 29

4. MATERIALES Y METODOS 30

Línea Celular 30

Amplificación y Purificación de plásmidos 30

Transfección de Plásmidos 31

Tratamiento con Dexametasona 31

Tratamiento con insulina 33

Extracción de RNA 33
PCR Transcriptasa Reversa (RT- PCR) 34
PCR Cuantitativo (PCR en Tiempo Real) 34
Extracción y cuantificación de Proteína 34
Western Blot 35
Medición de los niveles de ATP por Luminometría 37
Ensayo MTT 38
Captación de Glucosa 38
Detección de Glicógeno 39
Análisis Estadístico 39
5. RESULTADOS 40
5.1 Determinación de expresión GRα y GRβ en células HepG2 40
5.2 GRβ como modulador en la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa 40
5.3 Participación de GRβ en el metabolismo de la glucosa inducido por insulina. . 43
5.4 Efecto de GRβ en la acumulación de glicógeno en células HepG2 48
6. DISCUSIÓN 50
7. CONCLUSIÓN 54
8. PROYECCIONES 55
9. REFERENCIAS 56

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización genómica y organización del receptor de Glucocorticoide humano (hGR)..... 18

Figura 2. Rutas metabólicas Glicolisis y Gluconeogénesis..... 25

Figura 3. Activación de la vía de PI3K/Akt..... 28

Figura 4. Plásmidos pCMVhGRα y pCMVhGRβ. 32

Figura 5. Sobreexpresión de pCMVGRα y pCMVGRβ en células HepG2..... 41

Figura 6. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en genes gluconeogénicos 42

Figura 7. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en genes glicolíticos y glicogénesis 44

Figura 8. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en transportadores de glucosa 45

Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de GRβ en la fosforilación de Akt, P70S6K y AMPK 46

Figura 10. Efecto de GRβ en la Captación de 2-NBDG..... 47

Figura 11. Efecto de GRβ los niveles de ATP y Viabilidad Celular..... 48

Figura 12. Efecto de GRβ en la acumulación de glicógeno..... 49

-

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Transportadores de glucosa 23

Tabla 2. Secuencias y condiciones experimentales teóricas de los partidores requeridos 36

Tabla 3. Preparación de Geles separador y Concentrador para Western Blot 37

1. RESUMEN

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas que regulan diversos procesos celulares, como el metabolismo de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos. En el metabolismo de los carbohidratos, los GCs promueven la gluconeogénesis, la síntesis de glicógeno y tiene una acción antagonista a la insulina. Para modular estas acciones, es necesario que los GCs actúen a través del receptor de GC (GR). Mediante un *splicing* alternativo en mRNA del GR se generan dos isoformas: GRα, que es el clásico receptor de GC, y GRβ que actúa como dominante negativo de GRα. Además, GRβ se encuentra relacionado a la resistencia a GC en pacientes con asma, artritis reumatoides y leucemia. Junto a estos antecedentes, en diversos modelos celulares se relaciona GRβ con la migración y proliferación celular, la inhibición de la gluconeogénesis y la activación de la vía Akt. Por otro lado, la insulina dirige el consumo, conversión y almacenamiento de glucosa, lo cual inhibe la degradación de glicógeno y gluconeogénesis. Estas acciones de insulina están mediadas por la activación de la vía de señalización PI3K-Akt. Recientemente, se ha reportado que esta hormona y la alimentación pueden aumentar la expresión del GRβ. Debido a estos antecedentes se establece la siguiente hipótesis "*la isoforma GRβ aumenta los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa en células HepG2*".

Para determinar la participación de GRβ en la regulación del metabolismo de la glucosa inducido por insulina, se utilizó la línea celular HepG2 a la cual se le sobreexpresó GRβ y se estimuló con insulina y dexametasona. Se determinó los niveles del mRNA de PDK4, G6Pasa, GLUT1-2-4, HK2, GBE, PCK1-2 y PTEN por PCR en tiempo real. Mediante western blot se determinó p-Akt, p-P70S6K, p-AMPK y glicógeno sintasa. Los niveles de ATP se determinaron por Luminometría. La captación de glucosa y la acumulación de glicógeno por microscopía de fluorescencia. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía y el post- análisis Test de Tuckey. Nuestros resultados indican que GRβ participa en el metabolismo de la glucosa ejerciendo efectos similares a insulina; disminuyendo mRNA de G6Pasa y PCK2 y aumentando junto a insulina mRNA de GLUT2, GLUT4, PDK4 y GBE. Además, activa la vía Akt, promoviendo la captación celular, formación de glicógeno y la proliferación celular de forma independiente a insulina.

SUMMARY

Glucocorticoids (GC) are steroid hormones that regulate various cellular processes, such as metabolism of carbohydrates and fatty acids. In the metabolism of carbohydrates, GCs promote gluconeogenesis, glycogen synthesis and have an antagonistic action on insulin. To modulate these actions, GCs act through the GC receptor (GR). By an alternative splicing in GR mRNA, two isoforms are generated: GRα, which is the classic GC receptor, and GRβ that acts as a negative dominant of GRα. In addition, GRβ is related to resistance to GC in patients with asthma, rheumatoid arthritis and leukemia. In addition, GRβ is related to cell migration and proliferation, inhibition of gluconeogenesis and the activation of Akt signaling pathway. On the other hand, insulin guides the consumption, conversion and storage of glucose, also inhibits the degradation of glycogen and gluconeogenesis. These insulin actions are mediated by the activation of the PI3K-Akt signaling pathway. Recently, it has been reported that this hormone and diet can increase the expression of GRβ. Therefore, the following hypothesis was proposed: "*The GRβ isoform increases the effects of insulin on the metabolism of glucose in HepG2 cells*".

To determine the participation of GRβ in the regulation of insulin-induced glucose metabolism, the HepG2 cell line was used. GRβ was overexpressed in HepG2 cells and then stimulated with insulin or dexamethasone. The mRNA levels of PDK4, G6Pase, GLUT1-2-4, HK2, GBE, PCK1-2 and PTEN were determined by real-time PCR. The phosphorylated and total form of Akt, P70S6K, AMPK and total levels of glycogen synthase were determined by western blot. ATP levels were determined by Luminometry. Glucose uptake and glycogen accumulation by fluorescence microscopy. The statistical analysis was one-way ANOVA and Tuckey Test post-analysis. Our results indicate that GRβ participates in the metabolism of glucose by exerting insulin-like effects; decreasing mRNA of G6Pase and PCK2 and increasing along with insulin mRNA of GLUT2, GLUT4, PDK4 and GBE. In addition, GRβ activates the Akt pathway, promoting cellular uptake, glycogen formation and cell proliferation independently of insulin.

2. LISTADO DE ABREVIACIONES

°C: Grados Celsius.

µg: Micro gramo

µL: Micro Litro.

2-NBDG: 2-(*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

ACTH: Hormona Adrenocorticotropa.

AF2: Función de Activación.

Akt: Proteína Quinasa B.

AP-1: Proteína Activadora 1.

APS: Amonio Persulfato.

AR: Receptor de Andrógenos.

AVP: Vasopresina Arginina.

CBG: Globulinas unidas a corticoesteroides.

cDNA: DNA complementario.

CRH: Hormona liberadora de Corticotrofina.

DBD: Dominio de unión a DNA.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DEX: Dexametasona.

DMEM: Dulbecco's Modifies Eagle Medium.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ER: Receptor de Estrógenos.

FBS: Suero Bovino Fetal.

G6Pasa: Glucosa 6-Fosfatasa.

GC: Glucocorticoides.

GR: Receptor de Glucocorticoides.

GRα: Receptor de Glucocorticoides isoforma α.

GRβ: Receptor de Glucocorticoides isoforma β.

GRE: Elementos de respuesta a Glucocorticoides.

GS: Glucógeno Sintasa.

GSK 3: Glicógeno Sintasa Quinasa 3.

HPA: Hipotalámico-Pituitaria-Adrenal.

Hsp: Proteínas *Heat Shock.*

iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico Inducible.

IR: Receptor de Insulina.

KH_2PO_4: Fosfato de Potasio monobásico.

KCl: Cloruro de potasio.

LBD: Dominio de unión a ligando.

LiCl: Cloruro de litio.

MAPK: Quinasas Activadas por Mitógenos.

mL: Mili Litro.

mm: mili metro.

MR: Receptor de Mineralocorticoides.

mTOR: Molécula Blanco de la Rapamicina.

N: Normalidad.

Na_2HPO_4: Fosfato de disódio.

NaCl: Cloruro de Sodio.

NaOH: Hidróxido de sodio.

NF-κB: Factor Nuclear κB.

ng: Nano gramo.

NLS: Señal Nuclear de Localización.

NR: Receptor Nuclear.

NTD: Dominio N-Terminal.

OAA: Oxalacetato.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PC: Piruvato Carboxilasa.

PCK2: Fosfoenolpiruvato Carboxiquinasa.

PDK1: Quinasa dependiente de fosfoinositidos-1.

PEP: Fosfoenolpiruvato.

PFK2: Fosfofructoquinasa 2.

PI3K: Fosfoinositol 3-Quinasa.

PI4-P: Fosfatidilinositol 4-Fosfato.

PI 4,5-P_2: Fosfatidilinositol 4,5.bisfosfato.

PR: Receptor de Progestinas.

PVDF: Polifluoruro de vinilideno.

PVN: Núcleo paraventricular.

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa.

RNA: Ácido Ribonucleico.

rpm: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

SCN: Núcleo supraquiasmático.

TBS: Tampón Tris Salino.

TBS-T: Tampón Tris Salino con Tween 20.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Glucocorticoides

Los Glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas, derivadas del colesterol, que regulan varios procesos fisiológicos y bioquímicos mediante la regulación circadiana de sus niveles y en respuesta al estrés. Entre los efectos los GCs se destacan, su papel sobre el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos, proteínas y purinas; además los GCs regulan funciones del sistema nervioso central y cardiovascular; también participan en el desarrollo de varios órganos y sistemas, así como en embriogénesis, crecimiento (Kadmiel y Cidlowski, 2013) y sobrevivencia (Sapolsky *et al*. 2000), y son claves en la regulación de la respuesta inmune/inflamatoria (Goecke y Guerrero, 2006).

El cortisol es el principal GCs endógeno en humanos y su secreción es a través de la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Durante el estrés, señales externas o internas gatillan la liberación de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) por el hipotálamo que actúa sobre la pituitaria anterior para estimular la síntesis y secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH actúa sobre la corteza adrenal para estimular la producción y secreción de cortisol (Oakley y Cidlowski, 2013). Por otro lado, el ritmo circadiano provoca la liberación de ACTH permitiendo la secreción de GCs (Russell *et al.* 2014).

Los GCs regulan su secreción a través de la regulación negativa que ejercen sobre el hipotálamo y la pituitaria anterior inhibiendo la producción y liberación de CRH y ACTH, y así limitar la magnitud y duración de sus acciones. La mayor parte del cortisol viaja en la sangre unido a globulinas (CBG) (Breuner y Orchinik, 2002). El cortisol libre es la forma biológicamente activa y es convertida a cortisona por la 11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, e inversamente, 11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 convierte cortisona en cortisol (Yang y Zhang, 2004).

Debido a su potente acción inmunosupresora y antiinflamatoria, los GCs son uno de las drogas más prescritas en el mundo hoy en día. Los GCs sintéticos, como dexametasona, prednisona, betametasona, entre otros, han sido indispensable para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como asma (Barnes *et al*. 1995), alergias, artritis reumatoide (Kirkham *et al.* 1991), úlceras colitis y esclerosis múltiple (Rhen y Cidlowski, 2005). También, son prescritos para prevenir el rechazo de órganos trasplantados (Langhoff et al. 1986) y en el tratamiento de leucemias, linfomas y mielomas. Si bien el uso de GCs se ha hecho esencial para el tratamiento de estas enfermedades, sus beneficios pueden verse limitados por sus efectos adversos en pacientes que tienen una exposición crónica a GCs. Estos efectos adversos incluyen osteoporosis, diabetes, síndromes de inmunodeficiencia (Norbiato *et al*. 1992), obesidad (Bowles *et al.* 2014), glaucoma, retardo en el crecimiento en niños, hipertensión, además de resistencia a GCs (Kino *et al*. 2003).

3.2 Receptor de Glucocorticoides

Los GCs juegan un rol importante en la regulación de la homeostasis bajo condiciones basales y durante el estrés (Sapolsky *et al.* 2000), estas propiedades están mediadas a través de la unión del GCs con su receptor. El receptor de GCs (GR) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (NR), que incluye a los receptores de mineralocorticoides (MR), estrógenos (ER), progestinas (PR) y andrógenos (AR). Este receptor funciona como un factor transcripcional que regula la expresión de un gran número de genes en respuesta a GCs (Kino et al. 2003).

El gen humano del GR (hGR; NR3C1) se encuentra localizado en 5q31-32 y comprende más de 140 kb de nucleótidos (Encio y Detera-Wadleigh, 1991). hGR contiene 9 exones (Figura 1) (Lu y Cidlowski, 2004). Un empalme alternativo en el último exón genera dos isoformas del receptor, la isoforma alfa (GRα) y la isoforma beta (GRβ) (Lu y Cidlowski, 2004). La proteína del GR, contiene un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión a DNA (DBD) y un C-terminal que corresponde al dominio de unión a ligando (LBD).

Por otro lado, un análisis en la secuencia aminoacídica revela que las isoformas α y β del receptor son idénticas en los primeros 727 aminoácidos, pero difieren en el carboxilo terminal (Oakley y Cidlowski, 2011). GRα contiene 50 aminoácidos en su carboxilo terminal mientras que GRβ contiene solo 15 aminoácidos, generando así proteínas de 777 y 742 aminoácidos, respectivamente (Oakley *et al.* 1996) (Figura 1).

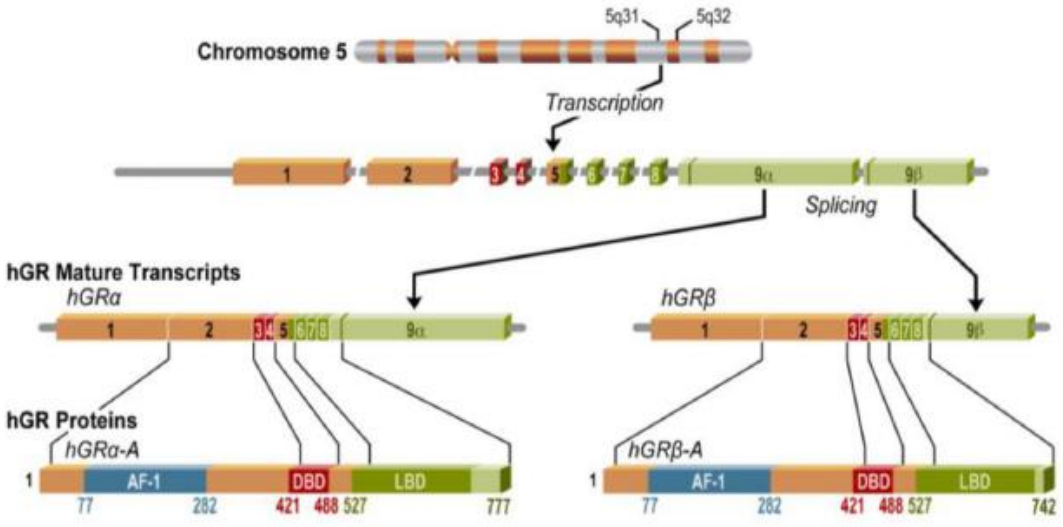


Figura 1. Localización genómica y organización del receptor de Glucocorticoide humano (hGR). hGR se encuentra en el locus 5q31-32. El gen consiste en 9 exones, donde el exón 9 genera dos isoformas distintas del mismo receptor, α y β, debido a un empalme alternativo (Kadmiel y Cidlowski, 2013).

3.2.1 Receptor de Glucocorticoide isoforma α

La isoforma GRα se expresa en la mayoría de las células y tejidos humanos, y representa al clásico GR, es decir, regula la mayoría de los efectos de GCs que controlan la fisiología y el desarrollo humano (Encío y Detera-Wadleigh, 1991). En ausencia de ligando, se encuentra principalmente en el citoplasma y es parte de un heterocomplejo multiproteíco que contiene varias proteínas *Heat Shock* (Hsp), como Hsp90 (Smith, 1993) y Hsp70 (Kino *et al.* 2009); y algunas inmunofilinas tales como; FKBP51, FKBP52 y Cyp-40 (Ratajczak *et al*. 1993).

