



**Universidad Autónoma Metropolitana**  
**Unidad Xochimilco**

***Lic. en Química Farmacéutica Biológica***  
***Reporte de Proyecto de Investigación para***  
***el Servicio Social***

**Estandarización de un método para evaluar**  
**inhibidores de la PTP1B en células HepG2**  
**resistentes a la insulina**

**Asesores:**

**Dr. Juan Francisco Cortés Benítez**

**Dr. José Carlos Páez Franco**

**Alumno:**

**Jesús Rosendo Martínez Arellano**

## 1.- INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo II, una enfermedad metabólica crónica que afecta a millones de personas y se caracteriza por la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta pancreáticas, resultando en niveles elevados de glucosa en la sangre y complicaciones graves como enfermedades cardiovasculares y neuropatías.

Entre las diversas estrategias terapéuticas investigadas, la Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) ha surgido como un objetivo prometedor. Su inhibición se plantea como una vía para mejorar la sensibilidad a la insulina y normalizar los niveles de glucosa en sangre. Los derivados del ácido glicirretínico han demostrado particular potencial como inhibidores de la PTP1B, aunque antes de su aplicación clínica, es fundamental abordar desafíos como la estandarización de métodos de evaluación, especialmente en células HepG2 resistentes a la insulina (Nandi, et al., 2020).

Las células HepG2 resistentes a la insulina son relevantes para comprender la fisiopatología de la diabetes tipo II. El establecimiento de un método estandarizado para evaluar inhibidores de la PTP1B en estas células implica la optimización de condiciones experimentales, como las concentraciones de compuestos y fármacos, así como los tiempos de incubación, con el fin de asegurar resultados reproducibles.

La investigación sobre inhibidores de la PTP1B ofrece una perspectiva terapéutica prometedora, sin embargo, la estandarización del método es esencial para garantizar la fiabilidad de los resultados. La combinación de cultivos celulares de HepG2 y técnicas *in vitro* como los ensayos de Western-Blot ofrecen una vía sólida para obtener resultados confiables y reproducibles, allanando así el camino para el desarrollo de nuevas terapias para la diabetes tipo II.

## 2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La diabetes tipo 2 representa una carga significativa para la salud pública en México, siendo una de las principales causas de mortalidad en el país. Las complicaciones asociadas, como enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, ceguera y amputaciones, contribuyen de manera considerable a la carga de enfermedad y a la mortalidad prematura. Factores como la rápida urbanización, el estilo de vida sedentario, la dieta poco saludable y la alta prevalencia de obesidad han exacerbado esta situación, siendo elementos clave en el desarrollo de la enfermedad.

Datos del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estiman que alrededor del 18.3% de la población en México vive con diabetes, siendo la mayoría de los casos del tipo 2. Esta cifra sitúa a México entre los países con una de las tasas más altas de diabetes en el mundo, destacando la urgencia de implementar programas efectivos de prevención, detección temprana y tratamiento adecuado para abordar esta problemática de manera integral (INSP, 2023)

El proyecto de evaluación de los inhibidores de la PTP1B en células HepG2 resistentes a la insulina destaca la importancia del hígado en la regulación del metabolismo glucídico, utilizando las células HepG2 como modelo celular para explorar alternativas terapéuticas para la diabetes tipo 2. Si bien el proyecto no abordará la síntesis o modificación química de los inhibidores ni profundizará en ensayos en humanos, se centra en la necesidad de estandarizar un método para evaluar estos inhibidores, lo cual resulta fundamental para asegurar la fiabilidad y comparabilidad de los resultados entre distintos estudios. Este avance constituye un progreso significativo en la investigación de esta área, ofreciendo nuevas perspectivas para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

### **3.- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Establecer un método estandarizado para evaluar la eficacia de los derivados del ácido glicirretínico como inhibidores de la enzima PTP1B en células HepG2 resistentes a la insulina, como posibles agentes terapéuticos para la diabetes tipo II, mediante el uso de cultivos celulares y la realización de pruebas *in vitro*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Cultivar células HepG2 en condiciones estandarizadas que permitan reproducibilidad y confiabilidad en los resultados experimentales.
2. Optimizar el método de evaluación de la sensibilidad a la insulina en células HepG2 mediante ensayos de captación de glucosa, asegurando la reproducibilidad de los resultados.
3. Desarrollar un protocolo estandarizado para la evaluación de la expresión y actividad de proteínas clave en la vía de señalización de la insulina en células HepG2 tratadas con inhibidores de la PTP1B.

### **4.- ANTECEDENTES**

#### **4.1 Diabetes tipo II**

La diabetes tipo II, una enfermedad metabólica crónica de amplia relevancia y se caracteriza por la presencia de niveles elevados de glucosa en la sangre debido a la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta pancreáticas. Esta afección, que afecta a millones de personas en todo el mundo, se considera una patología multifactorial, donde intervienen factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. En su desarrollo, diversos factores contribuyen a la insulino-resistencia, una condición en la cual las células del cuerpo responden de manera inadecuada a la insulina, hormona clave en la regulación del metabolismo de la glucosa (Eizirik, D.L., et al., 2020).

Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, el páncreas libera insulina en el torrente sanguíneo. La insulina actúa como una "llave" que permite

que la glucosa ingrese a las células del cuerpo, donde puede ser utilizada como fuente de energía o almacenada para su uso posterior. En individuos con resistencia a la insulina, las células no responden adecuadamente a las señales de la insulina, lo que requiere que el páncreas produzca más insulina para lograr el mismo efecto. Con el tiempo, esta sobreproducción de insulina puede llevar a la disfunción de las células beta del páncreas, resultando en una disminución en la producción de insulina y un aumento en los niveles de glucosa en sangre (Galicia-García, U., et al., 2020).

De esta manera, el hígado juega un papel crucial en el metabolismo de glucosa. Como principal órgano de almacenamiento y producción de glucosa en el cuerpo, el hígado regula cuidadosamente los niveles de este carbohidrato en sangre. En individuos con resistencia a la insulina, el hígado puede producir y liberar cantidades excesivas de glucosa en el torrente sanguíneo, incluso cuando los niveles de glucosa ya son elevados. Esta sobreproducción de glucosa por parte del hígado contribuye al desarrollo de la hiperglucemia y la posterior progresión de la diabetes tipo II (Eizirik, D.L., et al., 2020).

## 4.2 Células HepG2

Las células HepG2 son una línea celular derivada de un carcinoma hepatocelular humano, esto significa que se originan a partir de células cancerosas del hígado humano. A pesar de su origen patológico, las células HepG2 se han convertido en una herramienta invaluable en la investigación biomédica, particularmente en el estudio de la diabetes tipo II y otras enfermedades metabólicas (Arzumanian, V. A., et al., 2021).

Una de las razones por las que las células HepG2 son tan importantes en los estudios metabólicos es su capacidad para replicar fenotipos observados en hepatocitos humanos *in vivo*. Esto significa que las células HepG2 pueden simular muchas de las funciones y respuestas metabólicas que se encuentran en el hígado humano, lo que las convierte en un modelo celular relevante para la investigación en este campo. Así también, las células HepG2 son relativamente fáciles de cultivar en el laboratorio y pueden crecer en una amplia variedad de condiciones de cultivo, lo que las hace accesibles y versátiles para investigación. Su capacidad para proliferar en placas de cultivo celular y mantener su fenotipo hepático durante varias generaciones celulares los convierte en una herramienta valiosa para una amplia gama de experimentos *in vitro* (Odeyemi, S., & Dewar, J., 2020).

Otra característica importante de las células HepG2 es su resistencia a la insulina, que puede ser inducida mediante tratamientos crónicos con ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico, mediante alteraciones genéticas específicas o incluso llevarse a cabo con la exposición prolongada a niveles altos de glucosa (Zhang, Q., et al., 2023). Esta resistencia a la insulina hace que las células HepG2 sean un modelo útil para

estudiar los mecanismos subyacentes a la insulinoresistencia, una característica central en la patogénesis de la diabetes tipo II (Arzumanian, V. A., et al., 2021).