Una vez que se une GC, GRα se activa y sufre un cambio conformacional que resulta en la separación del receptor de este heterocomplejo, homodimeriza y finalmente se transloca al núcleo a través de la activación de su señal de localización nuclear (NLS). Una vez en el núcleo, el complejo GRα-GCs se une a elementos de respuesta a GCs (GRE), recluta coreguladores y permite la transcripción de sus genes blancos. Hay dos principales vías por las cual GRα controla la transcripción de genes (Wang y Harris, 2015); i) dimerización y directa unión GRE, aumentando o disminuyendo la transcripción de genes blancos y ii) Monómeros de GR que se unen indirectamente influenciando la transcripción de genes a través de interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (inhibiendo la actividad transcripcional de NF-κB (De Bosscher *et al*. 2006) y AP-1 en moléculas proinflamatorias (Barnes, 2006).

3.2.2 Receptor de Glucocorticoide isoforma β

La isoforma β del receptor de GR (GRβ) se encuentra principalmente en el núcleo, donde está asociada con Hsp90 (Zhang et al. 2006) y actúa como un dominante negativo de GRα (Bamberger et al. 1995). El mecanismo por el cual GRβ ejerce la inhibición sobre GRα no se encuentra bien definido, pero se postulan tres posibles mecanismos; i) competencia por la unión a GRE, ya que se ha demostrado que GRβ puede unirse a GRE (Oakley et al. 1999), ii) heterodimerización con GRα, y iii) coactivador a través del dominio preservado AF-1 (Charmandari *et al.* 2005).

A diferencia de la isoforma α, GRβ no es capaz de unirse a los agonistas clásicos de la isoforma α, debido a que carece del dominio de unión a ligando (LBD) (De Castro et al. 1996). Sin embargo, se ha reportado que RU486 (Mifepristona), que es un antagonista del GRα y del receptor de progesterona, es capaz de unirse a GRβ y regular su actividad transcripcional (Lewis-Tuffin *et al*. 2007). Por otro lado, GRβ puede regular directamente genes que no son regulados por GRα, mostrando actividad transcripcional intrínseca sobre 299 genes (Kino *et al.* 2009). El mRNA de la isoforma β del GR ha sido encontrado en células inflamatorias, eosinofilos, macrófagos, neutrófilos, y en algunos tejidos como;

hígado, musculo esquelético, riñón, pulmón, cerebro, mucosa nasal, corazón, pero en concentraciones 400 veces menor al mRNA de la isoforma α (Pujols *et al.* 2002).

Diversas investigaciones sugieren que la isoforma GRβ es responsable del desarrollo de insensibilidad a GCs en varios desordenes, la mayoría asociado a desregularización del sistema inmune; dentro de las cuales encontramos asma (Goecke y Guerrero, 2006), artritis reumatoide (Derijk *et al*. 2001), leucemia (Longui *et al.* 2000), pólipos nasales, lupus eritematoso sistémico (Piotrowski *et al.* 2007); en estas investigaciones varias células inmunes presentaban una expresión elevada de GRβ que se correlaciona con la insensibilidad a GCs (Kino *et al.* 2009).

A lo anterior, se suman estudios recientes que demuestran que esta isoforma se relaciona con el metabolismo celular y cáncer. En células T24, línea celular de cáncer de vejiga, se registra una alta expresión de GRβ, lo conlleva a un aumento en la migración celular. Esto se demostró mediante un *knockdown* de GRβ en células T24, donde además de disminuir la expresión de este receptor, disminuyó la migración celular. A esto, se agrega que la expresión de GRβ es controlado por miR144, este microRNA regula positivamente la expresión de este receptor (McBeth *et. al* 2016) y con este descubrimiento, se ha desarrollado un ácido péptidonucleico, denominado *Sweet-P*, que es capaz de unirse a MiR144 e inhibir la transcripción de GRβ, y con esto sus efectos, en células T24 (Nwaneri *et al.* 2016).

Hinds *et al.* 2010 comprobaron GRβ inhibe la expresión a nivel de mRNA de PDK4 y glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa), que son inducidos por GC, en células COS-7. Por consiguiente, en este mismo estudio, se reportó que la expresión de mRNA de GRβ aumenta en células MEF tratadas con insulina. Sobre la relación GRβ-insulina podemos agregar que GRβ suprime la fosfatasa PTEN en células 3T3, lo que permite el aumento en la fosforilación de Akt y en la proliferación celular (Stechschulte *et al.* 2014). Recientemente He *et al.* 2016 reportaron que la sobreexpresión de GRβ en hígado de ratón disminuye significativamente la gluconeogénesis hepática, debido a que esta

isoforma es capaz de disminuir la expresión fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK), una enzima clave en el proceso de gluconeogénesis.

Por otro lado, GRβ se encuentra relacionado con obesidad. Esta isoforma se encuentra sobreexpresada en hígado y tejido adiposo de ratones sometidos a una dieta alta en grasas. Además, GRβ en hígado de ratón incrementa la acumulación de lípidos, por aumento de ácido graso sintasa y una disminución del receptor nuclear PPARα que promueve la β- oxidación de ácidos grasos (Marino *et al.* 2016).

Estos antecedentes indican que esta isoforma además de tener un rol importante en proliferación celular y cáncer, tiene un rol en el metabolismo celular. Si bien estos antecedentes se realizaron en modelo animal, en este trabajo se pretende establecer el rol de esta isoforma en el metabolismo de glucosa en la línea celular HepG2.

3.3 Metabolismo de la Glucosa

La glucosa juega un papel principal en el metabolismo de la mayoría de los seres vivos debido a su uso como fuente de energía. El metabolismo de la glucosa se basa en los procesos de hidrólisis (glicólisis), almacenamiento (formación de glicógeno) y síntesis *de novo* (gluconeogénesis). Estos procesos se encuentran regulados por insulina, glucagón y GCs (Barthel y Schmoll, 2003).

El principal órgano regulador de la homeostasis de glucosa es el hígado. Este controla el balance entre el consumo/utilización y producción de glucosa. Esta regulación es esencial durante la transición en los periodos de alimentación y ayuno. Durante el estado de alimentación, el hígado almacena energía desde glucosa (Arde *et al*. 2006), sintetizando glicógeno y grasa (Yabaluri y Bashyam, 2010). Por el contrario, durante el ayuno los niveles de glucosa son más bajos y el hígado es capaz de producir glucosa por medio de gluconeogénesis (Figura 2).

3.3.1 Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es una ruta anabólica que nos permite obtener glucosa a partir de precursores como lactato, alanina y glicerol. Se lleva a cabo principalmente en el hígado, pero también puede ocurrir en los riñones y en el intestino (Pilkis *et al.* 1988). El lactato y la alanina pueden ser convertidas a piruvato, que es convertido a oxalacetato (OAA) por la enzima piruvato carboxilasa (PC) (Jitrapakdee y Wallace, 1999). El OAA necesita ser convertido a malato para ser transportado al citoplasma donde es convertido nuevamente a OAA. La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PCK1) y mitocondrial (PCK2) convierten OAA a fosfoenolpiruvato (PEP) que entra a la vía gluconeogénica. La conversión de PEP a fructosa-1,6-bisfosfato requiere de cinco pasos enzimáticos (Figura 2) que son reversibles para vía de glicolisis (Kuo *et al.* 2015). Luego, la fructosa-1,6-bisfosfato es convertida a fructosa-6-fosfato, luego esta es convertida a glucosa 6-fosfato, donde esta finalmente es convertida a glucosa por la enzima glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa).

En el hígado, los GCs activan la transcripción de enzimas claves para gluconeogénesis, dentro de las enzimas encontramos PCK y G6Pasa que son activadas a través de GREs (Scott *et al*. 1998 y Vander Kooi *et al.* 2005). También la PC y la Fructosa-1,6-Bifosfatasa son reguladas por GC (Kuo *et al.* 2015), sin embargo, el mecanismo por el cual estos actúan no se encuentra totalmente elucidado. A pesar de que estas regulaciones se encuentran mediadas por GRα, se ha reportado que GRβ es capaz de inhibir la expresión de las enzimas PDK4 y G6Pasa inducida por dexametasona (Hinds *et al.* 2010).

3.3.2 Glicólisis

La glicólisis es una ruta catabólica, en la cual se transforma una molécula de glucosa, mediante una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, en dos moléculas de piruvato. Durante este proceso, la energía se conserva en ATP, NADH y piruvato. Esta ruta se lleva a cabo en todas las células, tanto eucariontes como procariontes.

Esta ruta comienza cuando la glucosa entra a las células por transportes específicos llamados transportadores de glucosa (GLUT). Esta entrada es por difusión facilitada y estos transportadores se encuentran distribuidos ampliamente por todos los tejidos del organismo (Tabla 1) (Frayn, 2010). Una vez que la glucosa entra a las células, es fosforilada y se forma el intermediario glucosa 6-fostato, por un proceso enzimático que es catalizado por la enzima hexoquinasa (HK2), que tiene como sustrato glucosa y ATP. El segundo paso de esta ruta metabólica es la conversión de glucosa 6-fosfaro a fructosa 6-fosfato, esta reacción esta catalizada por la enzima fosfoglucosa isomerasa. A continuación, una segunda fosforilación permite la formación de fructosa-1,6-bisfosfato por acción de la enzima fosfofructoquinasa, que tiene como sustrato fructosa-6-fosfato y ATP. Luego cinco reacciones enzimáticas que son reversibles para la gluconeogénesis, desde fructosa-1,6-bisfosfato hasta fosfoenolpiruvato (Figura 2). El último paso de este proceso, es la transformación desde fosfoenolpiruvato a piruvato, esta reacción genera dos moléculas de ATP y esta catalizada por piruvato quinasa.

Tabla 1: Transportadores de glucosa. Nombre de los principales transportadores de glucosa, su amplia distribución en el organismo y su constante de Michaelis (K_m) (Gould y Holman, 1993). *GLUT4 puede ser modulado por insulina (McCarthy y Elmendorf, 2007).

Nombre Transportador	Localización	K_m
GLUT1	Eritrocitos, Placenta, Vasos Sanguíneos Cerebrales	1-5 mmol/L
GLUT2	Hígado, Riñón, Intestino y Células β pancreáticas	7-17 mmol/L
GLUT4*	Músculo y Tejido Adiposo.	5 mmol/L

En condiciones aeróbicas, el piruvato se convierte a acetil-CoA para entrar al ciclo de Krebs, esta conversión esta catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). PDC es un paso clave de control en la oxidación de glucosa y se encuentra inhibido en pacientes con diabetes y durante el ayuno. Regulación a largo plazo de PDC es mediada

por piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), donde este inhibe PDC (Sugden y Sugden 2003). Existen cuatro isoformas de PDK (del 1 al 4), donde PDK2 y PDK4 son las isoformas que se expresan en el hígado, donde PDK4 se encuentra regulado por hormonas como GCs e insulina (Connaughton et al. 2010).

Los GCs son capaces de suprimir el proceso de glicolisis (Ma *et al.* 2013). Sumado a esto, Gu *et al.* 2015 han demostrado que la inhibición de la vía glicólitica es necesario para revocar la resistencia a GCs en pacientes con linfomas. Estas acciones se encuentran mediadas por GRα (Lu *et al.* 2017), donde aún no está claro si GRβ tiene alguna implicancia.

3.3.3 Formación de Glicógeno

El glicógeno es un polímero de glucosa ramificada que se forma principalmente en células hepáticas y musculares. El glicógeno hepático sirve principalmente como almacén de glucosa para otros tejidos cuando hay ayuno, este puede desaparecer en un periodo de 12 a 24 horas. (Roach *et al*. 2012).

El glicógeno tiene dos rutas, una de formación que se denomina glucogenogénesis, y otra de degradación, que se denomina glucogenólisis. El precursor de la formación de glicógeno es la glucosa, proveniente de la ingesta de carbohidratos o precursores gluconeogénicos (McGarry *et al.* 1987). En el hígado, la síntesis de glicógeno ocurre normalmente cuando los niveles de glucosa e insulina son altos. Por otro lado, cuando hay privación de nutrientes, se promueve la degradación de glicógeno hepático. El primer paso de la síntesis de glicógeno es la entrada de glucosa a la célula mediante sus transportadores, a continuación, esta es fosforilada por la enzima hexoquinasa, generando glucosa 6-fosfato (G6P). Luego, G6P es convertido a glucosa 1-fostofato (G1P) por fosfoglucomutasa-1. Entonces, G1P es convertido a glucosa-UDP por la enzima UDP-glucosa fosforilasa. Luego, la enzima glicogenina inicia la síntesis de la cadena de glicógeno por autoglicosilación desde glucosa-UDP. La elongación de la cadena está a cargo de la enzima glicógeno sintasa (GS) y la formación de las ramificaciones de glicógeno está a cargo de la enzima ramificadora de glicógeno (GBE).

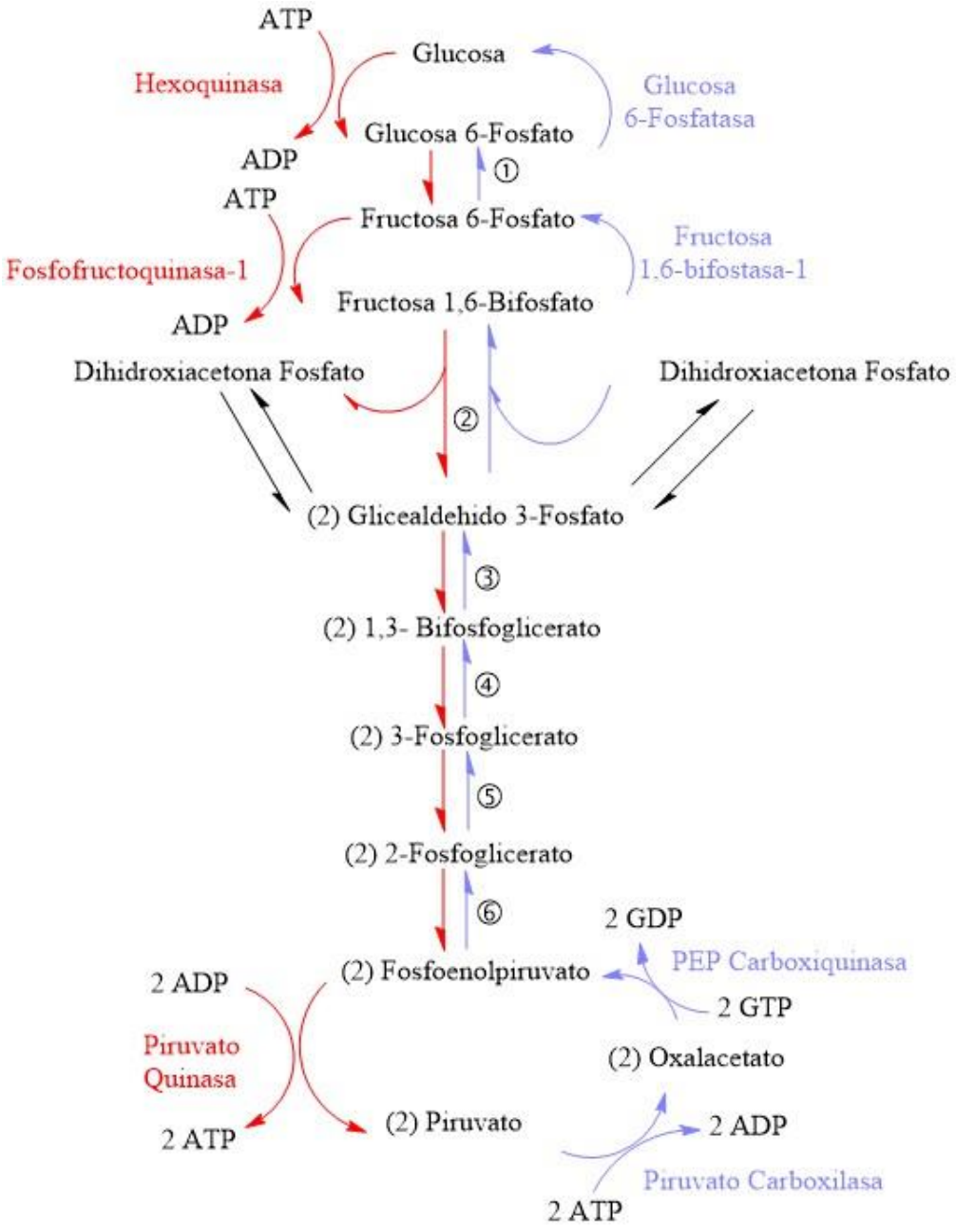


Figura 2. Rutas metabólicas Glicolisis y Gluconeogénesis. Estas rutas son la degradación (en rojo) y composición *de novo* (en azul) de la glucosa. En algunos puntos de estas rutas, las reacciones son reversibles y participan las siguientes enzimas: ① Glucosa 6-Fosfatasa Isomerasa; ② Fructosa 1,6-Bifosfatasa Aldolasa; ③ Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa; ④ Fosfoglicerato Quinasa; ⑤ Fosfoglicerato Mutasa; ⑥ Fosfopiruvato Hidratasa. Sin embargo, las enzimas Hexoquinasa, Fosfofructoquinasa-1 y Piruvato Quinasa participan exclusivamente del proceso de glicolisis. Por otro lado, las enzimas Glucosa 6-Fosfatasa, Fructosa 1,6-Bifosfatasa-1, PEP Carboxiquinasa y Piruvato Carboxilasa participan solo en el proceso de gluconeogénesis.

La regulación de GS es de gran importancia para modular la formación o degradación de glicógeno. Esta enzima, se encuentra regulada principalmente por cambio en los estados de fosforilación/desfosforilación. La fosforilación de GS es mediada por la glicógeno sintasa quinasa (GSK), lo cual lleva a una inactivación de esta enzima y, por consiguiente, la síntesis de glicógeno se encuentra inhibida. Por otro lado, la defosforilación de GS mediada por la glicógeno sintasa fosforilada (GSP o PP1), activa GS, promoviendo la síntesis de glicógeno. La insulina inactiva la GSK vía Akt/PKB (Lizcano y Alessi, 2002), permitiendo la activación de la síntesis de glicógeno (Patel *et al.* 2008). Por otro lado, los GCs son capaces de disminuir los niveles de glicógeno en el hígado (Bose *et al.* 2016). El rol de GRβ en el metabolismo de glicógeno no ha sido estudiado.

3.4 Glucocorticoides y resistencia a insulina

La insulina es una hormona peptídica que es secretada por las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans. Su principal función es mantener los niveles de glucosa en la sangre, favoreciendo la entrada y almacenamiento de esta en el músculo y tejido adiposo, y en hígado favorecer su almacenamiento, como glicógeno, e inhibir su producción (gluconeogénesis hepática) (Wang y Harris, 2015).

La transducción de señales a través de la vía PI3K (Figura 3) se inicia cuando el receptor de insulina (IR) activado (unido a su ligando), se autofosforila e interacciona con proteínas IRS (sustratos del receptor de insulina). Las proteínas IRS son fosforiladas por IR, lo cual permite que se una a los dímeros que forman PI3K (Virkamaki *et al.*1999). Como consecuencia, la subunidad catalítica de PI3K se localiza cerca de la membrana plasmática en donde tiene acceso a sus sustratos, PI4-P (fosfatidilinositol 4-fosfato) y PI 4,5-P_2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), los cuales son fosforilados generando PIP_2 y PIP_3, respectivamente. PIP_3 se une a PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositidos-1) y Akt (o también llamada proteína quinasa B, PKB) (McCarthy y Elmendorf, 2007). PDK1 fosforila Akt en un residuo de Treonina (T^{308}) de su dominio catalítico y para la activación total de Akt es necesario de una segunda fosforilación en S^{473} por el complejo mTORC2 (Kim y Feldman, 2012). La enzima Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina,

incluyendo glicógeno sintasa (GS), glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), fosfofructoquinasa 2 (PFK2), molécula blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), Caspasa 9 (Ebina et al. 1985). Además, aumenta la captación de glucosa promoviendo la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de compartimientos intracelulares a la membrana plasmática (McCarthy y Elmendorf, 2007) (Figura 3).

Los GCs tienen una acción contraregulatoria a la insulina ya que generan un aumento en los niveles de azúcar en la sangre, esto se debe a la acción gluconeogénica directa que poseen. Se ha reportado en ratones mutantes para GR, desarrollan hipoglicemia después de ayuno, debido a una disminución de la expresión de la enzima gluconeogénica PCK. Por otro lado, la regulación de PCK se encuentra regulado por GCs-GR y este es un factor importante para desarrollar hiperglicemia en ratones que desarrollan diabetes mellitus (Opherk et al. 2004). A lo anterior se agrega que los GCs tiene la capacidad de suprimir la secreción de insulina desde las células β pancreáticas (Delaunay *et al.* 1997). También son capaces de reducir la expresión y la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS-1), PI3-K y Akt, además disminuye la migración del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) (Yuen *et al.* 2013), indicando que los GCs pueden dañar la vía de señalización de insulina.

La exposición prolongada a GCs genera resistencia a la insulina, ya que estos pueden activar la transcripción de genes asociados con esta alteración (Kuo *et al.* 2012); como *Cblb* (Nakao *et al.* 2009), *Pid-1* (Wu *et al.* 2010) y *Grb10 (*Wick *et al. 2002)*. Estas acciones de los GCs están mediadas por el receptor GRα, el clásico receptor de GCs. En cuanto GRβ, no hay evidencia que indique la influencia de este en el metabolismo de la glucosa, sin embargo, se ha reportado que la sobreexpresión de GRβ incrementa selectivamente la fosforilación de Akt, teniendo un impacto positivo en la vía de señalización de la insulina (Stechschulte *et al.* 2014).

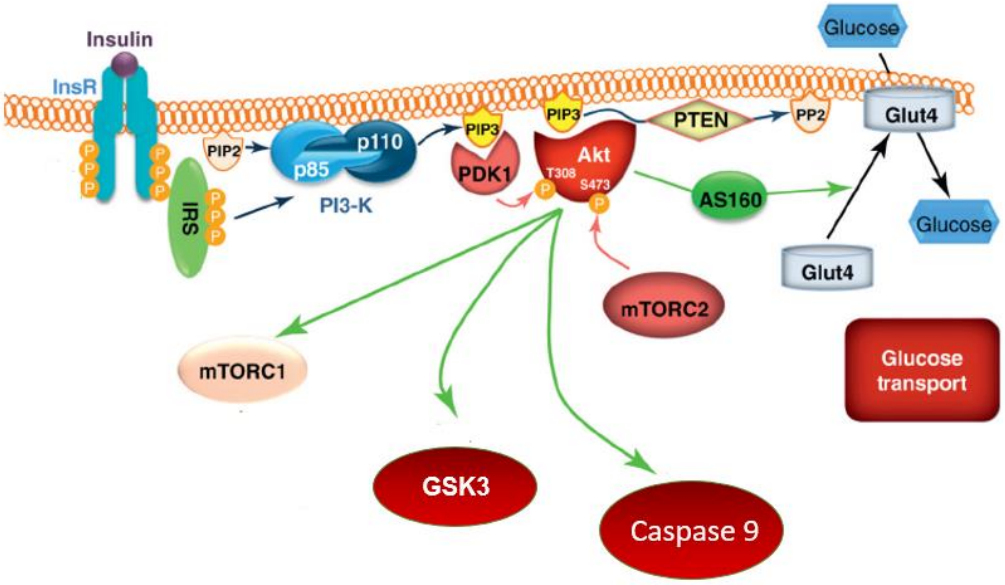


Figura 3. Activación de la vía de PI3K/Akt. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. El IR activo y autofosforilado, activa a IRS. Los sustratos fosforilados PIP_2 y PIP_3 sirven como sitio de unión de PDK1 y Akt. El complejo PDK1 activa Akt, que regula varios efectos metabólicos de la insulina a través de la activación de mTOR, FOXO, GSK3, Caspasa 9 y GLUT4 (Modificada de Kim y Feldman, 2012).

3.5 HIPÓTESIS

La isoforma β del Receptor de Glucocorticoide (GRβ) aumenta los efectos de la insulina en el metabolismo de la glucosa en células HepG2.

3.6 OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la isoforma β del Receptor de Glucocorticoides (GRβ) en la regulación del metabolismo de la glucosa inducido por insulina en células HepG2.

3.7 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estudiar el efecto de GRβ en la expresión de genes en células HepG2, inducidos por GC e insulina, que participan en rutas metabólicas como gluconeogénesis, glicolisis y glucogenogénesis; PDK4, G6Pasa, GLUT1, GLUT2, GLUT4, HK2, GCK, GBE, PCK 1 y PCK2.

- Evaluar el metabolismo de la glucosa inducido por insulina en células HepG2 que sobreexpresan GRβ, a través de la fosforilación de Akt, P70S6K y AMPK; Captación de Glucosa y Generación de ATP.

- Evaluar la acumulación de glicógeno en células HepG2 que sobreexpresan GRβ y su efecto al ser estimuladas con insulina.

4. MATERIALES Y METODOS

Línea Celular

Se utilizó como modelo experimental la línea celular HepG2 que es proveniente de hepatocarcinoma de un hombre de 15 años de edad (Aden *et al.* 1979). La línea celular se cultivó en medio DMEM 1X (11965084, Thermo Fisher) al 10% FBS (04-001-1A-US, Biological Industries) y las condiciones de cultivo fueron en incubador termorregulado a 37°C, en una atmosfera humidificada con 5% de dióxido de carbono (CO_2) y 95% de aire.

Amplificación y Purificación de plásmidos

Los plásmidos pCMVhGRα y pCMVhGRβ (Figura 4) fueron donados por el Dr. John Cidlowsky. La transformación de células competentes se realizó por mediante shock térmico según lo estipulado por Froger y Hall, 2007. Para la amplificación, se agregó 1 ml de medio de *Escherichia Coli DH5α* saturado, en un matraz con 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) (DF0445-17-4, BD Difco ^{TM}) y se incubó a 37°C con agitación orbital durante toda la noche. Una vez crecidas las células, se mantuvo el crecimiento del cultivo a 4°C. El medio LB fue preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Para la purificación, se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Referencia A1330, Promega). Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3800 rpm por 10 minutos a 4°C, luego se resuspendió el pellet en 250 µL de solución de resuspensión y 250 µL de buffer de lisis y se mezcló por inversión cuatro veces. Se añadió 10 µL de proteasa alcalina, se mezcló cuatro veces por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. A continuación, se agregó 350 µL de solución de neutralización y se centrifugó a 13.500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se insertó la columna dentro de un tubo eppendorf y se agregó el sobrenadante. Se centrifugó por un minuto a 13.500 rpm a temperatura ambiente. Se agregó 750 µL de solución de lavado y se centrifugó un minuto a 13.500 rpm a temperatura ambiente. Este paso se repite, pero con 350 µL de solución de lavado y se centrifugó a 13.500 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. La columna se colocó en un eppendorf de 1,5 mL libre de

nucleasas, se agregó 100 µL de Agua libre de nucleasas y se centrifuga a 13.500 rpm por un minuto a temperatura ambiente. El plásmidio se almacenó a -20 °C hasta su cuantificación.

Los plásmidos se cuantificaron por espectrofotómetro *Bioware* UV/Visible. Se agregó en cubeta de cuarzo 198 µL de de H_2O de agua DEPC y 2 µL de plasmidio. Finalmente, se descartaron las muestras con índice A260/280 inferior a 1,7 o superior a 2.

Transfección de Plásmidos

Para la transfección se prepararon dos soluciones; la solución A contiene 600 µL de optiMEM® (31985970, gibco® - Thermo Fisher) y 3 µg de plásmido, y la solución B contiene 600 µL de optiMEM® y 6 µL de Lipofectamina® 2000 (11668019, Thermo Fisher), ambas soluciones se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se mezclaron las soluciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante los 20 minutos, al cultivo celular, en confluencia de aproximadamente de 70%, se cambió medio DMEM 1X al 10% FBS por medio optiMEM® (500 µL para placas de 12 pocillos, 1 mL para placas de 35 mm, 2 mL para placas de 60 mm y 6 mL para placas de 100 mm). Después del tiempo de incubación, se agregó la solución A+B al cultivo celular (200 µL para placas de 12 pocillos, 400 µL para placas de 35 mm y 1,2 mL para placas de 100 mm) y se incubó por 18 horas.

Tratamiento con Dexametasona

A las células previamente transformadas se les cambió medio optiMEM® con la solución A+B por medio DMEM 1X sin suero (3 mL para placas de 60 mm y 10 mL para placas de 100 mm) y se incubó durante una hora. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó 1µL/mL Dexametasona 1mM (Concentración final 1µM) y se incubó por 24 horas (Hernández-Alvarez *et al*. 2012). Luego se quitó el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS 1X frío. Se congeló a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA.

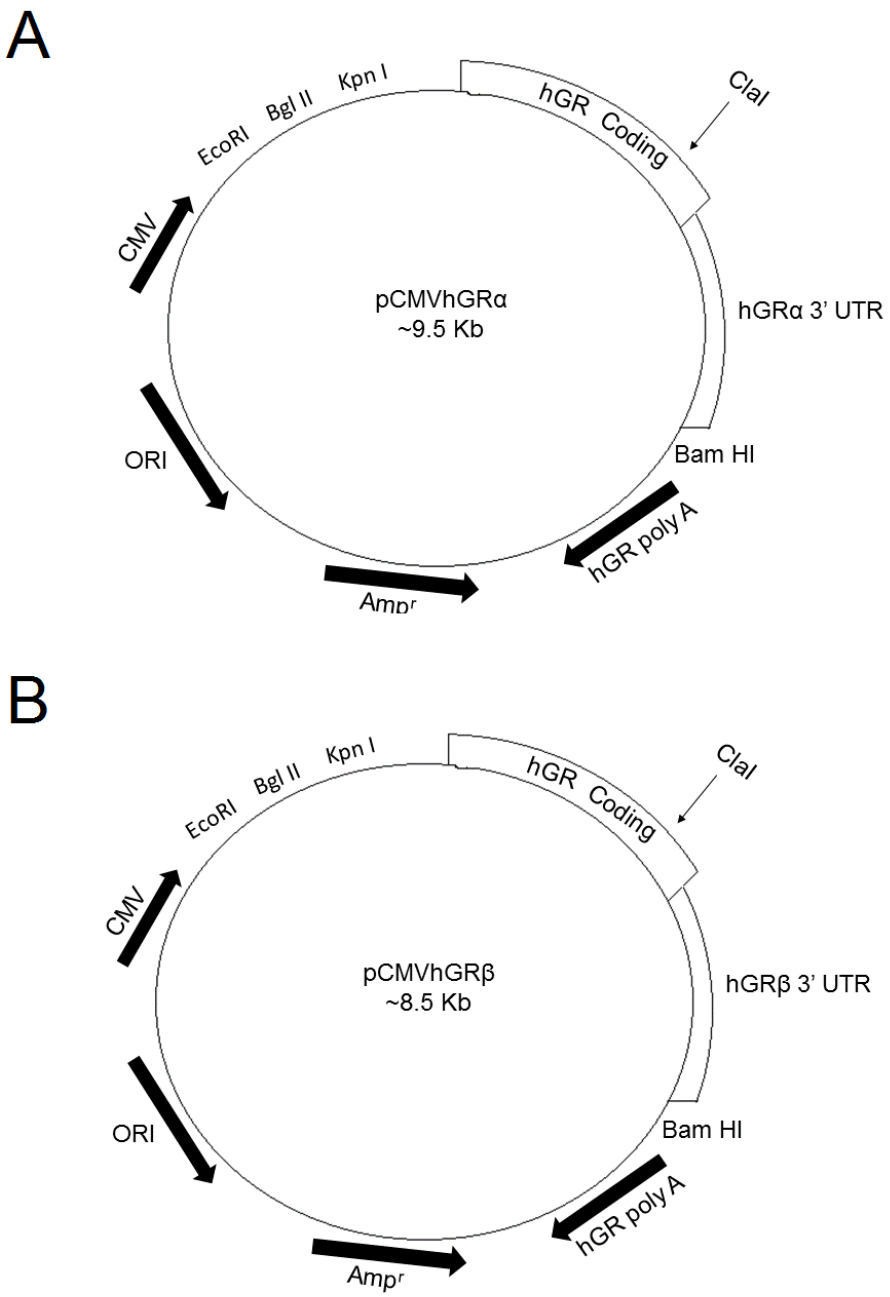


Figura 4. Plásmidos pCMVhGRα y pCMVhGRβ. Ambos plásmidos contienen un solo origen de replicación (ORI), un gen de resistencia a antibiótico (*amp*) y múltiples sitios de enzimas de restricción (*EcoRI, Bgl II, Knp I, ClaI, Bam HI*). Estos difieren en la secuencia codificante que poseen, pCMVhGRα (~9.5 Kb) posee la secuencia codificante para GRα y pCMVhGRβ (~8.5 Kb) posee la secuencia codificante para GRβ.