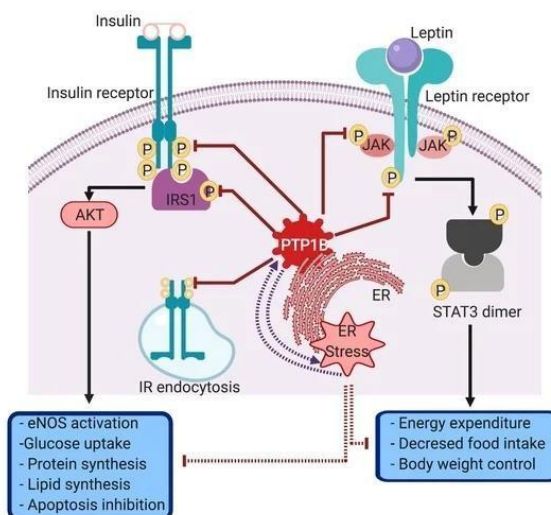
### **4.3 Enzima PTP1B y la vía de señalización de la insulina**

La Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) es una enzima que desempeña un papel fundamental en la regulación de la señalización de la insulina y, por lo tanto, en la homeostasis glucémica. Se encuentra ampliamente distribuida en tejidos metabólicamente activos, como el hígado, los músculos esqueléticos y el tejido adiposo (Nandi, et al., 2020).

La importancia de la enzima PTP1B en los estudios metabólicos radica en su capacidad para regular negativamente la señalización de la insulina. La insulina, una hormona producida por el páncreas en respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre, desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo de la glucosa al regular vías de señalización que promueven la captación de glucosa por parte de las células y su almacenamiento como glucógeno (Eizirik, D.L., et al., 2020). En condiciones normales, la actividad de la PTP1B sigue un mecanismo de retroalimentación negativa que regula finamente la señalización de la insulina, evitando una sobreestimulación de la vía de señalización.

Sin embargo, la acción de la insulina puede ser inhibida por la PTP1B, que se encarga de defosforilar residuos de tirosina en proteínas clave durante el proceso de señalización mediada por esta hormona. En individuos con resistencia a la insulina, la actividad de la PTP1B puede estar aumentada, resultando en una inhibición excesiva de la señalización de la insulina y una disminución en la sensibilidad a esta hormona. Esta disfunción contribuye a la progresión de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo II (Eleftheriou, P., et al., 2019).

En términos de su función molecular, la PTP1B actúa defosforilando residuos de tirosina en sustratos específicos, como el receptor de insulina y los sustratos de su receptor (IRS), que son componentes clave de la vía de señalización de la insulina. Esto implica que una sobreexpresión de PTP1B puede provocar una disminución en la fosforilación de AKT, una quinasa esencial para la regulación del metabolismo celular y la captación de glucosa, reduciendo así la respuesta celular a la insulina. Así también se ha reportado que PTP1B puede influir en la activación de STAT3, una proteína involucrada en la regulación de la transcripción génica (Teimouri, M., et al., 2022). En un contexto de resistencia a la insulina, las alteraciones en la activación de AKT y STAT3 pueden contribuir a desequilibrios en la señalización celular, afectando tanto la homeostasis metabólica como la respuesta a estímulos hormonales. La defosforilación de estos sustratos por la PTP1B interrumpe la transmisión de la señal de la insulina y reduce la captación de glucosa por parte de las células a través de los transportadores GLUT4, lo que resulta en niveles elevados de glucosa en sangre y, eventualmente, en el desarrollo de la diabetes tipo II (Figura 1, tomado de Nandi, et al., 2020).

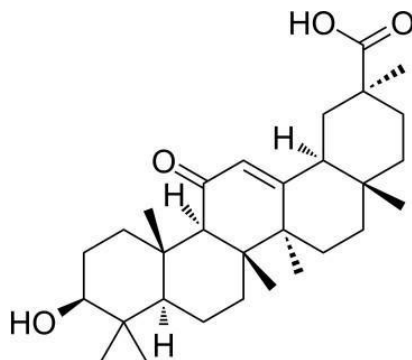


**Figura 1.** Participación de la enzima PTP1B en la señalización de insulina. Esta enzima desfosforila a los receptores de insulina evitando la translocación de los transportadores GLUT-4.

#### 4.4 Ácido glicirretínico

El ácido glicirretínico es un compuesto bioactivo que se encuentra en la raíz de la planta *Glycyrrhiza glabra*, comúnmente conocida como regaliz. Esta planta ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional debido a sus diversas propiedades terapéuticas, y el ácido glicirretínico es uno de sus componentes más estudiados y valorados por sus efectos farmacológicos (Richard, S. A., 2021).

Una de las áreas de interés más destacadas del ácido glicirretínico es su potencial como inhibidor de la enzima PTP1B. El mecanismo de inhibición implica la unión del ácido glicirretínico al sitio activo de la enzima, interfiriendo con su capacidad para desfosforilar los sustratos de tirosina y, por lo tanto, inhibiendo su actividad. Esta inhibición de la PTP1B puede aumentar la sensibilidad a la insulina al promover una señalización más efectiva de la insulina y mejorar la captación de glucosa por parte de las células (Richard, S. A., 2021).



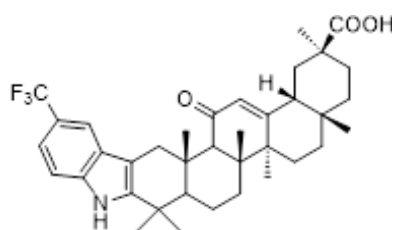
**Figura 2.** Estructura del ácido glicirretínico.

##### 4.4.1 Compuestos derivados del ácido glicirretínico

###### 4.4.1.1 FC-114

La molécula FC-114 es un derivado de ácido glicirretínico (AG) preparado a partir de glicirricina (Figura 3).

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que FC-114 tiene propiedades farmacológicas relacionadas con la diabetes tipo II. En investigaciones *in vivo*, se ha verificado que FC-114 ejerce un marcado aumento en los niveles de insulina y una disminución en los niveles de colesterol total en comparación con animales con diabetes tipo II no tratados. Además, las investigaciones afirman que FC-114 es un inhibidor no competitivo de la enzima PTP1B, lo que puede contribuir a su efecto antidiabético al mejorar la resistencia a la insulina y regular los niveles de glucosa en sangre (Álvarez-Almazán, S., et al., 2023).

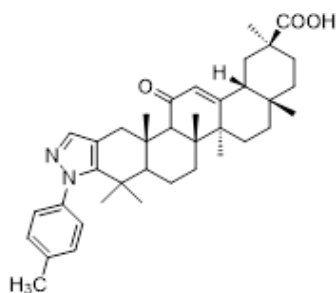


**Figura 3.** Estructura de la FC-114.

#### 4.4.1.2 FC-122

Al igual que la molécula FC-114, la FC-122 es un derivado del ácido glicirretínico (AG) (Fig. 4). Este compuesto actúa como un inhibidor dual de tipo mixto/no competitivo de las enzimas PTP1B y  $\alpha$ -glucosidasa, respectivamente.

Adicional a ello, investigaciones *in vivo* en ratas diabéticas, han revelado que FC-122 reduce la ingesta de alimentos y los niveles de glucosa durante pruebas de tolerancia oral a la glucosa. Asimismo, FC-122 mejora los niveles de insulina y disminuye el colesterol total sin afectar el colesterol HDL en estos animales. Estos efectos son significativos debido al potencial de estas enzimas como objetivos terapéuticos para la diabetes tipo II (Álvarez-Almazán, S., et al., 2023).



**Figura 4.** Estructura de la FC-122.

## 5.- METODOLOGÍA

### Estandarización del Protocolo Experimental

Debido a que el trabajo realizado consistió en la estandarización de un método para evaluar la actividad de derivados del ácido glicirretínico como inhibidores de la enzima PTP1B utilizando un modelo de células HepG2 resistentes a la insulina, durante este proceso, se realizaron ajustes significativos en las condiciones experimentales para optimizar los resultados.

#### 5.1 Cultivo de células HepG2

El cultivo celular se llevó a cabo en el cuarto de cultivo, asegurando la limpieza del material con etanol al 70% antes de su uso. Para la preparación del medio de cultivo, se utilizó DMEM bajo en glucosa, que se mantenía a 4°C hasta su uso. Antes de agregarlo a las células, se calentaban 3 mL en un baño maría a 37°C durante 15 minutos. Al inicio del trabajo, las células se sembraban en placas de mantenimiento con una densidad de 200,000 células por placa, pero con el tiempo se observó que una mayor cantidad mejoraba la viabilidad y crecimiento. Por ello, al final del proceso de estandarización, se ajustó la densidad a 500,000 células por placa de mantenimiento, lo que permitió obtener cultivos más consistentes.