Tratamiento con insulina

A las células previamente transformadas se les cambió el medio optiMEM® con la solución A+B por medio DMEM 1X sin suero (1mL para placas de 12 pocillos, 2 mL para placas de 35 mm y 10 mL para placas de 100 mm) y se incubó durante una hora. Una vez pasado el tiempo de incubación, se agregó 30 µL/mL de insulina 166,7 µM (Concentración final 100 nM) y se incubó por 30 minutos para inducir la fosforilación de Akt, P70S6K y AMPK. (Stechschulte *et al.* 2014). El mismo tiempo de incubación se utilizó para los ensayos de captación de glucosa y formación de glicógeno. Se utilizó incubación de 3 horas para la inducción de genes por insulina (Hinds *et al* 2010) y para la medición de los niveles de ATP, el tiempo de incubación fue de 24 horas (Huang *et al*. 2005). A continuación, se quitó el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS 1X frío. Se usó de inmediato para los ensayos. Para extracción de proteínas y RNA se congeló a -80°C hasta el momento del ensayo.

Extracción de RNA

Las células se sembraron en placas de 100 mm, se transfectaron y estimularon como se describió anteriormente. Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1X, se lisaron con 1 mL Trizol® (15596026, Thermo Fisher), se recuperó en tubos eppendorf y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se agregó 200 µL de Cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 500 µL de isopropanol, se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 75% y se agitó con vortex antes de centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se secó el pellet al aire, se disolvió en 50 µL de agua libre de ARNasa y se encubó por 10 minutos a 60°C en la placa calefactora. Finalmente se cuantificó la cantidad de RNA presente en las muestras con espectrofotómetro Bioware UV/Visible y utilizando cubeta de cuarzo. Para esto, se agregó 198 µL de H2O de agua DEPC y 2 µL de muestra. Finalmente, se descartaron las muestras con índice A260/280 inferior a 1,5 o superior a 2 y aquellas con concentración menor a 100 ng/µL.

PCR Transcriptasa Reversa (RT- PCR)

Para la formación de cDNA se utilizó SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (18080-051 Life Technologies – Thermo Fisher). Primeramente, se tomó 1 µg de RNA, 1 µL de partidores 50 µM de oligo$(dT)_{20}$, 1 µL de mix de dNTP 10 mM, se agregó agua DEPC hasta completar 10 µL y se incubó a 65°C por 5 minutos en un tubo eppendorf autoclavado y libre de RNAsas. Luego se incubó en hielo durante 1 minuto y se añadió 10 µL de mix de síntesis de cDNA (2 µL Buffer 10X RT, 4 µL $MgCl_2$ 25 mM, 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL RNasaOUT™ y 1 µL SuperScript® III RT (200 U/µL), se centrifugó brevemente y se incubó durante 50 minutos a 50°C. Luego se incubó a 85°C por 5 minutos, se enfrió en hielo, se añadió 1 µL de RNAsa H (2 U/µL) y se incubó por 20 minutos a 37°C. El cDNA formado se almacenó a – 20°C.

PCR Cuantitativo (PCR en Tiempo Real)

Para la amplificación se mezcló (volumen total 10 µL): 5 µL Master Mix Kapa SYBR® 2X (KK4602, Biosystems), 3 µL de Agua destilada ultra pura (Gilbco® By *Life Technologies™*, 10977-015), 0,5 µL de partidor *forward*, 0,5 µL de partidor *reverse* (Tabla 2) y 1 µL de cDNA. El DNA total se utilizó en concentraciones de 1 ng/µL. Para la amplificación, se utilizó el siguiente ciclo; 1 ciclo de 95°C de 2 minutos, 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, 40 segundos a 60°C. Finalmente, se mantuvo 5°C por 15 segundos.

Los espectros de fluorescencia se controlaron mediante ECOillumina® Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Suiza). La fluorescencia limitante (Ct), se calculó mediante el software LinRegPCR Versión 11.0 (Amsterdam, Netherlands) y se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener los niveles relativos de expresión de cada muestra. Los resultados fueron expresados con relación al promedio de tres genes constitutivos: β- Actina, YWHAZ y GAPDH (Secuencias Tabla 2).

Extracción y cuantificación de Proteína

Las células se sembraron en placas de 60 mm y se sometieron a las condiciones experimentales según corresponda. Las células se incubaron en hielo y se lavaron 3

veces con PBS 1X frío. A continuación, se raspó las placas con 75 µL de buffer NP 40 (NP40 Stock; 4,4 g NaCl, 2,1 g Tris-Base, 5 mL de NP 40. Solución de trabajo; 10 mL de NP 40 stock, 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Roche, 11836153001) y 1 pastilla inhibidor de fosfatasas (Roche 04906845001)). Se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, el pellet se descartó y se recuperó el sobrenadante, el cual se utilizó para la cuantificación de proteínas. Luego, se agregó 25 µL de buffer de carga 4X (20 mL Glicerol, 5 g SDS, 1,21 g de Tris-Base, 0,01 g de azul de bromofenol y 10 mL 2-Mercaptoetanol), se incubó por 10 minutos a 100°C y se almacenó a -20°C para su posterior uso. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976). En una placa de 96 pocillos se agregó 145 µL de Reactivo Bradford (Biorad, 500-0006), 4 µL de agua destilada y 1 µL de muestra; para el blanco se agregó en vez de la muestra, 1 µL de buffer de lisis. Se determinó la absorbancia a 600 nm.

Western Blot

Los lisados de proteína de cada grupo en estudio se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Primeramente, se preparó gel separador al 10% con un volumen final aproximadamente de 15 mL (Tabla 3), se dejó a temperatura ambiente hasta que gelifique (15-30 minutos). A continuación, se preparó el gel concentrador al 5% con un volumen final de aproximadamente 10 mL (Tabla 3), se colocó la peineta de acuerdo al número de muestras y se dejó a temperatura ambiente hasta que gelifique. Luego, se puso los vidrios en la cámara de Western Blot Bio-Rad® (Cámara Bio Rad Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU), se llenó con buffer de corrida (Stock 10X 1L: 30,25 g Tris-Base, 144 g Glicina, 10 g SDS. Para solución 1X; 100 mL de Stock 10X en 900 mL de agua Bidestilada) y se retiró la peineta. Se cargaron las muestras, de acuerdo a la cuantificación de proteínas, y el estándar de peso molecular para proteínas, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a 80 v, constante en tiempo.

Tabla 2. Secuencias y condiciones experimentales teóricas de los partidores requeridos. Los partidores diseñados se obtuvieron a través de KiCqStart® SYBR® Green Primers de Sigma-Aldrich®.

Partidor	Partidor	Secuencia 5' a 3'	Tm (°C)
GRα	Forward	CCATTGTCAAGAGGGAAGGAAAC	55,9
	Reverse	ATGATTTCAGCTAACATCTCGGG	54,9
GRβ	Forward	ACTCTTGGATTCTATGCATGAAAATG	53,9
	Reverse	TGTGTGAGATGTGCTTTCTGGTTT	57,1
PDK4	Forward	CTTGGGAAAAGAAGACCTTAC	58,4
	Reverse	GTGCAGTGGAGTATGTATAAC	53,6
G6PC2	Forward	CCGAGCTTSCTSCACTTTTC	55,8
	Reverse	GGTCGATGACCAAATAATATCC	60,8
SLC2A1	Forward	ACCTCAAATTTCATTGTGGG	61,2
	Reverse	GAAGATGAAGAACAGAACCAG	57,9
SLC2A4	Forward	CCATTGTTATCGGCATTCTG	62,8
	Reverse	ATTCTGGATGATGTAGAGGTAG	56,3
HK2	Forward	GAAAGCAACTGTTTGAGAAG	56,7
	Reverse	CAATGTCTGAGATGTCTTTGG	59,8
GBE1	Forward	ATTGTGCTAGATTCAGATGC	56,9
	Reverse	CACCAAAAGAGAATAGGGAC	57,7
PCK1	Forward	ATTCTGGGTATAACCAACCC	59,1
	Reverse	GTTGATGGCCCTTAAATGAC	60,8
PCK2	Forward	GGCATTCGAGATTTTGTAGAG	60,3
	Reverse	CAGCAGTTATTGTACTTGGG	57,3
PTEN	Forward	GGCTAAGTGAAGATGACAATC	57,8
	Reverse	GTTACTCCCTTTTTGTCTCTG	57,0
GAPDH	Forward	CTGCCCCCTCTGCTGATG	58,4
	Reverse	TCCACGATACCAAAGTTGTCATG	55,1
β- Actina	Forward	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	55,3
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	57,9
YWHAZ	Forward	TGCTTCACAAGCAGAGCA	56,9
	Reverse	GTTAAGGGCCAGACCCAGTC	57,7

Para la electrotransferencia, se utilizó una membrana de PVDF que se pre-incubó en metanol por 10 minutos, luego se comenzó la electrotransferencia a amperaje constante de 400 mA por 90 minutos. Se mantuvo la membrana en buffer TBS-T (1 g Tween 20, 100 mL TBS 10X y llevar volumen a 1L) al final de la electrotransferencia. Luego se tiñó

con rojo ponceau (10 g Rojo Ponceau, 150 g Acido tricloroacético y 150 g Acido Sulfosalicílico) durante 1 minuto, se eliminó el rojo ponceau y se lavó reiteradamente la membrana con TBS-T. A continuación, se incubó la membrana con la solución de bloqueo (2,5 g de Leche semi descremada y 50 mL de TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de bloqueo, se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario y se lavó 3 veces por 5 minutos con TBS-T. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con TBS-T por 5 minutos. Los anticuerpos primarios que se utilizaron son; P-Akt (1:1000; #9171 Cell Signaling), Akt total (1:1000; #2920 Cell Signaling), p-P70S6K (1:1000 #9234 Cell Signaling), P70S6K total (1:1000 #9202 Cell Signaling), p-AMPK (1:1000; #2535 Cell Signaling), AMPK Total (1:1000; #2532 Cell Signaling), Glicógeno Sintasa (1:500; #81173 Santa Cruz) y β- Actina (1:1000; #3700 Cell Signaling), mientras como anticuerpo secundario se utilizó anti-*rabbit* (1:5000; 401315 Calbiochem) y Anti-*mouse* (1:5000; 402335 Calbiochem). Todos los anticuerpos se prepararon en TBS-T. Para el revelado, la membrana se expuso a las soluciones quimioluminiscente EZ-ECL (DW1029, Biological Industries), las bandas se obtendrán por medio del C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR, EE.UU) y se cuantificó por medio del software Image Studio versión 3.1.

Tabla 3. Preparación de Geles separador y Concentrador para Western Blot. Para ambos geles es necesario agitar la solución y agregar rápidamente en los vidrios y agregar una capa de isopropanol para eliminar burbujas. Ambos geles tienen un volumen suficiente 2 geles (Bio-Rad, 2000).

Reactivos	Gel Separador 10%	Reactivos	Gel Concentrador 5%
H2O Destilada	6,2 mL	H2O Destilada	5,7 mL
Buffer Lower 4X	3,8 mL	Buffer Upper 4X	2,5 mL
A/BA	5 mL	A/BA	1,7 mL
TEMED	20 µL	TEMED	10 µL
APS 10%	150 µL	APS 10%	90 µL

Medición de los niveles de ATP por Luminometría

Para la medición en los niveles de ATP se utilizó el kit Cell Titer-Glo® (G7570, Promega). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos, se transfectaron y se estimularon según

corresponda. Luego de finalizar el estímulo determinado, se lavó 3 veces con PBS 1X. A continuación, se mezcló 1 mL de Buffer y 1 mL de Sustrato, de esta mezcla se agregó 80µL por pocillo y 80 µL de PBS 1X. Se agito por un minuto y los sobrenadantes se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y se analizó los espectros en Luminómetro. Como blanco se utilizó mix de kit sin muestra. Los resultados fueron expresados con relación al grupo control de estudio, células HepG2 sin transfección y sin estimulo.

Ensayo MTT

Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos, se transfectaron y se estimularon según corresponda. Se preparó Solución MTT (0,5 mg/mL; M5655, Sigma) de la siguiente manera; 1mL de MTT (5 mg/mL) en 9 mL de DMEM sin suero. De esta solución se agregó 400 µL a cada pocillo y se incubó por 2 h a 37°C. Después de la incubación, se lavó 3 veces con PBS 1X tibio, se añadió 400 µL de Isopropanol y se incubó por 10 min a 37°C. El sobrenadante se transfirió por duplicado a una placa de 96 pocillos y se midió por absorbancia a 550 nm. Como blanco se usó isopropanol sin muestra. Los resultados fueron expresados con relación al grupo control de estudio, células HepG2 sin transfección y sin estimulo.

Captación de Glucosa

Las células HepG2 se sembraron en placas con cubreobjetos de 25 mm, se transfectaron y posterior a los estímulos, se lavaron 3 veces con solución de Krebs con Ca^{+2} 2,5 mM sin glucosa (Para 1L; 8,5 g NaCL, 0,37 g KCL, 0,3822 g $CaCl_2$, 0,2032 g $MgCl_2$, 2,383 g Hepes. pH 7,4) a temperatura ambiente, y luego se estimularon con insulina 100 mM por 20 minutos. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con solución Krebs con Ca^{+2} sin glucosa y se incubaron con 300 µL de 2-NBDG 30 mM (N13195, Thermo Fisher) durante 15 minutos a temperatura ambiente (Zou *et al.* 2005). Las células se lavaron 3 veces con solución Krebs con Ca^{+2} con glucosa fría (Para 1L; 8,5 g NaCL, 0,37 g KCL, 0,3822 g $CaCl_2$, 0,2032 g $MgCl_2$, 2,383 g Hepes, 1,0092 g Glucosa. pH 7,4) y se montaron en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución tampón Krebs con Ca^{+2} con glucosa fría y se obtuvo las imágenes con microscopio de epifluorescencia

Nikon. Para cada secuencia de imágenes obtenidas, se determinó los niveles de fluorescencia en regiones de interés de células individuales. Para el análisis de imágenes se utilizó el software Image J (National Institute of Mental Health, EEUU). Los resultados fueron expresados con relación al grupo control de estudio, células HepG2 sin transfección y sin estimulo.

Detección de Glicógeno

Las células HepG2 se sembraron en placas con cubreobjetos de 25 mm, se transfectaron y posterior a los estímulos, se lavaron 3 veces con solución Hepes 10mM (Para 1L; 8,1 g NaCl, 0,99 g D-Glucosa, 0,37 g KCl, 0,20 g $MgCl_2$, 0,22 g $CaCl_2$, 2,4 g Hepes. pH 7,4). Luego en 500 µL de Hepes 10 mM (por pocillo) se agregó 8,3 µL de 2-NBDG 30 mM (N13195, Thermo Fisher), se incubó por 3 horas a 37°C (Favaro *et al.* 2012). Se removió el 2-NBDG y se lavó 3 veces con Hepes 10 mM. Se incubó durante 3 horas con DMEM sin suero a 37°C. Finalmente, se lavó 3 veces con Hepes 10 mM y se montó el cubreobjeto en una cámara de perfusión de 1 mL de capacidad, con 500 µL de solución Hepes 10 mM y se obtuvo las imágenes con microscopio confocal. Para cada secuencia de imágenes obtenidas, se determinó los niveles de fluorescencia en regiones de interés de células individuales. Para el análisis de imágenes se utilizó el software Image J (National Institute of Mental Health, EEUU). Los resultados fueron expresados con relación al grupo control de estudio, células HepG2 sin transfección y sin estimulo.

Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron cuatro veces de manera independiente (n=4). Los datos se expresaron como valor promedio ± error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron con Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, EEUU). Los grupos se compararon mediante *One-way* ANOVA, se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando el nivel de confianza es inferior a 5 ($p<0,05$). Como post-análisis estadístico se utilizó Test de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de expresión GRα y GRβ en células HepG2

La sobreexpresión de GRα y GRβ en células HepG2 a nivel de RNA mensajero y de proteína se encuentran en la figura 5. Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock), adicionalmente los resultados de PCR en tiempo real se encuentran normalizados por el promedio de tres genes constitutivos: β-Actina, YWHAZ y GAPDH. La expresión relativa a nivel de RNA mensajero (Figura 5A y 5B) y de proteína (Figura 5C y 5D) en ambas isoformas aumenta significativamente cuando se transfectan los plásmidos pCMVhGRα y pCMVhGRβ. La transfección de pCMVhGRα en esta línea celular no afecta la expresión de GRβ (Figura 5A), y de igual forma, la transfección de pCMVhGRβ no afecta la expresión de GRα (Figura 5B). El análisis en los niveles de expresión de PTEN se utilizó como control positivo de la sobreexpresión de GRβ (Figura 5E). La expresión de PTEN disminuye significativamente cuando se sobreexpresa GRβ.

5.2 GRβ como modulador en la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa.

Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock), adicionalmente se encuentran normalizados por el promedio de tres genes constitutivos: β-Actina, YWHAZ y GAPDH. La expresión de los genes gluconeogénicos, G6Pasa, PCK1 y PCK2 en células HepG2 a las cuales se les sobreexpresó GRβ se muestran en la figura 6. Los resultados muestran que dexametasona induce la expresión de G6Pasa, PCK1 y PCK2. Por otro lado, la sobreexpresión de GRβ disminuye significativamente la expresión de G6Pasa y PCK2 de forma independiente de insulina y dexametasona (Figura 6A y 6C). Además, en la Figura 6A se muestra que GRβ actúa como dominante negativo de GRα, ya que contrarresta su efecto. En el caso de PCK1, GRβ no genera cambios significativos en la expresión de esta enzima (Figura 6B).

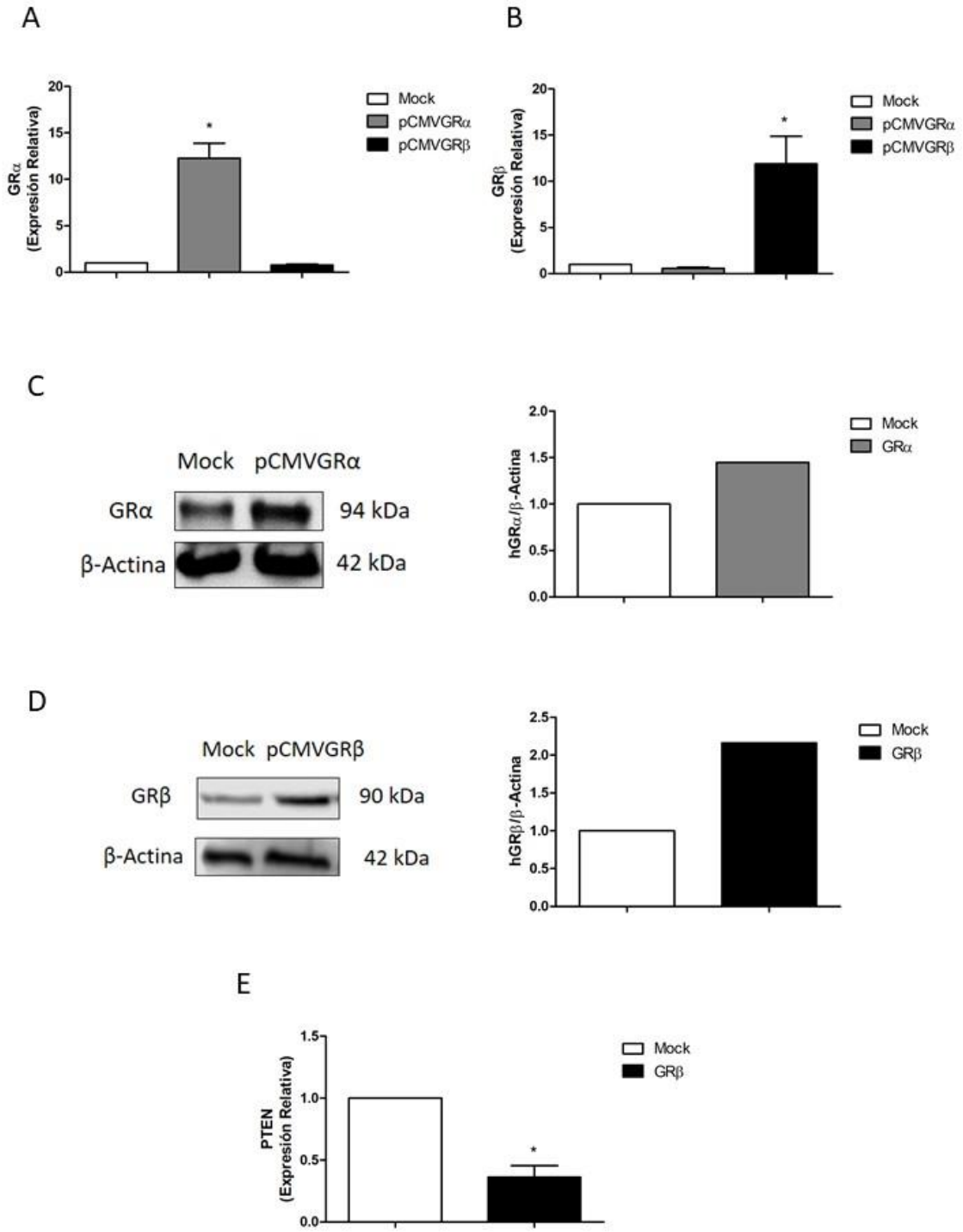


Figura 5. Sobreexpresión de pCMVGRα y pCMVGRβ en células HepG2. Los niveles de transcrito (A) GRα, (B) GRβ y (E) PTEN, se midieron por PCR en tiempo real, se utilizó el utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener los niveles relativos, donde además se utilizó el promedio de tres genes constitutivos: β- Actina, YWHAZ y GAPDH. La expresión a nivel de proteínas de (C) GRα y (D) GRβ, medido por western blot y su cuantificación por Densitometría. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock).

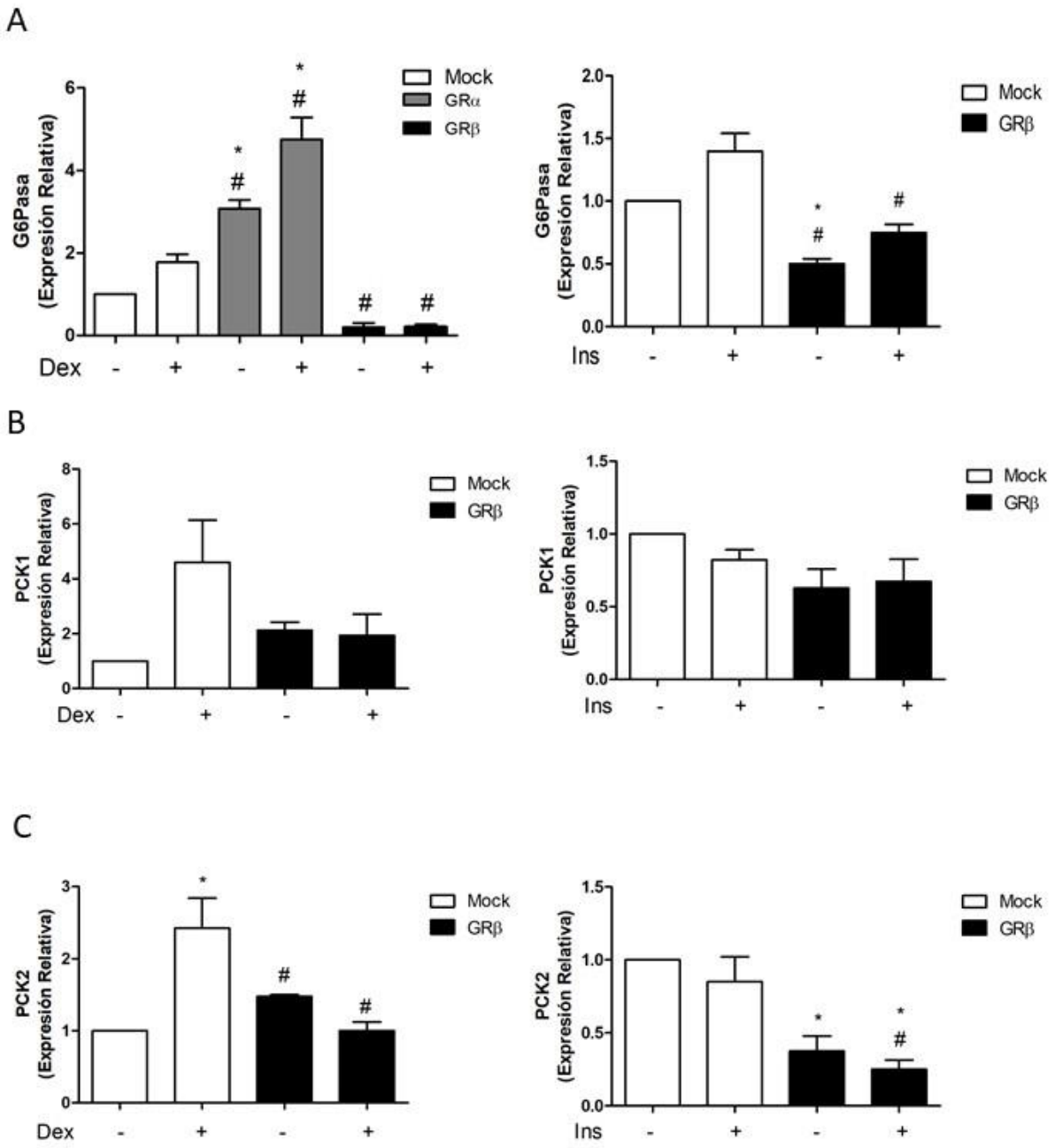


Figura 6. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en genes gluconeogénicos. Los ensayos se realizaron en celulas HepG2, las cuales se tranfectaron con pCMVhGRα y pCMVhGRβ. Los niveles de transcrito se midieron mediante PCR en tiempo real, se utilizó el utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener los niveles relativos, donde además se utilizó el promedio de tres genes constitutivos: β- Actina, YWHAZ y GAPDH. (A) Glucosa 6 Fosfatasa (G6Pasa) (B) Fosfopiruvato carboxiquinasas isoforma 1 (PCK1) y (C) Fosfopiruvato carboxiquinasas isoforma 2 (PCK2). Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock), # p<0,05 vs control + Estimulo (Dex o Ins).

El análisis en la expresión de genes glicolíticos se muestra en la figura 7. En el caso de HK2, no hay cambios significativos en los niveles de mRNA de esta enzima, ni con insulina ni con la sobreexpresión de GRβ (Figura 7A). Sin embargo, GRβ aumenta los niveles de PDK4 de forma independiente a insulina (Figura 7C).

El análisis de la expresión de la GBE se muestra en la figura 7B. Se muestra la tendencia de insulina y GRβ de aumentar los niveles de RNA mensajero de esta enzima. En cambio, cuando se sobreexpresa GRβ y se estimula con insulina, aumenta significamente la expresión de esta enzima.

Los niveles de expresión de GLUT 1, 2 y 4 se muestran en la figura 8. Insulina aumenta significativamente la expresión de GLUT1 en células no transfectadas con pCMVGRβ, sin embargo, cuando se sobreexpresa esta isoforma de GR, los niveles de RNA mensajero de GLUT1 disminuyen significativamente (Figura 8A). Por otro lado, se muestra en la figura 8B, la tendencia de GRβ de aumentar los niveles de mRNA de GLUT2, donde además potencia significativamente la acción de la insulina. En la Figura 8C, se muestra que GRβ aumenta los niveles de transcrito de GLUT4 de manera similar a insulina, sin embargo, esta potencia significativamente la acción de insulina.

5.3 Participación de GRβ en el metabolismo de la glucosa inducido por insulina.

Los resultados de este objetivo se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock). Para ver si existe una relación entre GRβ e insulina, se medió mediante western blot la fosforilación de enzimas claves en su vía de señalización, Akt, P70S6K y AMPK.). Los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) en células HepG2 transfectadas con pCMVhGRβ se muestran en la Figura 9A. GRβ es capaz de aumentar significativamente los niveles de p-Akt de manera similar a la acción de insulina. De igual forma, la fosforilación de P70S6K (p-P70S6K) se ve aumentada por GRβ, independiente del estímulo con insulina (Figura 9B). Por otro lado, la fosforilación de AMPK (p-AMPK) tiende aumentar en aquellas células en las cuales se sobreexpresó

GRβ. Sin embargo, este aumento es significativo cuando las células son transfectadas con pCMVGRβ y estimuladas con insulina (Figura 9C).

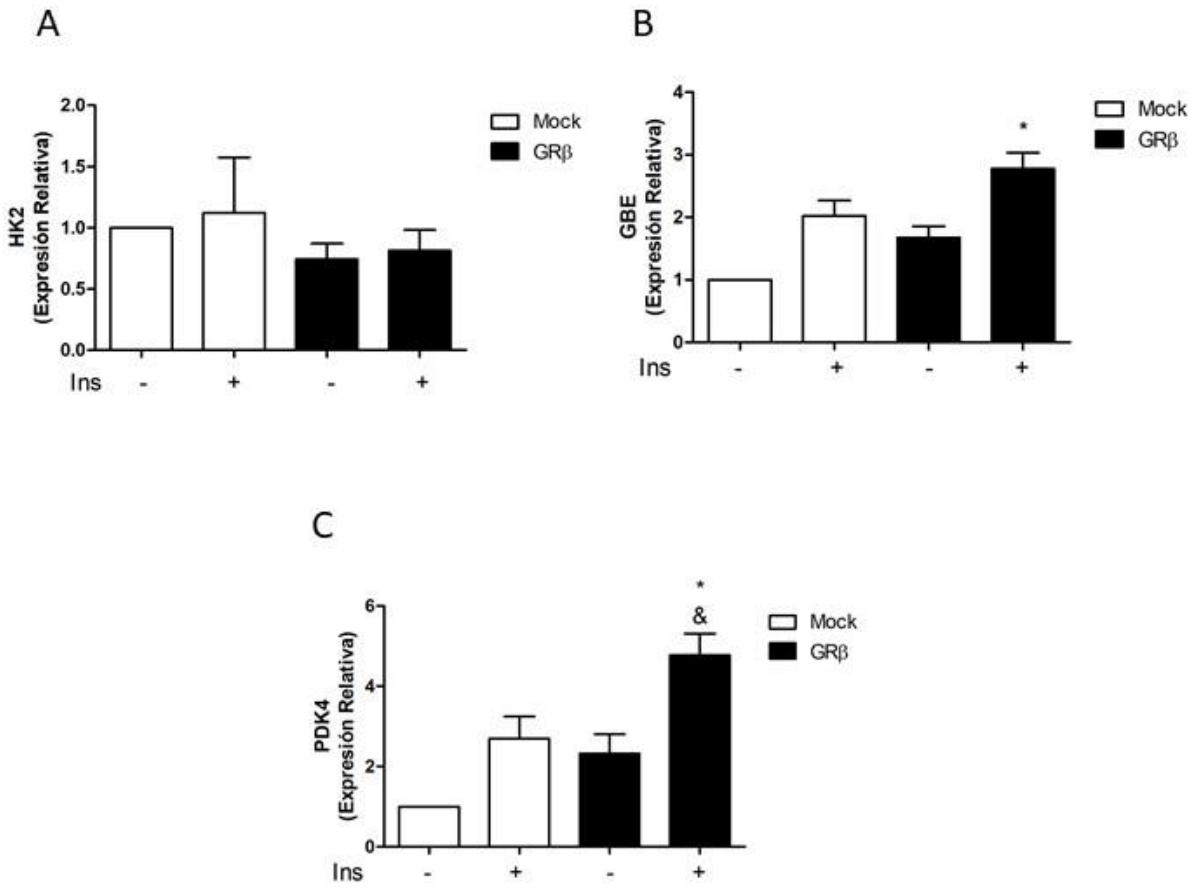


Figura 7. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en genes glicolíticos y glicogénesis. Los ensayos se realizaron en celulas HepG2, las cuales se tranfectaron con pCMVhGRα y pCMVhGRβ. Las células se estimularon con Insulina 100 nM por 3 h. El nivel de transcrito se midió mediante PCR en tiempo real, se utilizó el utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener los niveles relativos, donde además se utilizó el promedio de tres genes constitutivos: β- Actina, YWHAZ y GAPDH. (A) Hexoquinasa 2, (B) Enzima ramificadora de glicógeno, (C) Complejo piruvato deshidrogenasa quinasa isoforma 4. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock), # p<0,05 vs control + Estimulo (Dex o Ins), & p<0,05 vs GRβ.

Para ver si GRβ tiene alguna implicancia en la captación de glucosa en esta línea celular, se midió la captación de un análogo de glucosa fluorescente, 2-NBDG, el cual se observó a través de microscopia confocal. Como se muestra en la Figura 10, las células en las

cuales se sobreexpresó GRβ muestran un aumento significativo en la captación de 2-NBDG con respecto al grupo control. De igual forma, las células HepG2 a las cuales se les sobreexpresó GRβ y se les estimuló con insulina muestran un aumento significativo en la captación de 2-NBDG.