Para el pase celular, primero se retiraba el medio de cultivo y se lavaban las placas con PBS estéril. En un principio, las células se despegaban con 750 µL de tripsina 1X durante 4 minutos, pero se encontró que este tiempo y volumen no eran suficientes para una disociación uniforme. Finalmente, se optimizó el procedimiento a 950 µL de tripsina 1X durante 5 minutos y medio a 37°C, lo que mejoró la recuperación celular. Posteriormente, las células se disgregaban con jeringas estériles y se contaban con una cámara de Neubauer usando azul de tripano. Luego, se ajustaba la concentración a 500,000 células por placa de mantenimiento o 150,000 células por pozo en las placas de cultivo, manteniéndolas en incubación a 37°C hasta su uso (Tabla 1). Los tratamientos se añadían 72 h después de sembrar las células.

**Tabla 1.** Número de células y volumen de medio DMEM necesario para llenar cada caja.

Método	Tipo Placa	Número de células	Volumen Total
Placas mantenimiento	Placas 100 mm / NEST 704001	500000 células por caja	Ajustar volumen a 10 mL.
Western blot/Metabólica	Placas 6 pozos/ NEST	150000 células por pozo	Ajustar volumen a 3 mL (por pozo).

#### 5.2 Tratamientos a las células HepG2

Para evaluar la capacidad de los derivados del ácido glicirretínico como inhibidores de PTP1B en células HepG2 resistentes a la insulina, se probaron diferentes condiciones de tratamiento, ajustando tanto la concentración de insulina como el tiempo de exposición a los compuestos. A lo largo del proceso de estandarización, se realizaron tres modificaciones principales en la metodología, cada una con ajustes específicos que permitieron mejorar los resultados obtenidos (Tabla 2).

En la primera etapa, la resistencia a la insulina se inducía con 1  $\mu\text{M}$  de insulina durante 24 horas, y las células se trataban con los compuestos durante 24 horas, utilizando concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ . En la etapa 2, se incorporó el paso de añadir 0,1  $\mu\text{M}$  de insulina media hora antes de la extracción celular, con lo que se buscó mejorar la activación de las vías de señalización insulínica. Además, las concentraciones de los compuestos se ajustaron a 10 y 25  $\mu\text{M}$ . En la tercera etapa, que resultó ser la más efectiva, se redujo la concentración de insulina utilizada para inducir resistencia a 0.1  $\mu\text{M}$  durante 24 horas, y el tratamiento con los compuestos se acortó a 1 hora y 30 minutos, manteniendo las concentraciones de 1 y 25  $\mu\text{M}$ . Se mantuvo el paso de agregar 0.1  $\mu\text{M}$  de insulina media hora antes de la extracción, lo que permitió obtener resultados más consistentes.

**Tabla 2.** Resumen de las modificaciones realizadas en la metodología de tratamientos. La tercera etapa fue la condición optimizada que proporcionó los mejores resultados.

Fase	Inducción de resistencia	Tratamiento con compuestos	Insulina antes de la extracción
1° etapa	1 $\mu\text{M}$ de insulina por 24 h	24 horas a 1 y 10 $\mu\text{M}$	No
2° etapa	1 $\mu\text{M}$ de insulina por 24 h	24 horas a 10 y 25 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$ de insulina media hora antes
3° etapa	0.1 $\mu\text{M}$ de insulina por 24 h	1 h 30 min a 1 y 25 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$ de insulina media hora antes

### 5.3 Extracción de proteínas

Se partía de una caja de 6 pozos con células tratadas, se removía el medio y se lavaban los pozos con PBS a 4°C. Al principio, el buffer de extracción no contenía inhibidores de fosfatasa, pero se revisó que esto podría afectar la estabilidad de las proteínas fosforiladas. Por ello, en la etapa final de optimización, se agregó un inhibidor de fosfatasa al buffer de extracción, mejorando la preservación de las muestras.

A cada pozo se le agregaban 700  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción y, tras homogeneizar, el contenido se transfería a tubos de microcentrífuga y se calentaba a 80°C por 5 minutos. Luego, las células se rompían utilizando jeringas estériles, las muestras se centrifugaban a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos, y el sobrenadante se almacenaba a -30°C hasta su cuantificación.

### 5.4 Cuantificación de proteínas (método del ácido bicinonínico)

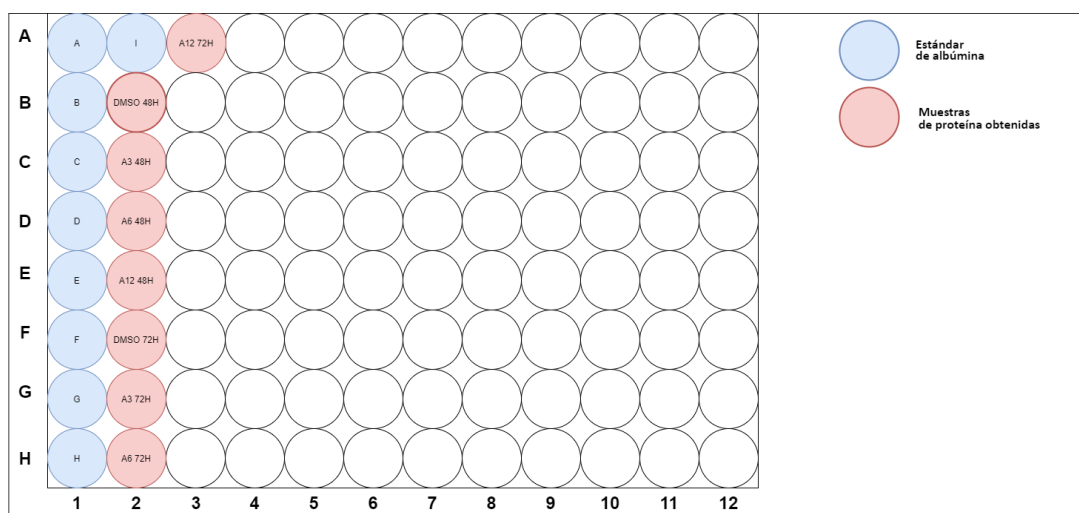
El método del ácido bicinonínico (BCA) se fundamenta en la capacidad de las proteínas para reducir los iones cúpricos presentes en el reactivo de trabajo a iones cuprosos en un entorno alcalino. Este proceso genera un cambio de color característico, pasando de verde a morado, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. Para la cuantificación, se empleó el kit BCA de Thermo (23225).

Las muestras anteriormente extraídas se descongelaron en hielo y se preparó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones según la tabla de

referencia (Tabla 3). En una placa de 96 pozos, se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de las muestras y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de trabajo (mezcla de reactivo A y B) como se muestra en la figura (Figura 5). La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 578 nm. Los datos se analizaron en Excel.

**Tabla 3.** Generación de la curva. Esto se lleva a cabo en forma de “escalera”.

Curva calibración de albumina			
Tubo	Buffer de extracción $\mu\text{L}$	Albumina sérica bovina $\mu\text{L}$	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
A	0	300 (A)	2
B	125	375 (A)	1.5
C	325	325 (A)	1
D	175	175 (B)	0.75
E	325	325 (C)	0.5
F	325	325 (E)	0.25
G	325	325 (F)	0.125
H	400	100 (G)	0.025
I	400	0	0



**Figura 5.** Ejemplo de llenado de la placa de 96 pozos.

## 5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico - SDS/PAGE

El Western Blot es una técnica fundamental en biología molecular para identificar y estudiar proteínas específicas en una muestra. Su principio consiste en separar las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) para luego transferirlas a una membrana de nitrocelulosa. Se incuba con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína de interés y, tras un lavado para eliminar los anticuerpos no adheridos, se aplica un anticuerpo secundario marcado con una enzima o una etiqueta fluorescente, que se une al anticuerpo primario para aumentar la señal. Finalmente, se detecta la proteína utilizando un sistema de fluorescencia o quimioluminiscencia. Esto produce una banda visible en la membrana, cuya intensidad puede ser analizada y cuantificada con software especializado.

Para este método, se partió de alícuotas de proteínas previamente extraídas y cuantificadas, las cuales se descongelaron en baño de hielo. Los geles separador y concentrador se prepararon siguiendo las proporciones de la Tabla 4. El persulfato de amonio al 10% se preparó al momento y se añadió al gel separador justo antes de cargarlo en el dispositivo de polimerización, donde se dejó polimerizar bajo una capa de isopropanol. Posteriormente, se retiró el isopropanol y se agregó el gel concentrador, colocando el peine de 15 pozos para permitir su polimerización.