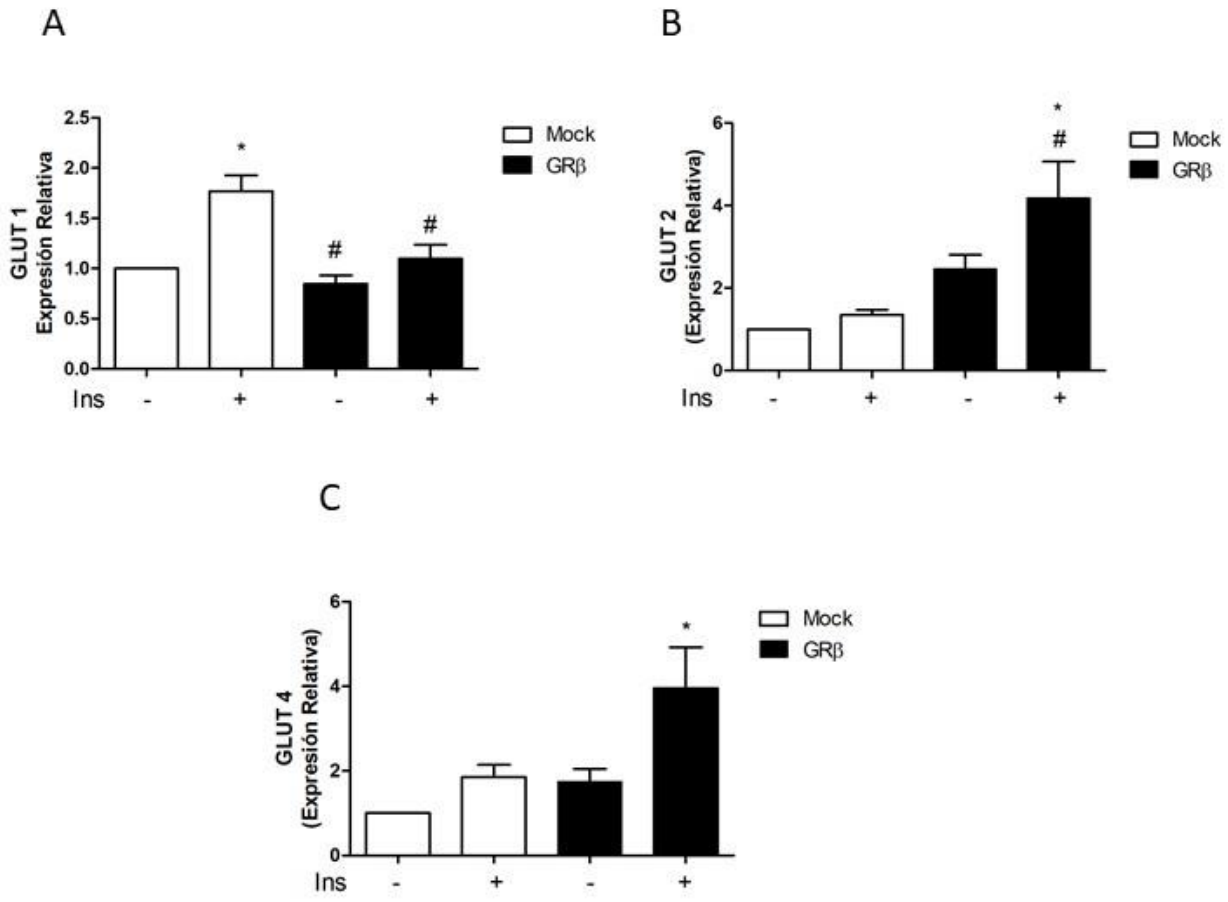


Figura 8. Sobreexpresión de GRβ y el efecto en transportadores de glucosa. Los ensayos se realizaron en celulas HepG2, las cuales se tranfectaron con pCMVhGRβ. El estímulo corresponde a Insulina 100 nM durante 3 h. El nivel de transcrito se midió mediante PCR en tiempo real, se utilizó el utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para obtener los niveles relativos, donde además se utilizó el promedio de tres genes constitutivos: β- Actina, YWHAZ y GAPDH. (A) GLUT 1, (B) GLUT2, y (C) GLUT4. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock), # p<0,05 vs control + Insulina (Ins).

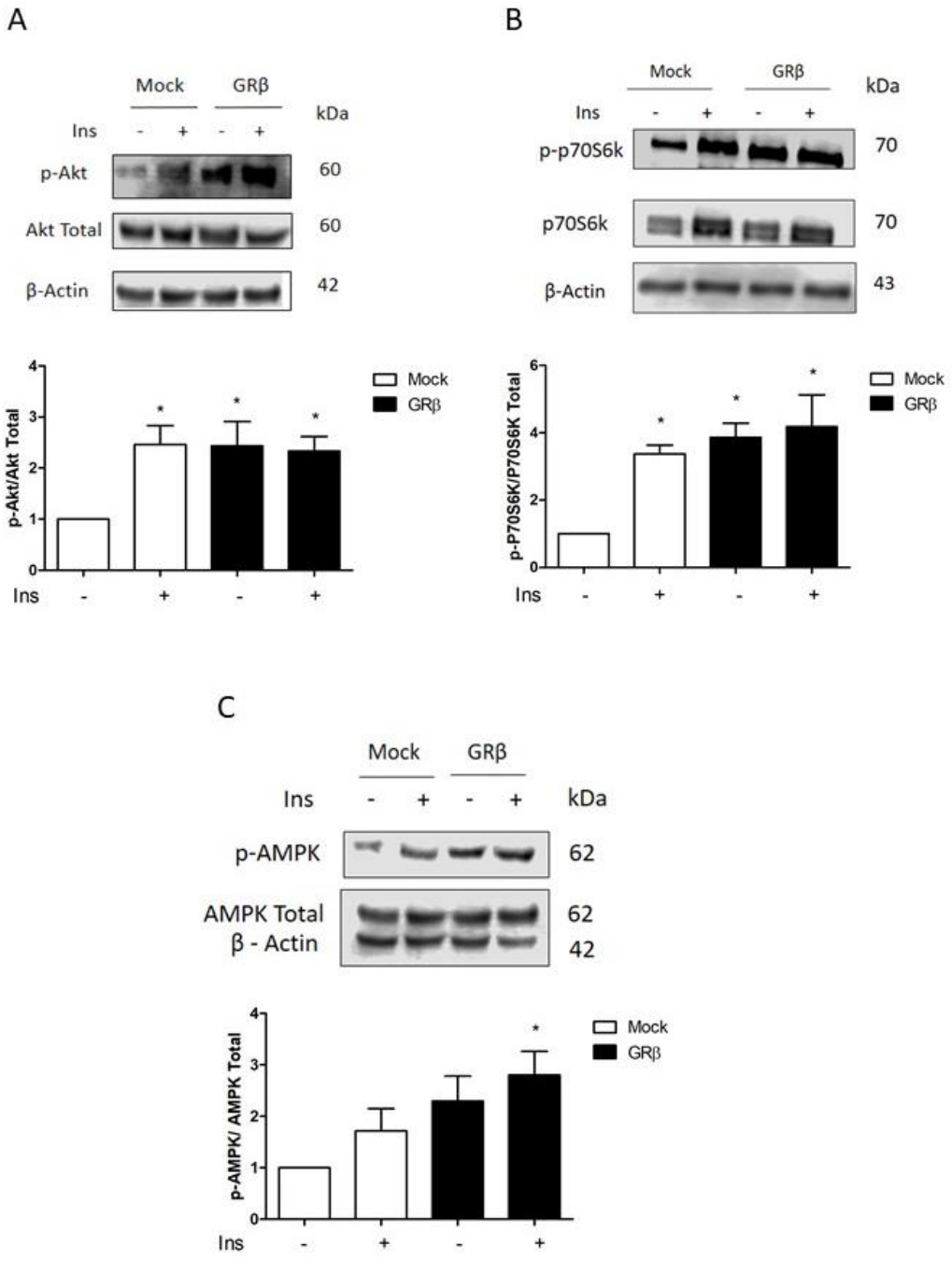


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de GRβ en la fosforilación de Akt, P70S6K y AMPK. Los ensayos se realizaron en celulas HepG2, las cuales se tranfectaron con pCMVhGRβ y se estimuló con Insulina 100 nM por 0.5 h. La separación de proteínas se realizó mediante Western blot y las bandas se cuantificaron por densitometría. Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock). (A) Niveles de fosforilación de Akt, (B) Niveles de fosforilación de P70S6K, y (C) Niveles de fosforilación de AMPK. Los resultados corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock).

Para seguir estudiando si GRβ tiene algún rol energético en esta línea celular, se midieron los niveles de ATP y la viabilidad celular. En los niveles de ATP no hubo cambios significativos en aquellas células en las cual se sobreexpresa GRβ (Figura 11A). Por otro lado, GRβ es capaz de aumentar la viabilidad celular, independiente del estímulo con insulina (Figura 11B).

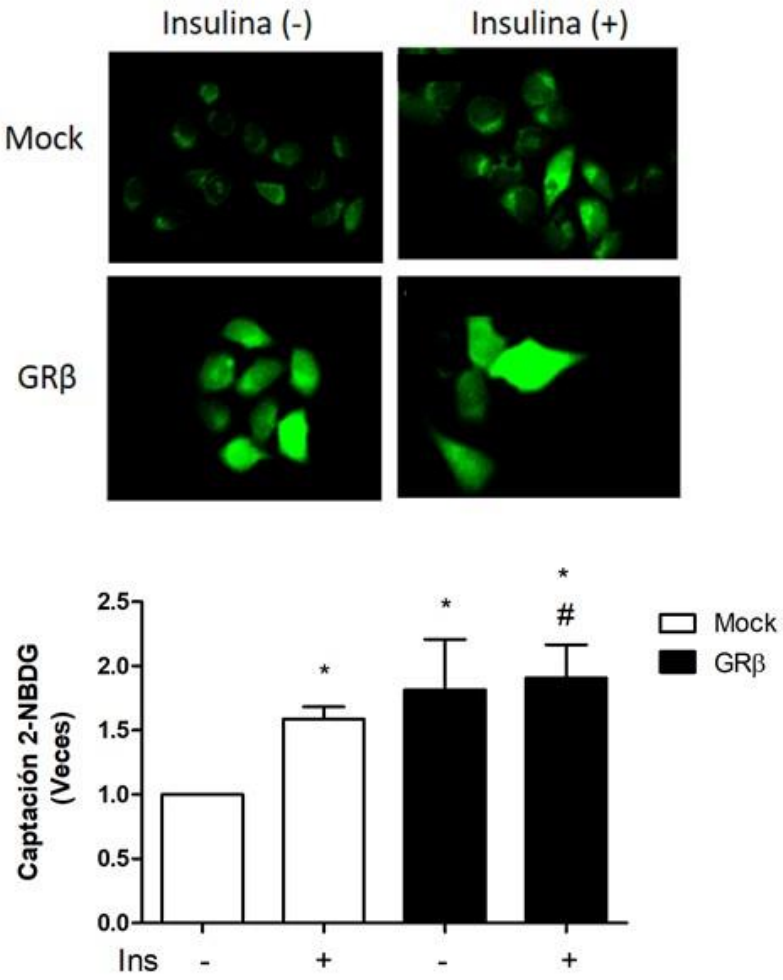


Figura 10. Efecto de GRβ en la Captación de 2-NBDG. Experimentos se realizaron en células HepG2 estimuladas con insulina 100 nM por 0.5 h, las imágenes se obtuvieron a través de microscopia confocal y se analizaron mediante el programa Image J. Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock) y corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock), # p<0,05 vs control + Insulina (Ins).

5.4 Efecto de GRβ en la acumulación de glicógeno en células HepG2.

Para estudiar si GRβ tiene un rol en la acumulación de energía, se estudió la acumulación de glicógeno por 2-NBDG por microscopia confocal y medición por western blot de la enzima Glicógeno Sintasa (GS). Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock). GRβ aumenta significativamente la acumulación de glicógeno, como se muestra el patrón punteado en la Figura 12A, independiente del estímulo de insulina. De la misma forma, GRβ aumenta significativamente la expresión de la enzima GS (Figura 12B).

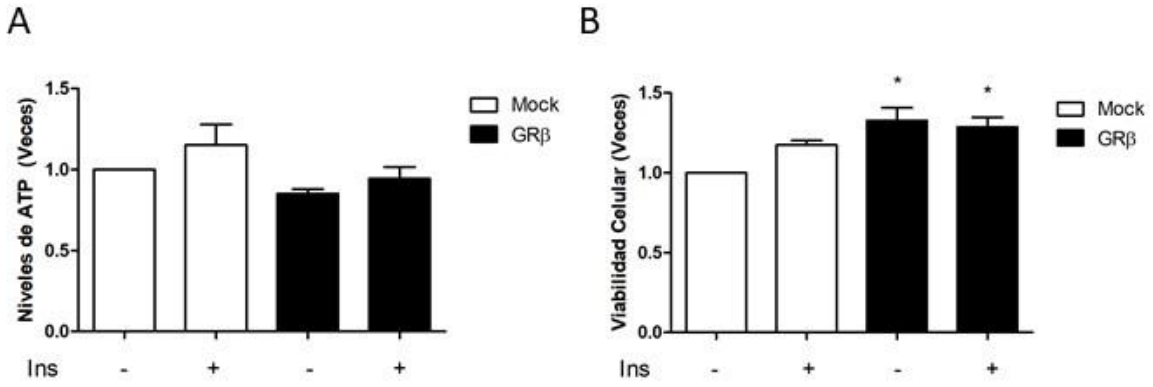


Figura 11. Efecto de GRβ los niveles de ATP y Viabilidad Celular. Experimentos se realizaron en células HepG2 a las cuales se les sobreexpresó hGRβ. (A) Los niveles de ATP se midieron a través Luminometría. Las células fueron estimuladas con insulina 100 nM por 3 h. (B) Viabilidad Celular, se medió mediante el ensayo MTT. Las células fueron estimuladas con insulina 100 nM durante 24 h. Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock) y corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock).

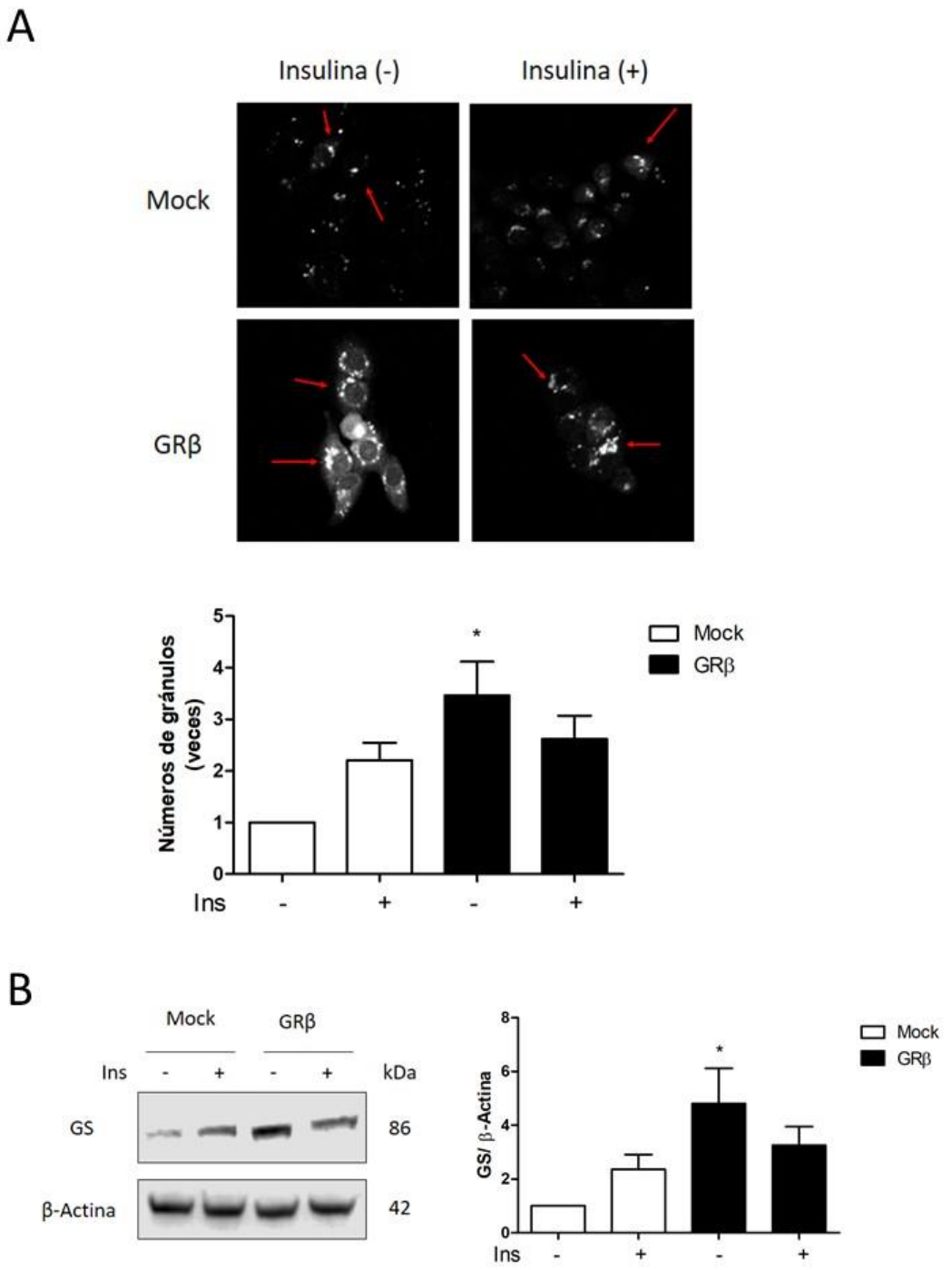


Figura 12. Efecto de GRβ en la acumulación de glicógeno. Los experimentos se realizaron en células HepG2 a las cuales se les sobreexpresó GRβ y se estimuló con insulina 100 nM. (A) Acumulación de glicógeno se caracterizó por patrón punteado, las imágenes se obtuvieron por microscopia de fluorescencia y se analizaron mediante Image J. (B) Expresión de la proteína Glicógeno Sintasa (GS) medido por western blot Los resultados se encuentran expresados relativamente contra el grupo experimental no transfectado ni estimulado (Mock) y corresponden al promedio ± SEM de al menos 4 experimentos independientes, * p< 0,05 vs control (Mock).

6. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo donde se reporta el efecto de GRβ sobre la síntesis de glicógeno. En este trabajo se utilizó la línea celular hepática HepG2 como modelo de estudio, a las cuales se les transfectó un plásmido que codifica para GRβ, luego fueron estimuladas con insulina y se les sometió a diferentes ensayos moleculares y metabólicos.

GRβ además de ser dominante negativo de GRα, tiene una función metabólica y celular. Dentro de la actividad intrínseca de GRβ, se encuentra que esta isoforma disminuye la expresión de PTEN en células MEF (Stechschulte *et al* 2014), por lo cual se utilizó la expresión de esta fosfatasa como control positivo para la sobreexpresión de GRβ. Por otro lado, esta isoforma de GR se encuentra ampliamente distribuido en organismos como rata (DuBois *et al.* 2013), ratón (Hinds *et al.*2010), pez cebra (Schaaf *et al.* 2008) y humanos (Pujols *et al*. 2002 y Christodoulopoulos *et al.* 2005). Esta distribución se concentra principalmente en tejidos como hígado, riñón, músculo esquelético, corazón, entre otros, y en células inflamatorias; eosinófilos, macrófagos y neutrófilos. También se ha detectado esta isoforma en diversas líneas celulares como HeLa (Kino *et al*. 2009), MEF, C2C12 (Stechschulte *et al* 2014), SaOS-2, HepG2 (Solakidi et al. 2007), UMUC-3 y T-24 (McBeth *et al*. 2016).

Por otro lado, los GCs son bien conocidos por modular el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, su uso prolongado puede producir resistencia a la insulina. En el hígado, los GCs estimulan la gluconeogénesis aumentando la expresión de RNA mensajero de G6Pasa (Hinds *et al.* 2010) y PCK (Ma *et al*. 2013). Estas acciones son moduladas por GRα, donde GRβ produce un efecto contrario. En ratones, GRβ disminuye la gluconeogénesis hepática debido a una disminución en la expresión de PCK1 (He *et al.* 2015). A esto se le suma lo anteriormente reportado por Hinds *et al.* 2010, donde GRβ disminuye la expresión de G6Pasa y PCK en células MEF. De igual forma, se decidió medir ambas isoformas de PCK, PCK1 esa la isoforma citosólica que se encuentra modulada por hormonas como GCs, insulina y glucagón. Los GCs y glucagón aumentan la expresión del RNA mensajero (Beale *et al.* 2003 y Han *et al.* 2015), mientras insulina

disminuye esta expresión (Mizuno *et al.* 2016). Por otro lado, PCK2 es la isoforma mitocondrial y un aumento en su actividad se encuentra relacionado con un aumento en la producción de lactato (Zhao *et al.* 2017), siendo este precursor de la ruta gluconeogénica. En este trabajo, se obtuvo resultados significativos de PCK2 y no de PCK1. Estos resultados son la primera evidencia de que GRβ modula PCK2, sugiriendo que esta isoforma de GR tendría una participación en la glicolisis anaeróbica.

Otro proceso en el metabolismo de la glucosa es el proceso de glicolisis. HK2 es la enzima que cataliza el primer paso del proceso de glicólisis, esta actúa mediante una irreversible fosforilación de glucosa entrante a la célula. Hay cuatro isoformas de esta enzima, que van de 1 al 4, siendo HK2 la isoforma principal y se encuentra en tejidos sensible a insulina (Wilson, 2003). Por esto, en este trabajo se decidió medir HK2 y no HK4, que es la isoforma predominante del hígado (Pastorino y Hoek, 2003). HK2 se encuentra sobreexpresada en varias líneas celulares como, por ejemplo; HCT116 (Zhu et al. 2017), MEF, PC3 (Wang *et al.* 2014), REH (Leni *et al*. 2017) donde la supresión de HK2 produce una disminución en la captación de glucosa, glicólisis y proliferación celular. Esta enzima se encuentra modulada por la insulina a través de la vía de señalización Akt/mTOR y es suprimida por PTEN (Wang *et al*. 2014). Tal como se mencionó anteriormente, GRβ suprime PTEN, por lo cual se espera que HK2 aumentara su expresión, lo cual no corresponde a los resultados obtenidos. Lo cual podría deberse a que HK2 posee una Km máxima 5 mM y a concentraciones mayores, como los 25 mM del medio DMEM, no provoca un aumento en la actividad de esta enzima (Fujii y Beutler, 1985).

Otra enzima importante de la vía glicolitica es PDK4, que fosforila e inactiva el complejo deshidrogenasa, y con esto disminuir el ciclo de krebs. En Hepatocarcinoma, la expresión de PDK4 se encuentra suprimido por insulina y activado por dexametasona (Know *et al.* 2004 y Connaughton *et al.* 2010). En células MEF, GRβ es capaz de disminuir la expresión de PDK4 inducido por dexametasona (Hinds *et al.* 2010). Por otro lado, los altos niveles de glucosa, a largo plazo, altera la vía de señalización de Akt y junto a esto PDK4 aumenta su actividad (Quintela *et al.* 2014).

Para mediar todos estos procesos del metabolismo de la glucosa, es necesario que la glucosa entre a las células. Las células tienen transportadores transmembrana específicos para glucosa. GLUT1 se encuentra expresado en varios tejidos y es el transportador basal de glucosa, mientras que GLUT2 se encuentra preferencialmente en hígado y páncreas, y es sensor de glucosa en estos tejidos (Olson y Pessin,1996). GLUT4 se encuentra principalmente en músculo esquelético (Weinstein *et al.* 1998) y tejido adiposo (Hajduch *et al.* 1995) y su translocación a la membrana plasmática depende de insulina. En células HepG2 se encuentran expresadas estas 3 isoformas del transportador de glucosa y su expresión aumenta en presencia de insulina (Li et al. 2016, Aravinthan *et al*. 2015 y Jiang *et al*. 2016). Los resultados obtenidos varían para cada isoforma y esto se encuentra asociado a la afinidad de estos transportadores por la glucosa (Gould y Holman, 1993 y McCarthy y Elmendorf, 2007).

Para evaluar el metabolismo de la glucosa inducido por insulina en células HepG2 que sobreexpresan GRβ, se medió los niveles de p-Akt y p-P70S6K, ambas enzimas importantes en la vía de señalización de insulina (Jiang *et al.* 2003 y Doscas *et al.* 2014). Por otro lado, aumento en la expresión de Akt en hepatocarcinoma y cultivo primario de hepatocitos disminuye la expresión de mRNA de PCK y G6P (Agati *et al.* 1998 y Schmoll *et al.* 2000). Al activarse la vía de señalización Akt en células HepG2, se promueve la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, resultando en un aumento en la captación de glucosa (Bhakta *et al.*2017). GRβ aumenta los niveles de p-Akt y promueve la proliferación celular en células MEF y 3T3 (Stechschulte *et al.* 2014).

Cuando hay abundancia de glucosa, como en este caso, la actividad de Akt se encuentra activada promoviendo la proliferación celular y la actividad de AMPK se encuentra limitada. Las vías Akt y AMPK interactúan de la siguiente forma; insulina a través de p-Akt activa mTOR (Figura 3), promoviendo la síntesis de proteínas y la proliferación celular, e inhibiendo el proceso de autofagia. Por otro lado, AMPK inhibe mTOR inhibiendo estos procesos debido a- los bajos niveles de ATP (Hahn-Windgassen et al. 2005). Es por esto que se midió AMPK, el sensor celular de energía. AMPK se activa mediante fosforilación (p-AMPK^{Thr172}), promoviendo la activación de vías catabólicas;

captación de glucosa, glicólisis y oxidación de ácidos graso e inhibiría la gluconeogénesis y la acumulación de glicógeno (Herzig y Shaw, 2017), debido a los bajos niveles de ATP intracelulares y de forma contraria cuando se fosforila en Ser^{485}, AMPK se inactiva (Hardie *et al.* 2012). En musculo esquelético, insulina aumenta los niveles de p-$AMPK^{Ser485}$ y no genera cambios en p-$AMPK^{Thr172}$ (Valentine *et al.* 2014). Sin embargo, reportes recientes sugieren que la activación de AMPK por diferentes vías aumenta la sensibilidad de insulina y sus efectos, lo que sugiere que AMPK e insulina no actúan de manera contraria en todos los modelos (Bernal-Sore *et al.* 2017).

Después de la ingesta de alimentos, el exceso de glucosa se almacena en forma de glicógeno en hígado y músculo esquelético. La síntesis de glicógeno requiere de una acción coordinada de varias enzimas, donde se destacan la Glicógeno Sintasa (GS) y la Enzima Ramificadora de Glicógeno (GBE). GS cataliza la formación de enlaces α-1,4 glucosídico, generando la cadena lineal del glicógeno y GBE produce las ramificaciones, formando el enlace α-1,6 glucosídico (Adeva-Andany *et al.*2016). La regulación de GS se basa en proceso de fosforilaciones y desfosforilaciones (Ragolia *et al.* 1998). La fosforilación se lleva a cabo por enzimas denominadas glicógeno sintasa Quinasa (GSK), las cuales inactivan la GS y por lo tanto la síntesis de glicógeno. Por otro lado, las desfosforilaciones están a cargo de las enzimas glicógeno sintasa fosfatasa, las cuales activan la GS permitiendo la síntesis de glicógeno. Insulina mediante la activación de Akt, permite la fosforilación de GSK, inactivándola y promoviendo así la síntesis de glicógeno (Patel *et al.*2008). Nuestros resultados concuerdan con estos antecedentes, ya que GRβ promueve la síntesis de glicógeno por la activación de la vía Akt. (Figura 7B y 12).

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo de tesis se evaluó el rol de la isoforma beta del receptor humano de glucocorticoides (GRβ) en el metabolismo de la glucosa inducido por insulina en la línea celular hepática HepG2. Considerando los antecedentes planteados y los resultados obtenidos se concluyó que:

a) GRβ regula el metabolismo de los carbohidratos en la línea celular HepG2 ejerciendo efectos similares a los de insulina.
b) GRβ modula la expresión de genes relacionados con el metabolismo. Disminuye la expresión de los genes gluconeogénicos (G6Pasa y PCK) y PTEN, aumenta la expresión de GBE y los trasportadores de glucosa 2 y 4.
c) GRβ activa la vía Akt/P70S6K, promoviendo así, el aumento en la captación de glucosa y formación de glicógeno.

8. PROYECCIONES

Si bien esta tesis consiste fundamentalmente en la investigación de establecer un rol de GRβ y su fenotipo metabólico. El estudio de los mecanismos de regulación es importante, pues sienta una base para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Si bien aún los estudios en los mecanismos de regulación en los cuales participa GRβ se encuentran en una etapa temprana, las siguientes etapas de nuestra investigación son:

a) Determinar causalidad de los efectos de GRβ en el metabolismo de glucosa, sobreexpresando PTEN.
b) Expandir la investigación a un modelo *in vitro* e *in vivo* a otros tejidos relevantes para la regulación metabólica como musculo esquelético y tejido adiposo.
c) Definir aplicaciones biotecnológicas a partir de resultados obtenidos.

9. REFERENCIAS

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 282, 615-616.

- Adeva-Andany M, González -Lucán M, Donapetry-García C, Ferández-Fernández C, Ameneiros-Rodriguez E. (2016). Glycogen metabolism in humans. BBA Clinical 5, 85–100.

- Agati JM, Yeagley D, Quinn PG. (1998) Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. J Biol Chem. (30):18751-9.

- Arden C, Baltrusch S, Agius L. (2006). Glucokinase regulatory protein is associated with mitocondria in hepatocytes. FEBS Letters 580, 65-70.

- Aravinthan A, Challis B, Shannon N, Hoare M, Heaney J, Alexander GJ. (2015) Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. Exp Cell Res. ;331(1):38-45.

- Bamberger C, Bamberger. AM, De Castro M, Chrousos G. (1996). Glucocorticoid receptor β, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. The J. of Clinical Investigation 95, 2435-2441.

- Barnes, P.J. 2006. Corticosteroid effects on cell signalling. Eur. Respir J. 27, 413–426.

- Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK. (1995). Glucocorticoid resistance in asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152, 125−140.

- Barthel A, Schmoll D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, 685–692.

- Beale EG, Forest C, Hammer RE. 2003. Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes. Biochimie.12:1207-11.

- Bernal-Sore I, Navarro-Marquez M, Osorio-Fuentealba C, Díaz-Castro F, Del Campo A, Donoso-Barraza C, Porras O, Lavandero S, Troncoso R (2017) Mifepristone enhances insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in skeletal muscle cells. Mol Cell Endocrinol. : S0303-7207(17)30513-0. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.028.

- Bhakta H, Paudel P, Fuji iH, Sato A, Park C, Yokozawa T, Jung H, Choi JS. (2017) Oligonol promotes glucose uptake by modulating the insulin signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells via inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B. Arch Pharm Res. 11, 1314-1327.

- Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories. 2000. Catálogo de uso N° 161-0154 al 16-0159 y 161-0140 al 161-0149.

- Bose JM, Hutson I, Harris G. (2016) Hepatic Glucocorticois Receptor Plays a greater role tan adipose GR in metabolic syndrome despite Renal Compensation. Endocrinology 12, 43-60.

- Bowlesa N, Karatsoreosa I,Lic X, Vemurie V, Woode JA, Lig Z, Tamashiroh K, Schwartz G, Makriyannise A, Kunosi G, Hillardj C, McEwena B, Hill M. (2014). A peripheral endocannabinoid mechanism contributes to glucocorticoid-mediated metabolic síndrome. PNAS 112, 285-290.

- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle ofprotein-dye binding. Anal Biochem.72, 248-254.

- Breuner CW, Orchinik M. (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. J Endocrinol 175, 99-112.

- Charmandari E, Chrousos GP, Ichijo T, Bhattacharyya N, Vottero A, Souvatzoglou E, Kino T. (2005). The human glucocorticoid receptor (hGR) β isoform suppresses the transcriptional activity of hGRα by interfering with formation of active coactivator complexes. Mol Endocrinol 19,52–64.

- Chrousos G. (2005). Stress and Disorders of the stress system. Nature Reviews Endocrinology 5, 374-381.

- Connaughton S, Chowdhury F, Attia RR, Song S, Zhang Y, Elam MB, Cook GA, Park EA. (2010) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. Mol Cell Endocrinol.; 315:159-67.

- De Bosscher, K., W. Vanden Berghe & G. Haegeman. (2006). Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* 25, 6868–6886.

- De Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Kart M, Webster E, Chrousos, G.P. (1996). The non-ligand binding b-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGCRb): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. Mol. Med. 2, 597–607.

- Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling ZC, Andersson A, Östenson CG, Gustafsson, Efendic S, Okret S. (1997). Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. J. Clin. Invest. 100, 94-98.

- Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM, Detera-Wadleigh SD. (2001). A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 28, 83–88.

- Doscas ME, Williamson AJ, Usha L, Bogachkov Y, Rao GS, Xiao F, Wang Y, Ruby C, Kaufman H, Zhou J, Williams JW, Li Y, Xu X. (2014) Inhibition of p70 S6 Kinase (S6K1) Activity by A77 1726 and Its Effect on Cell Proliferation and Cell Cycle Progress. Neoplasia. (10):24-34.

- DuBois D, Sukumaran S, Jusko W, Almon R. (2013. Evidence for a Glucocorticoid Receptor Beta splice variant in the rat its physiological regulation in liver. Steroids. 78, 312–320.

- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID (1985) The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. Cell 40,47-58.

- Encio I.J, Detera-Wadleigh S.D. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 266, 82−88.

- Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C, Steers G, Turley H, Li JL, Günther UL, Buffa FM, McIntyre A, Harris AL. (2012) Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cáncer cells. Cell Metab. 5;751-64.

- Frayn K. (2010). Metabolic Regulation Brought About by the Characteristics of Tissues Wiley-Blackwell (ed). Metabolic Regulation, A human Perspective 3ra Edición. Oxford, Inglaterra, pp 33-35.

- FujiiS, Beutler E. (1985) High Glucose concentrations partially release hexokinase from inhibition by glucose 6-phosphate. Proc. Nati. Acad. Sci. 82, 1552-1554.

- Goecke A, Guerrero J. (2006). Glucocorticoid receptor b in acute and chronic inflammatory conditions: Clinical implications. Immunobiology 211, 85–96.

- Gould GW, Holman GD (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. Biochem. J. 295, 329-341.

- Gremlich S, Roduit R, Thorens B (1997) Dexamethasone Induces Posttranslational Degradation of GLUT2 and Inhibition of Insulin Secretion in Isolated Pancreatic β Cells. J Biol Chem. 272(6):216-22.

- Gu L, Xie L, Zuo C, Ma Z, Zhang Y, Zhu Y, Gao J. (2015) mTOR/p70S6K/glycolysis signaling pathway restores glucocorticoid sensitivity to 4E-BP1 null Burkitt Lymphoma. BMC Cancer. 20;15-29.

- Hajduch E., Hainault I, Meunier C., Jardel C., Hainque B., Guerre-Millo M., Lavau M. (1995) Regulation of glucose transporters in cultured rat adipocytes; Synergistic effect of insulin and dexamethasone on GLUT4 gene expression through promoter activation. Endocrinology. 136; 782-9.

- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen C, Skeen J, Sonenberg N, Hay N (2005) Akt Activates the Mammalian Target of Rapamycin by Regulating Cellular ATP Level and AMPK Activity. The Journal of Biological Chemistry 280 (37);32081–32089.

- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol.;13(4):251-62.

- He B, Cruz-Topete D, Oakley R, Xiao X, Cidlowski J (2015) Human Glucocorticoid Receptor β regulates gluconeogénesis and inflammation in mouse liver. Mol Cell Biol. 5; 14-30.

- Hérnandez-Alvarez MI, Paz J, Sebastian D, Muñoz JP, Liesa M, Sagalés J, Palacín M, Zorzano A (2012) Glucocorticoid Modulation of Mitochondrial Function in Hepatoma Cells Requires the Mitochondrial Fission Protein Drp1. Antioxid Redox Signal. 4:366-78.

- Herzig S, Shaw RJ. (2017) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. doi: 10.1038/nrm.2017.95.

- Hinds T, Ramakrishnan S, Cash H, Stechschulte L, Heinrich G, Najjar S, Sanchez E. (2010). Discovery of Glucocorticoid receptor β in mice with a role in metabolism. Mol Endocrinol 24: 1715–1727.

- Huang TJ, Verkhratsky A, Fernyhough P (2005) Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. Mol Cell Neurosci. 1:42-54.

- Ishijima N, Kanki K, Shimizu H, Shiota G. (2015) Activation of AMP-activated protein kinase by retinoic acid sensitizes hepatocellular carcinomacells to apop tosis induced by sorafenib. Cancer Sci. (5):567-75.

- Jiang B, Le L, Zhai W, Wan W, Hu K, Yong P, He C, Xu L, Xiao P (2016) Protective effects of marein on high glucose-induced glucose metabolic disorder in HepG2 cells. Phytomedicine. 3(9):891-900.

- Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, Czech MP (2003) Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated genesilencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7569-74.

- Jitrapakdee S, Wallace JC. (1999). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. Biochem J. 40,1–16.

- Kadmiel M, Cidlowski JA. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. Trends Pharmacol Sci 34, 518–530.

- Kalsbeek A, Van der Spek R, Lei J,Endert E, Buijs RM, Fliers E. (2012). Circadian rhythms of the Hypothalamo-pituitary–adrenal (HPA) axis. Mol. Cell. Endocrinol. 349, 20–29.

- Kim B y Feldman E. (2012). Insulin resistance in the nervous system. Trends Endocrinol Metab.23: 133–141.

- Kino T, De Martino M, Charmandari E, Mirani M, Chrousos G. (2003). Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity síndromes. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 85, 457–467.

- Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su Y, Chrousos G. (2009). Glucocorticoid Receptor (GR) β Has Intrinsic, GRα-independent Transcriptional Activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 381, 671–675.

- Kino T, Su Y, Chrousos G. (2009). Human Glucocorticoid Receptor (GR) Isoform β: Recent Understanding of its Potential Implications in Physiology and Pathophysiology. J Rheumatol. 28,2383-8.

- Kirkham B.W., Corkill M.M., Davison S.C. y Panayi G.S. (1991). Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: *in vitro* cell mediated immune assay predicts *in vivo* responses. J. Rheumatol. 18, 821−825.

- Kwon HS, Huang B, Unterman TG, Harris RA (2004) Protein kinase B-alpha inhibits human pyruvate dehydrogenase kinase-4 gene induction by dexamethasone through inactivation of FOXO transcription factors.. Diabetes. 53:899-910.

- Kuo T, Lewb M, Maybac O, Harris C, Speedc T, Wanga J. (2012). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. PNAS 109, 11160–11165.

- Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. (2015). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. Advances in experimental Medicine and Biology 872, 99-126.

- Langhoff, E., Ladefoged J., Jakobsen B.K. (1986). Recipient lymphocyte sensitivity to methylprednisolone affects cadaver kidney graft survival. Lancet 1, 1296−1297.

- Leni Z, Ćwiek P, Dimitrova V, Dulcey AS, Zamboni N, Simillion C, Rossi G, Leibundgut K, Arcaro A (2017) 2-Deoxy-D-glucose Restore Glucocorticoid Sensitivity in Acute Lymphoblastic Leukemia via Modification of N-Linked Glycosylation in an Oxygen Tension-Independent Manner. Oxid Med Cell Longev; 248-297.

- Li L, Donald Y, Clifton H, Goleva E. (2006). Divergent expression and function of glucocorticoid receptor β in human monocytes and T cells. J. Leukoc. Biol. 79, 18–827.

- Lizano JM, Alessi DR. (2002). The insulin signalling pathway. Curr. Bio.12, 236-238.

- Longui CA, Vottero A, Adamson PC, Cole DE, Kino T, Monte O, Chrousos GP. (2000). Low glucocorticoid receptor α/β ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. Horm Metab Res 32,401–406.

- Lu NZ, Cidlowski J. (2004). The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. Ann N Y Acad Sci. 1024, 102-123.

- Lu Y, Liu H, Bi Y, Yang H, Li Y, Wang J, Zhang Z, Wang Y, Li C, Jia A, Han L, Hu Y, Zhao Y, Wang R, Liu G. 2017. Glucocorticoid receptor promotes the function og myeloid-derived suppressor cells by suppressing HIF1α-dependent glycolysis. Cell Mol Immunol. 14, 1–12

- Ma R, Zhang W, Tang K, Zhang H, Zhang Y, Li D, Li Y, Xu P, Luo S, Cai S, Ji T, Katirai F, Ye D and Huang B. (2013). Switch of glycolysis to gluconeogenesis by dexamethasone for treatment of hepatocarcinoma. Nat Commun. 2013;4:25-38.

- Marino S, Stechschulte L, Stec D, Nestor-Kalinoski A, Coleman S (2016) Glucocorticoid Receptor β induces hepatic steatosis by augmenting inflammation and inhibition of the peroxisome peoliferator-activated receptor (PPAR)α. J Biol Chem. 09; 776-788.

- McBeth L, Nwaneri A, Grabnar M, Demeter J, Nestor-Kalinoski A, Hinds T (2016) Glucocorticoid Receptor beta increases migration of human bladder cáncer cells. Oncotarget. 19; 13-24.

- McCarthy AM, Elmendorf JS (2007) GLUT4's itinerary in health & disease. Indian J Med Res 125, 373-388.

- McGarry JD, Kuwajima M, Newgard CB, Foster DW, Katz J (1987) From Dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. Annu Rev Nutr. ;7:51-73.

- Mizuno TM, Lew PS, Luo Y, Leckstrom A. (2016) Negative regulation of hepatic fat mass and obesity associated (Fto) gene expression by insulin. Life Sci. 170:50-55.

- Moisan MP, Minni A, Dominguez G, Helbling J, Foury A, Henkous N, Dorey R, Béracochéa D. (2014). Role of corticosteroid binding globulin in the fast actions of glucocorticoids on the brain. Steroids 81, 109–115.

- Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T. (2009). Ubiquitin ligase Cbl-b is negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. Mol Cell Biol.17:4798-4811.

- Norbiato G., Bevilacqua M., Vago T. (1992). Cortisol resistance in acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 74, 608−613.

- Nwaneri A, McBeth L, Hinds T. (2016) Sweet-P inhibition of glucocorticoid receptor β as a pontential cáncer therapy. Cancer Cell Microenviron. 3.

- Oakley RH, Cidlowski JA. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. J Biol Chem 286, 3177–3184.

- Oakley R, Cidlowski JA. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. J Allergy Clin Immunol 132, 33-44.

- Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA, (1999). The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor b isoform. J. Biol. Chem. 274, 27857–27866.

- Oakley RH, Madhabananda S, Cidlowski JA. (1996). The Human Glucocorticoid Receptor b Isoform. Expression, Biochemical Properties, And Putative Function. The Journal Of Biological Chemistry 271, 9 550–9559.

- Olson AL, Pessin JE.(1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. Annu Rev Nutr.;16:235-56.

- Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G. (2004). Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin- Induced Diabetes Mellitus. Molecular Endocrinology 18(6):1346–1353

- Paredes S, Ribeiro L. (2014). Cortisol: the villain in metabolic síndrome? Rev Assoc Med Bras 60,84-92.

- Patel S, Doble BW, MacAulay K, Sinclair EM, Drucker DJ, Woodgett JR. (2008). Tissue-specific role of glycogen synthase kinase 3β in glucose homeostasis and insulin action. Mol Cell Biol. 28:6314–6328.

- Piotrowski P, Burzynski M, Lianeri M, Mostowska M, Wudarski M, Chwalinska-Sadowska H, Jagodzinski PP. (2007). Glucocorticoid receptor β splice variant expression in patients with high and low activity of systemic lupus erythematosus. Histochem Cytobiol 45,339–342.

- Pilkis SJ, Maghrabi MR, Claus TH. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu Rev Biochem. 57, 755–83.

- Psarra AM, Sekeris CE (2011). Glucocorticoids induce mitocondrial gene transcription in HepG2 cells: role on the mitocondrial glucocorticoid receptor. Biochim. Biophys 10: 14-21.

- Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski J, Picardo C. (2002). Expression of glucocorticoid receptor α- and β-isoforms in human cells and tissues. *Physiol Cell Physiol* 283, 1324–1331.

- Quintela AM, Jiménez R, Piqueras L, Gómez-Guzmán M, Haro J, Zarzuelo MJ, Cogolludo A, Sanz MJ, Toral M, Romero M, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. (2014) PPARβ activation restores the high glucose-induced impairment of insulin signalling in endothelial cells. Br J Pharmacol. 71,3089-102.

- Ragolia L, Begum N. (1998) Protein phosphatase-1 and insulin action, Mol. Cell. Biochem; 182, 49–58.

- Ratajczak T, Carrello A, Mark PJ, (1993.) The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J Biol Chem* 268,13187–13192.

- Reichard H, Tronche F, Berger S, Kellendonk C, and Schutzx G. (2000). New insights into glucocorticoid and mineralocorticoid signaling: lessons from gene targeting. Adv. Pharmacol. *47*, 1–21.

- Rhen T, Cidlowski JA. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanismsfor old drugs. N Engl J Med 353:1711-23.

- Roach P, Depaoli-Roach A, Hurley T, Tagliabracci V. (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Biochem J. 3: 763–787.

- Russell G, Kalafatakis K, Lightman S. (2014). The Importance of Biological Oscillators for Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity and Tissue Glucocorticoid Response: Coordinating Stress and Neurobehavioural Adaptation. Journal of Neuroendocrinology 27, 378-388.

- Sapolsky R, Romero L, Munck A. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. Endocrine Reviews 21, 55–89.

- Schaaf M, Champagne D, Van Laanen I, Van Wijik D, Meijer A, Meijer O, Spaink H, Richardson M. (2008) Discovery of a functional Glucocorticoid Receptor β-isoform in Zebrafish. Endocrinology 149, 1591–1599.

- Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG. (2000) Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha andthe forkheadtranscription fac tor FKHR. Evidence for insulin response unitdependent and-independent effects of insulin on promoter activity. J Biol Chem.:36324-33.

- Scott DK, Strömstedt PE, Wang JC, Granner DK. (1998). Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. Mol Endocrinol. 4, 482-491.

- Shah OJ, Iniguez-Lluhi JA, Romanelli A, Kimball SR, Jefferson LS. (2002) The Activated Glucocorticoid Receptor Modulates Presumptive Autoregulation of Ribosomal Protein S6 Protein Kinase, p70S6K. J Biol Chem. 277(4):2525-33.

- Simard M, Hill L, Lewis J, Hammond G. (2015). Naturally Occurring Mutations of Human Corticosteroid-Binding Globulin. J Clin Endocrinol Metab.100, 129–139.

- Smith DF. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol Endocrinol* 7, 418–429.

- Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE (2007). Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. J Musculoskelet Neuronal Interact. 3:240-5.

- Stechschulte LA, Wuescher L, Marino JS, Hill JW, Eng C, Hinds TD.(2014). Glucocorticoid receptor β stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN. J Biol Chem.25, 85-94.

- Sugden MC, Holness MJ. (2003) Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: 855–62.

- Valentine RJ, Coughlan KA, Ruderman NB, Saha AK. (2014) Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. Arch Biochem Biophys.;562:62-9.

- Vander Kooi BT, Onuma H, Oeser JK, Svitek CA, Allen SR, Vander Kooi CW, Chazin WJ, O'Brien RM. (2005). The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoidresponse elements. Mol Endocrinol. 12, 3001-3022.

- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 103, 931- 943.

- Wang J.C, Harris C. (2015). Glucocorticoid Signaling “From Molecules to mice to human. Advances in experimental Medicine and Biology 872, 99-133.

- Wang L, Xiong H, Wu F, Zhang Y, Wang J, Zhao L, Guo X, Chang LJ, Zhang Y, You MJ, Koochekpour S, Saleem M, Huang H, Lu J, Deng Y. (2014) Hexokinase 2-mediated Warburg Effect is requeried for PTEN-and-p53-deficiency-driven prostate cáncer growth. Cell Rep.8(5):1461-74.

- Wang Z, Frederick J, Garabedia, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. J. Biol. Chem. 277, 26573–26580.

- Weinstein SP, Wilson CM, Pritsker A, Cushman SW. (1998). Dexamethasone Inhibits Insulin-Stimulated Recruitment of GLUT4 to the Cell Surface in Rat Skeletal Muscle. Metabolism.;47(1):3-6.

- Wick KR, Werner ED, Langlais P, Ramos FJ, Dong LQ, Shoelson SE, Liu F. (2002). Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)- phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. J Biol Chem 278:8460–8467.

- Wilson JE. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. J Exp Biol. 12:2049-57.

- Wu WL, Gan WH, Tong ML, Li XL, Dai JZ, Zhang CM, Guo XR. (2010).Over-expression of NYGGF4 (PID1) inhibits glucose transport in skeletal myotubes by blocking the IRS1/PI3K/AKT insulin pathway. Mol Genet Metab 102:374–377.

- Yabaluri N, Bashyam M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J. Biosci.35,* 473–484.

- Yang S, Zhang L. (2004). Glucocorticoids and vascular reactivity. Curr Vasc Pharmacol 2, 1-12.

- Yuen KC, Chong LE, Riddle MC. (2013) Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. Diabet Med. (6):651-63.

- Zhang X, Clark A, Yorio T. (2006). Heat Shock Protein 90 Is an Essential Molecular Chaperone for Nuclear Transport of Glucocorticoid Receptor β. Invest Ophthalmol Vis *Sci.*47, 700–708.

- Zhao J, Li J, Fan T, Hou S. (2017) Glycolytic reprogramming through PCK2 regulates tumor initiation of prostate cancer cells. Oncotarget 48, 83602-83618.

- Zou C, Wang Y, Shen Z. (2005) 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. J Biochem Biophys Methods. (3):207-15.