El gel polimerizado se ensambló en la cámara de electroforesis y se llenó con buffer de corrida 1X. Las alícuotas de proteína se mezclaron con buffer de carga, se calentaron a 80 °C por 5 minutos y se centrifugaron brevemente antes de cargar 24 µL en cada pozo junto con el marcador de peso molecular (Figura 6). La electroforesis se realizó a 100 V durante 2 horas con 45 minutos.

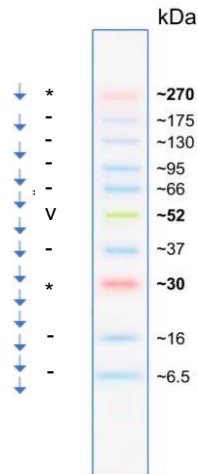
**Tabla 4.** Reactivos y volumen necesario para preparar los geles.

<b>Tabla 4 (para dos geles)</b>			
#	Reactivo	Gel Separador	Gel Concentrador
1	H <sub>2</sub> O desionizada (Millipore-MiliQ)	7.2 mL	3.84 mL
2	Buffer Separador pH8.8	4 mL	-
3	Buffer Concentrador pH = 6.8	-	1.5 mL
4	Acrilamida/bis-acrilamida (Invitrogen HC2040)	4.6 mL	0.6 mL
6	Dodecil sulfato de sodio 10%	100 µL	60 µL
6	TEMED (Sigma-T3281)	16 µL	8 µL
7	Persulfato de amonio 10%	160 µL	60 µL

Pozo 1	Pozo 2	Pozo 3	Pozo 4	Pozo 5	Pozo 6	Pozo 7	Pozo 8	Pozo 9	Pozo 10	Pozo 11	Pozo 12	Pozo 13	Pozo 14	Pozo 15
Marcador de peso molecular 4 µL	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	Marcador de peso molecular 2 µL

**Figura 6.** Ejemplificación para el llenado de los pozos.

Treinta minutos antes de finalizar la electroforesis, se preparó la membrana de nitrocelulosa, dejándola en agitación con buffer de transferencia. Una vez concluida la electroforesis, se separaron los vidrios del gel y se marcó una esquina de éste para orientación. El dispositivo de transferencia se ensambló y se ejecutó a 10 V durante 1 hora con 15 minutos. Una vez completado el proceso de transferencia, se retiraron los casetes de la unidad de transferencia y se marcó la membrana empleando un lápiz en cada uno de los marcadores de peso molecular, siguiendo las indicaciones de la siguiente ilustración (Figura 7). Solo el pozo número 1 tenía las flechas en dirección descendente.



**Figura 7.** Marcado de la membrana.

La membrana transferida se incubó durante 1 hora con solución de bloqueo. Una vez terminado el bloqueo y de acuerdo con los anticuerpos a utilizar, se recortó la membrana en los pesos moleculares correspondientes (se usaron tijeras de metal previamente limpiadas con etanol). Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBST según la Tabla 5 y se incubaron durante una noche a 4 °C. Tras esto, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBST y se aplicaron los anticuerpos secundarios diluidos, incubándolos a temperatura ambiente por 1 hora (30 minutos para GAPDH y  $\beta$ -Actina). Después, se realizaron otros tres lavados de 10 minutos. Finalmente, se preparó y aplicó la solución de revelado durante 2 minutos, y la membrana fue analizada utilizando un sistema de fotodocumentación.

**Tabla 5.** Dilución correspondiente para cada anticuerpo primario.

#	Anticuerpo	MW (KDa)	Origen	$\mu$ L anticuerpo	$\mu$ L TBST
1	$\beta$ -Actina	43	Mouse	0.2	1500
2	GAPDH	38	Rabbit	0.2	1500
3	STAT3	79-86	Rabbit	0.5	360
4	p-STAT3 (Tyr705)	79-86	Rabbit	0.5	360
5	IRS-I	180	Rabbit	0.5	360
6	p-IRS-1 (Ser307)	180	Rabbit	0.5	360
7	AKT	60	Rabbit	0.5	360
8	p-AKT (Ser473)	60	Rabbit	0.5	360
9	PTP1B	52	Rabbit	0.5	360

## 6.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El objetivo de este estudio fue estandarizar un modelo de resistencia a la insulina en células HepG2 y evaluar la capacidad de los derivados del ácido glicirretínico para revertir dicha resistencia a través de la inhibición de la enzima PTP1B. Para ello, en la primera etapa se utilizó 1  $\mu\text{M}$  de insulina durante 24 horas para inducir resistencia, ya que, a concentraciones elevadas y tiempos prolongados de exposición, la insulina puede generar una disminución en la señalización de la vía insulínica. Esto ocurre porque una exposición sostenida a la hormona puede activar mecanismos de regulación negativa, como la fosforilación en residuos de serina en el receptor de insulina, lo que reduce la capacidad de respuesta celular a la insulina (Mohammed Sayed Esawie, et al., 2023).

Para evaluar la resistencia inducida y los efectos de los compuestos en su reversión, se realizaron análisis mediante western blot, empleando controles positivos y negativos. Los controles negativos corresponden a células sin tratar ni con insulina ni con compuestos, representando el estado basal de la señalización insulínica. Los controles positivos son aquellas células tratadas únicamente con insulina para inducir resistencia, permitiendo confirmar que el modelo responde adecuadamente. Seguido de los controles, las demás células con resistencia se trataron con los compuestos en evaluación, con el objetivo de observar si se restauraba la señalización insulínica.

A lo largo del estudio, se realizaron ajustes metodológicos para optimizar la reproducibilidad y precisión de los ensayos. Se redujo la concentración de insulina para inducir resistencia a 0.1  $\mu\text{M}$ , y el tiempo de tratamiento con los compuestos se acortó a 1 hora y 30 minutos, incluyendo la adición de 0.1  $\mu\text{M}$  de insulina media hora antes de la extracción celular. Estos cambios permitieron obtener resultados más claros y reproducibles, facilitando la interpretación del efecto de los compuestos en la señalización de la insulina.

- **Primera etapa: Inducción de resistencia a la insulina con 1  $\mu\text{M}$  de insulina y tratamiento por 24 Horas**

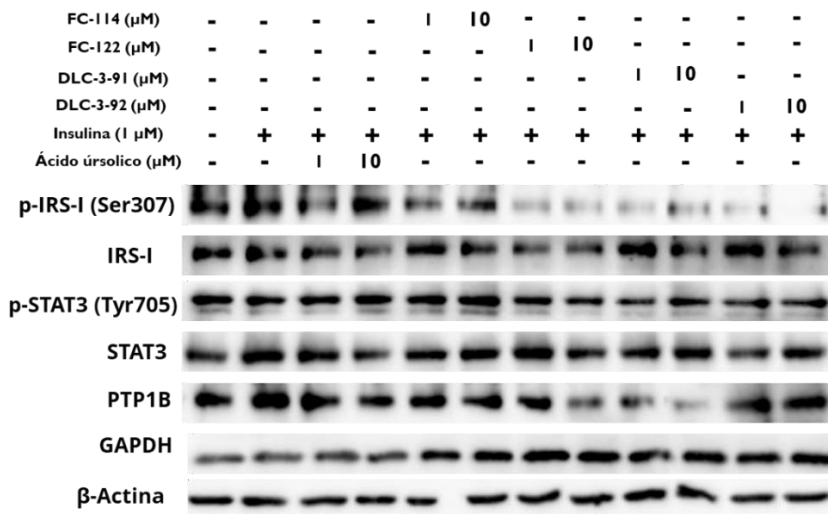
En esta primera fase del estudio, las células HepG2 fueron expuestas a 1  $\mu\text{M}$  de insulina durante 24 horas para inducir resistencia a la insulina. Posteriormente, se trataron con los compuestos en evaluación a dos concentraciones (1 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas para analizar su capacidad de restaurar la señalización insulínica. Como tratamiento control, también se incluyó ácido ursólico, un compuesto previamente estudiado por su potencial efecto en la regulación de la señalización de la insulina.

Para evaluar los efectos de la insulina y los tratamientos, se realizaron western blots en los que se analizaron proteínas clave de la vía de señalización insulínica. Se incluyeron proteínas totales y sus formas fosforiladas, como AKT y p-AKT, STAT3 y p-STAT3, así como IRS y p-IRS, con el fin de determinar si la resistencia a la insulina afectaba su activación y si los compuestos podían revertir estos cambios. Además, también se analizó la expresión de PTP1B, enzima clave en la regulación de la señalización insulínica, cuya sobreexpresión puede estar relacionada con el desarrollo de resistencia. Como controles de carga, se utilizó  $\beta$ -actina y GAPDH para

normalizar la expresión de las proteínas analizadas y garantizar la correcta comparación entre condiciones experimentales.

En los siguientes westerns blot, se comparan tres condiciones principales:

1. **Células control (sin insulina ni tratamiento)**, representando el estado basal de la señalización insulínica.
2. **Células con resistencia a la insulina (tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de insulina)**, donde se espera observar una reducción en la activación de proteínas clave debido a la resistencia inducida.
3. **Células resistentes tratadas con los compuestos**, para evaluar si se logra restaurar la señalización insulínica.



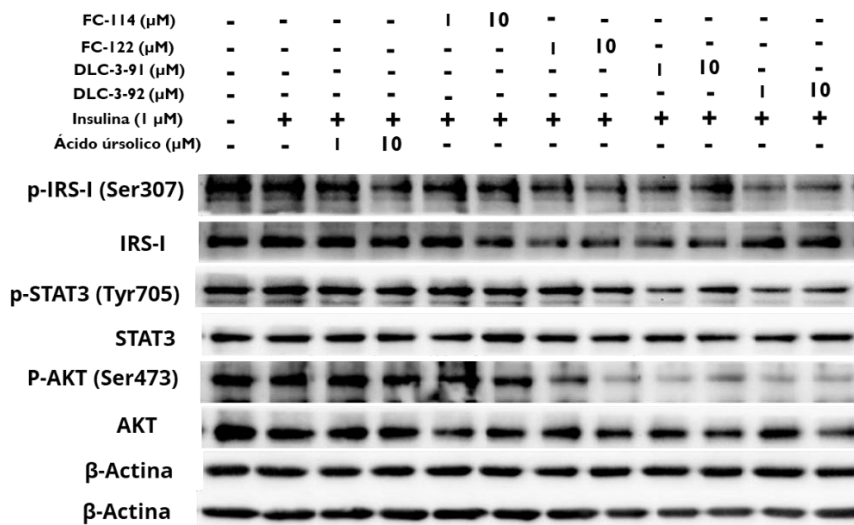
**Figura 8.** Primer western blot realizado para comenzar con la estandarización del método.

En este primer western blot (Figura 8), lo primero que resalta es la diferencia en la expresión de PTP1B entre las células sin resistencia y aquellas con resistencia a la insulina (sin tratamiento). Se observa que las células con resistencia presentan una mayor expresión de PTP1B en comparación con su estado basal, lo que sugiere que la inducción con 1  $\mu\text{M}$  de insulina durante 24 horas favorece su sobreexpresión. Por otro lado, en los tratamientos con ácido úrsólico y los compuestos en evaluación, se observa una disminución en la expresión de PTP1B, especialmente en las células tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de los compuestos. La concentración de 1  $\mu\text{M}$  también muestra una reducción en la expresión de PTP1B, aunque el efecto no es tan marcado como con la concentración más alta.

En cuanto a la fosforilación de IRS-1 en la serina 307, se observa una disminución en su fosforilación tras el tratamiento con los compuestos, lo cual es un resultado favorable, ya que la fosforilación en este residuo está vinculada con la resistencia a la insulina. Sin embargo, con 10  $\mu\text{M}$  de ácido úrsólico, la fosforilación de IRS-1 no muestra una reducción significativa, mientras que con los demás compuestos evaluados sí se observa una disminución en ambas concentraciones.

Un hallazgo interesante es el comportamiento de STAT3 fosforilado, ya que su fosforilación parece estar aumentada en las células con resistencia a la insulina. En los tratamientos con los compuestos, la fosforilación de STAT3 sigue presente, aunque en algunos pozos con menor intensidad que en las células con resistencia. Esto resulta inesperado, ya que STAT3 se fosforila en tirosina 705, y en un modelo de resistencia a la insulina no debería estar fosforilado.

Por último, un aspecto a considerar en este western blot es la variabilidad en las proteínas de carga ( $\beta$ -actina y GAPDH). Lo ideal es que su expresión sea homogénea entre las muestras para garantizar una comparación adecuada, sin embargo, en este caso se observan diferencias marcadas en la intensidad de las bandas en varios pozos. Esta variabilidad puede introducir sesgos en la interpretación de los resultados, por lo que el siguiente paso fue realizar una réplica de este experimento para confirmar si la tendencia observada se mantiene.



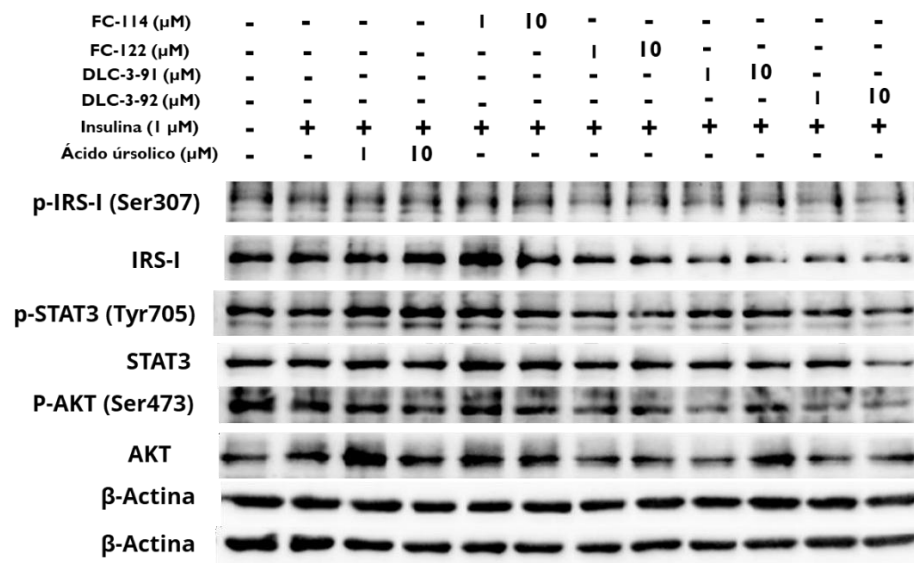
**Figura 9.** Réplica realizada del primer western blot.

En esta réplica del primer western blot (Figura 9), se realizó un ajuste en la selección de proteínas analizadas. En lugar de evaluar nuevamente PTP1B, en esta ocasión se incluyeron AKT total y AKT fosforilado, con el objetivo de analizar el estado de activación de esta vía en las diferentes condiciones experimentales. Un aspecto positivo en este western es que las proteínas de carga (en este caso,  $\beta$ -actina) se observaron con mayor claridad y homogeneidad, mostrando una expresión más uniforme entre los pozos. Esto permitió una mejor comparación entre las muestras y redujo la posibilidad de sesgos en la interpretación de los resultados.

El primer punto relevante a destacar es que el comportamiento de STAT3 fosforilado se mantuvo similar al observado en el primer western. A pesar de que en las células tratadas su fosforilación está presente, lo cual es lo esperado, en las células con resistencia a la insulina también sigue presente cuando lo ideal es que deba estar disminuida. Además, en algunos pozos con células tratadas, la fosforilación sigue siendo más baja en comparación con las células con resistencia, lo que refuerza la inconsistencia observada previamente.

En el caso de IRS-1, se observa que su fosforilación sigue disminuyendo en las células tratadas en comparación con las células con resistencia, donde la fosforilación es más evidente. Sin embargo, al analizar AKT fosforilado, se observa un comportamiento inesperado. En lugar de mostrar una reducción en la fosforilación en las células con resistencia y un aumento en las células tratadas, los resultados indican lo contrario. La fosforilación en Serina 473 de AKT es más alta en las células con resistencia y, en algunos pozos con células tratadas, la fosforilación es casi inexistente. Este resultado es contrario a lo esperado, ya que, en un modelo de resistencia a la insulina, AKT no debería estar activado, mientras que en las células tratadas con fármacos que aumentan la señalización de insulina la fosforilación debería aumentar.

Dado que este hallazgo no concuerda con la respuesta esperada, se realizó un tercer western blot con las mismas condiciones antes de proceder con modificaciones en la metodología, con el objetivo de confirmar si esta tendencia se mantenía.



**Figura 10.** Último western blot antes de hacer las primeras modificaciones a la metodología.

En este último western blot (Figura 10), se observaron cambios importantes en comparación con los dos análisis previos. A diferencia de los resultados anteriores, en esta ocasión la fosforilación de STAT3 mostró una tendencia más acorde con lo esperado. En las células con resistencia, la fosforilación de STAT3 fue menor en comparación con su estado basal, lo cual contrasta con lo observado en los westerns anteriores. Por otro lado, en las células tratadas, la fosforilación tendió a aumentar, aunque en algunos pozos seguía habiendo muestras donde la fosforilación era más baja incluso en comparación con las células con resistencia, lo que indica que la tendencia aún no era completamente consistente.

Al continuar con el análisis de IRS-1 fosforilado, se detectó un cambio importante en la tendencia observada. En este caso, la fosforilación de IRS-1 dejó de ser marcada en todos los pozos, incluyendo las células con resistencia, las células en estado basal y aquellas tratadas con los compuestos. Esto representó una diferencia notable con respecto a los análisis anteriores, donde STAT3 era la proteína con mayor variabilidad, pero ahora la inconsistencia se presentó en IRS-1.

En cuanto a AKT fosforilado, los resultados siguieron mostrando la misma tendencia observada en los westerns previos. Las células con resistencia mostraban una fosforilación similar a su estado basal, mientras que las células tratadas no lograban recuperar una fosforilación marcada, e incluso en algunos pozos la señal era prácticamente inexistente. Además, las células tratadas con ácido ursólico como control tampoco mostraron un aumento en la fosforilación de AKT, lo que indicaba que la activación de esta proteína seguía sin responder de manera clara en el modelo utilizado.

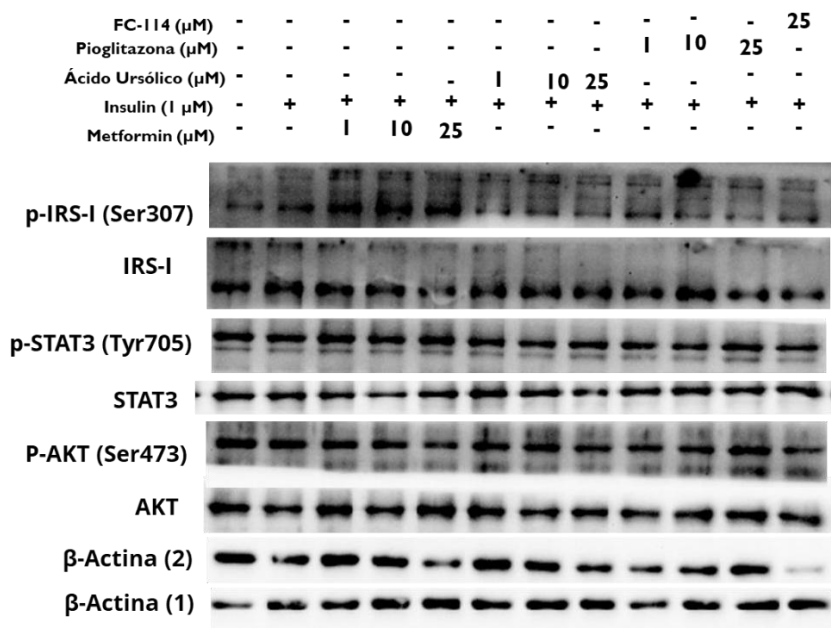
Debido a la cantidad de inconsistencias observadas entre los experimentos, se consideró necesario realizar modificaciones en la metodología con el fin de mejorar la reproducibilidad y obtener resultados más confiables.

- **Segunda etapa: Ajuste de concentraciones y adición de insulina antes de la extracción**

Tras las inconsistencias observadas en la primera etapa, se realizaron modificaciones en la metodología. En esta segunda fase, se mantuvo el protocolo de inducción de resistencia a la insulina con 1  $\mu\text{M}$  de insulina durante 24 horas, así como el tiempo de tratamiento con los compuestos, que siguió siendo de 24 horas. Sin embargo, se incrementaron las concentraciones de los compuestos evaluados, pasando de 1 y 10  $\mu\text{M}$  a 10 y 25  $\mu\text{M}$ , con la intención de observar si una mayor concentración lograba un efecto más claro en la reversión de la resistencia a la insulina.

Además, se incorporó un nuevo paso en el protocolo experimental: 30 minutos antes de la extracción celular, se añadía insulina a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$ . El paso de añadir insulina (0.1  $\mu\text{M}$ ) media hora antes de la extracción tiene como objetivo activar las vías de señalización celular asociadas a la insulina. Esto permite evaluar si los compuestos de interés son capaces de modular los efectos de la resistencia a la insulina al inhibir la enzima PTP1B. Con esto se simula un estímulo fisiológico que activa la vía de señalización de la insulina, permitiendo observar cómo las células responden bajo la influencia de los compuestos de interés y ayuda a evaluar la capacidad de los compuestos de revertir o mitigar la resistencia a la insulina, restaurando la señalización normal de la vía. Si el compuesto inhibe PTP1B de forma efectiva, se debe observar una mejor fosforilación de las proteínas clave (como STAT-3 o AKT), lo que indica una recuperación de la función de la vía.

Haciendo estos cambios, la intención era determinar si la variabilidad observada en los experimentos anteriores podía reducirse y si los compuestos evaluados mostraban un efecto más consistente en la activación de las proteínas clave de la señalización insulínica.



**Figura 11.** Primer western blot usando la segunda metodología.

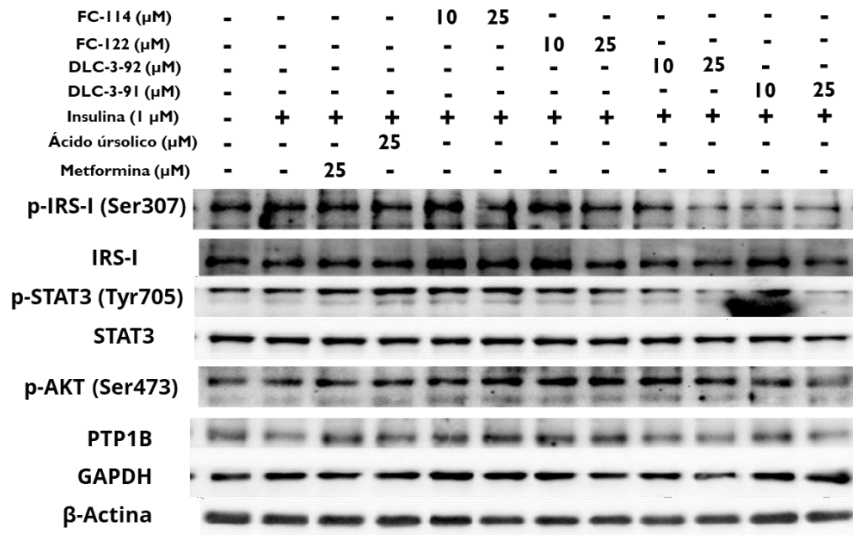
En este western blot (Figura 11), antes de evaluar los compuestos en estudio, se decidió utilizar únicamente tratamientos de control, incluyendo ácido ursólico, metformina y pioglitazona. Esto permitió no solo establecer referencias de comparación, sino también descartar posibles fallos en los controles antes de continuar con la siguiente fase del experimento.

Los resultados mostraron que la fosforilación de STAT3 pareció disminuir en las células con resistencia a la insulina en comparación a las que no fueron expuestas con insulina por 24 horas, lo cual sigue concordando con lo esperado. Sin embargo, al igual que en la fase anterior, en algunos pozos con tratamiento la fosforilación de STAT3 se observó en niveles incluso más bajos que en las células con resistencia, lo que sugiere que esta proteína aún presentaba variabilidad en su comportamiento.

En cuanto a IRS-1 fosforilado, la diferencia entre las células sin resistencia y aquellas con resistencia fue poco marcada. Aunque de manera tenue, se observó un ligero aumento en la fosforilación en las células con resistencia en comparación con su estado basal. Con los tratamientos, la fosforilación de IRS-1 se mantuvo baja, con la excepción de metformina, donde se observó un aumento inusualmente alto en la fosforilación de esta proteína, incluso superando los niveles de las células con resistencia. Este resultado representó una inconsistencia importante, ya que, en lugar de revertir la resistencia, parecía intensificarla.

Respecto a AKT fosforilado, en este western se logró observar que las células con resistencia mostraban una menor fosforilación en comparación con su estado basal, lo cual sí es un resultado esperado. Sin embargo, los tratamientos no lograron aumentar significativamente esta fosforilación, e incluso en algunas muestras tratadas la señal era más débil que en las células con resistencia, lo que nuevamente indicaba variabilidad en la respuesta. Además, se identificó que la proteína de carga ( $\beta$ -actina) presentó cierta variabilidad entre los pozos, lo que podía contribuir a algunas de las inconsistencias observadas en la cuantificación de las proteínas analizadas.

A pesar de estas inconsistencias, se decidió continuar con esta metodología para evaluar el comportamiento de los compuestos en estudio bajo estas nuevas condiciones experimentales. La razón principal para seguir con este protocolo fue que, si bien aún existía variabilidad en algunas proteínas, se logró observar una mejor diferenciación en la fosforilación de AKT entre las células en estado basal y las células con resistencia, lo que indicaba que el modelo podía ser funcional. Además, evaluar los compuestos bajo estas condiciones permitiría determinar si estos tenían un efecto más claro en la restauración de la señalización insulínica o si era necesario realizar nuevos ajustes metodológicos.



**Figura 12.** Repetición del western blot usando la segunda metodología.

En este segundo western blot (Figura 12) utilizando la nueva metodología, se utilizaron nuevamente metformina y ácido úrsólico como tratamientos de control para las células con resistencia, ambos a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos mostraron que la fosforilación de STAT3 mantuvo la misma tendencia observada previamente: su fosforilación disminuyó en las células con resistencia, pero también se redujo en algunos pozos con tratamiento, lo que continuaba generando variabilidad en la respuesta de esta proteína.

En el caso de IRS-1 fosforilado, se observa un cambio importante, ya que a comparación del experimento anterior la fosforilación de esta proteína fue detectable. Sin embargo, su expresión se mantuvo prácticamente igual en las células con resistencia y en los tratamientos de control. Aunque algunos compuestos mostraron una ligera reducción en la fosforilación de IRS-1, la falta de un efecto claro en los controles indicaba que algo en la metodología aún no estaba funcionando correctamente.

El análisis de AKT fosforilado también mostró un comportamiento inesperado. En este caso, la fosforilación parecía ser mayor en las células con resistencia en comparación con su estado basal, un comportamiento contrario a lo visto en el western anterior (Figura 11), y si bien con los tratamientos se observa un aumento en la fosforilación de AKT, esta inconsistencia reflejaba que seguía existiendo variabilidad en la metodología. Esta variabilidad se hizo aún más

evidente al analizar PTP1B, ya que en las células con resistencia su expresión era prácticamente nula, mientras que en las células tratadas la expresión de esta proteína era mayor. Este resultado era totalmente opuesto a lo esperado, ya que la resistencia a la insulina debería estar asociada con un aumento en la expresión de PTP1B, mientras que los tratamientos deberían reducir su expresión.

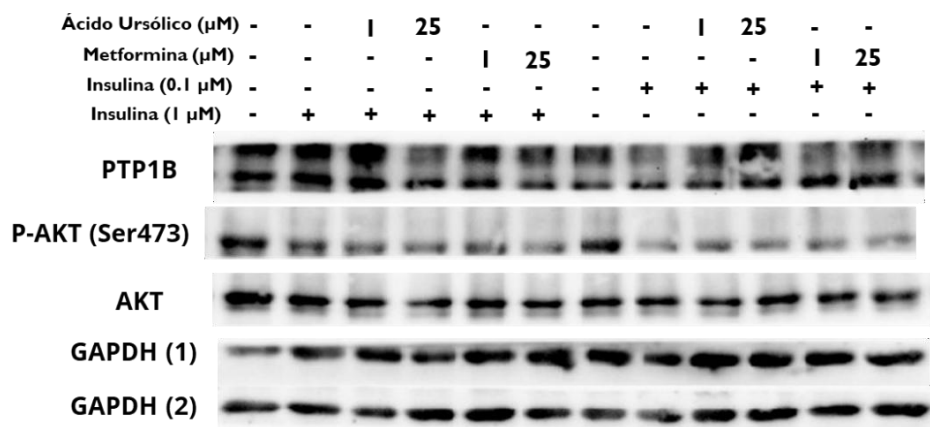
Dado que los controles no mostraban los efectos esperados y persistían inconsistencias en varias proteínas clave, se hizo evidente que aún era necesario realizar más ajustes en la metodología para lograr resultados más confiables y reproducibles.

- **Tercera etapa: Reducción del tiempo de tratamiento y ajuste en la inducción de resistencia**

Para esta nueva metodología, se realizaron cambios significativos en las condiciones experimentales. Uno de los principales ajustes fue la reducción del tiempo de tratamiento con los compuestos, pasando de 24 horas a 1 hora y 30 minutos. Este cambio se implementó debido a que exposiciones prolongadas pueden generar efectos secundarios no deseados, como la activación de mecanismos compensatorios en las células, la degradación de proteínas clave o incluso una alteración en la respuesta a la insulina que no refleja con precisión los eventos inmediatos de la indicación. Al reducir el tiempo de tratamiento, se buscaba capturar una respuesta más directa y evitar posibles interferencias derivadas de un tiempo de exposición excesiva. Además del cambio en el tiempo de tratamiento, las concentraciones de los compuestos al dar tratamiento se ajustaron en 1 y 25  $\mu\text{M}$ , manteniendo un rango adecuado para evaluar su efecto sin comprometer la viabilidad celular.

Cabe resaltar que el primer análisis en esta fase consistió en evaluar dos condiciones para la inducción de resistencia a la insulina. Se compararon células tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de insulina frente a células tratadas con 0,1  $\mu\text{M}$  de insulina, ambas evaluadas dentro del mismo Western Blot para una comparación más precisa. Este cambio permitió determinar si una menor concentración de insulina podría inducir una resistencia más estable y reproducible. Es importante señalar que el paso de agregar 0.1  $\mu\text{M}$  de insulina media hora antes de la extracción celular se mantiene en esta fase, ya que en los experimentos previos se detectó que esta estrategia ayudaba a evaluar la activación de la señalización insulínica de manera más controlada.

Con estos ajustes, se esperaba mejorar la consistencia de los resultados y obtener una evaluación más precisa de los efectos de los compuestos en la reversión de la resistencia a la insulina.

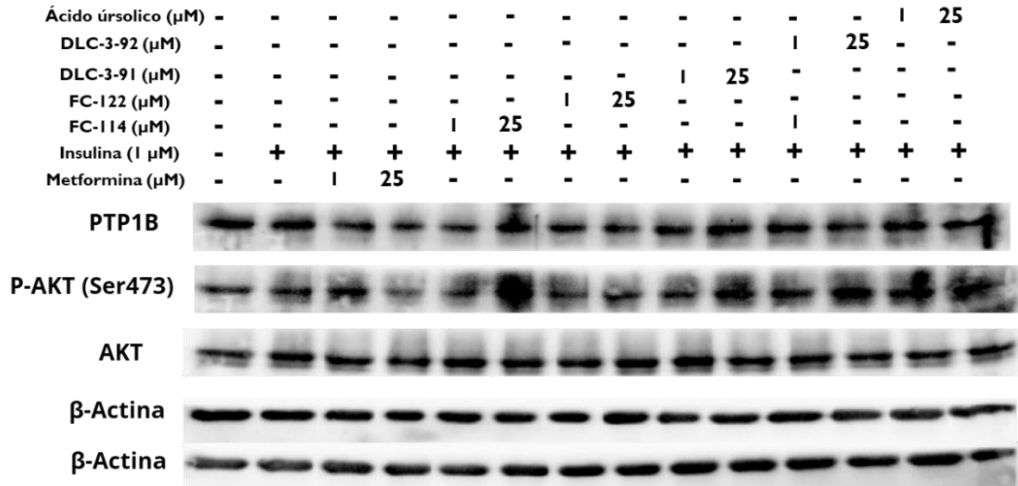


**Figura 13.** Western blot donde se comparan dos concentraciones diferentes de insulina para inducir resistencia.

Para estandarizar el método de manera más uniforme, en los siguientes westerns se decidió evaluar únicamente las proteínas AKT y PTP1B. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la señalización de la insulina y son de las más reportadas en estudios sobre resistencia a la insulina. AKT es una de las principales quinasas involucradas en la transmisión de la señal insulínica, y su activación por fosforilación es crucial para la respuesta celular a la insulina. Por otro lado, PTP1B es un regulador negativo de esta vía, y su sobreexpresión está directamente relacionada con el desarrollo de resistencia. Al centrarse en estas dos proteínas, se buscó reducir la variabilidad y mejorar la reproducibilidad de los experimentos, enfocándose en marcadores clave para evaluar los efectos de los tratamientos.

Con esta decisión tomada, se procedió a realizar un western blot (Figura 13) en el que se compararon dos concentraciones de insulina (1 µM y 0,1 µM) para inducir resistencia, utilizando únicamente compuestos de control (ácido ursólico y metformina). Los resultados mostraron un hallazgo interesante. Al analizar AKT fosforilado, aunque la fosforilación no mostró un aumento significativo tras los tratamientos, sí se observa una diferencia clara entre las células con resistencia y las células sin resistencia, donde en estas últimas la fosforilación de AKT era mayor. Esta diferencia es lo esperado en un modelo funcional de resistencia, y se destacó que con la inducción de resistencia a 0.1 µM de insulina, esta diferencia era aún más evidente.

Además, en ambas metodologías se observó que la expresión de PTP1B aumentó en las células con resistencia, mientras que en las células sin resistencia y en aquellas tratadas con los compuestos, su expresión se reduce. Estos resultados indicaban que ambas metodologías parecían ser funcionales, por lo que el siguiente paso fue evaluar cada una por separado, ahora utilizando los compuestos en estudio en lugar de solo los controles.

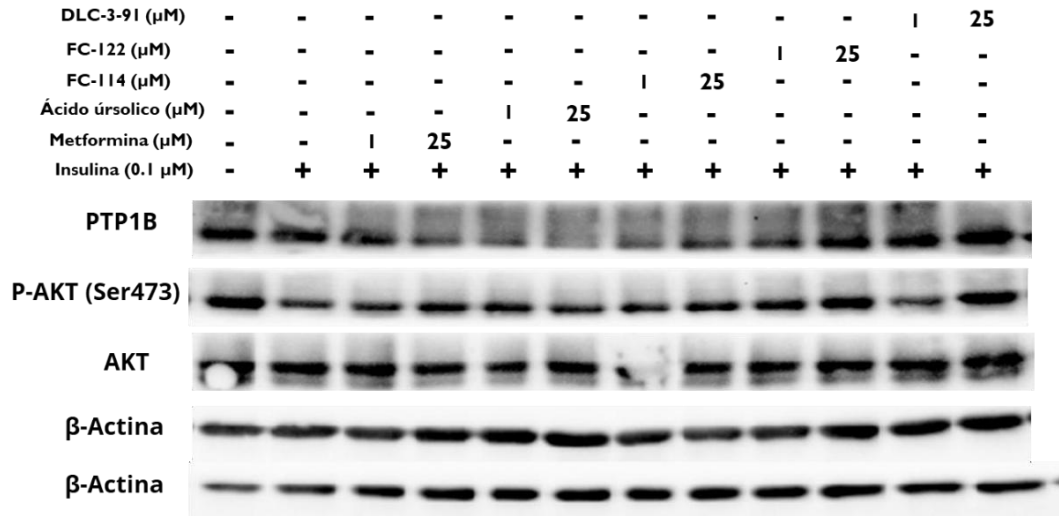


**Figura 14.** Western blot utilizando insulina 1 µM para inducir resistencia con el nuevo tiempo de tratamiento.

Analizando este nuevo western blot (Figura 14), se logró ver una respuesta favorable en la metodología, indicando que los ajustes realizados estaban mejorando la reproducibilidad de los resultados. En cuanto a PTP1B, se observó un comportamiento acorde con lo esperado: las células con resistencia expresan mayores niveles de esta proteína en comparación con las células tratadas. Un hallazgo positivo fue que metformina, utilizada como tratamiento de control, logró reducir la expresión de PTP1B, lo que sugería que la metodología estaba funcionando correctamente permitiendo detectar la inhibición de esta enzima.

Al revisar AKT fosforilado, se confirma que en las células con resistencia su fosforilación se encontraba reducida, lo cual es consistente con un modelo de resistencia a la insulina. Aunque en algunos pozos con tratamiento no se observaba un aumento claro en la fosforilación de AKT, en otros sí se notó una señal más intensa en comparación con las células con resistencia. Esto indica que la variabilidad en la respuesta estaba disminuyendo, lo que representa un avance significativo en la optimización del modelo.

Si bien estos resultados fueron alentadores, aún quedaba evaluar si la inducción de resistencia con 0.1 µM de insulina mostraba un comportamiento similar o incluso más consistente. Teniendo en cuenta eso, se prosiguió a hacer el experimento utilizando esta nueva condición.



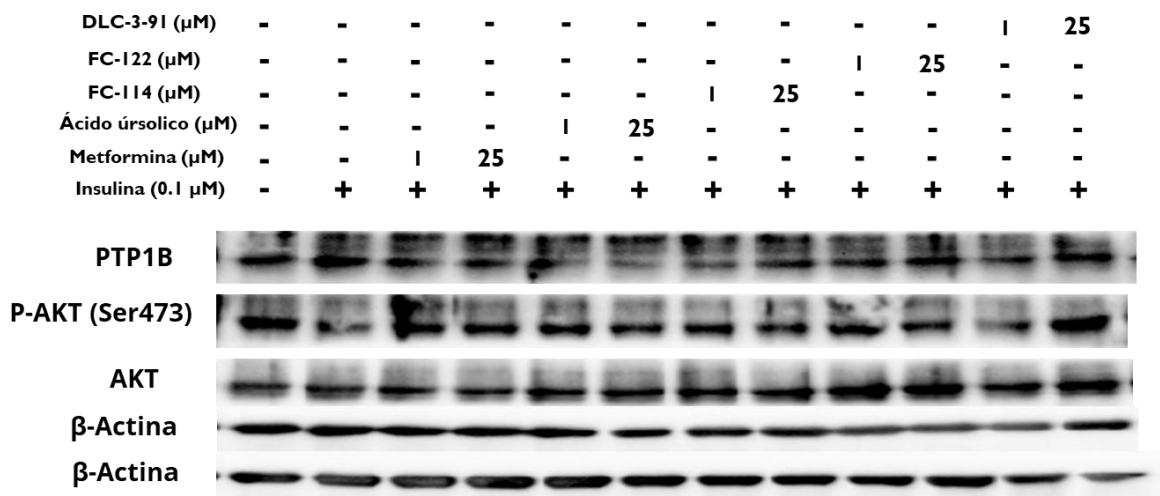
**Figura 15.** Western blot utilizando insulina 0.1  $\mu\text{M}$  para inducir resistencia con el nuevo tiempo de tratamiento.

Al igual que el western blot anterior, este último utilizando insulina 0.1  $\mu\text{M}$  (Figura 15) mostró una respuesta clara y favorable en la metodología, con resultados más consistentes en comparación con experimentos anteriores.

En el caso de PTP1B, se observó de manera más evidente su inhibición en algunas células tratadas, mientras que en las células con resistencia su expresión fue notablemente mayor, lo que se reflejó en una banda más intensa. Además, se revisó que ambos tratamientos de control, metformina y ácido ursólico, lograron inhibir PTP1B, siendo este efecto más marcado con la concentración de 25  $\mu\text{M}$ , lo cual es un indicador positivo de que la metodología estaba funcionando correctamente.

Algo particularmente relevante fue el comportamiento de AKT fosforilado. En este modelo, la desfosforilación de AKT en las células con resistencia fue más evidente, mientras que en las células sin resistencia su fosforilación se mantuvo alta, lo cual es lo esperado en una señalización insulínica funcional. Además, a diferencia de experimentos anteriores, aquí se observó con mayor claridad que la fosforilación de AKT se recuperó con los tratamientos, siendo nuevamente la concentración de 25  $\mu\text{M}$  la que mostró un mejor efecto en la restauración de la señalización insulínica.

Dado que esta metodología mostró una menor variabilidad y los resultados fueron más claros, se decidió realizar una réplica de este western blot para confirmar si esta tendencia se mantenía. De replicarse estos resultados, se habría logrado un avance significativo en la estandarización del modelo, estableciendo una metodología más confiable para evaluar la resistencia a la insulina y la inhibición de PTP1B.



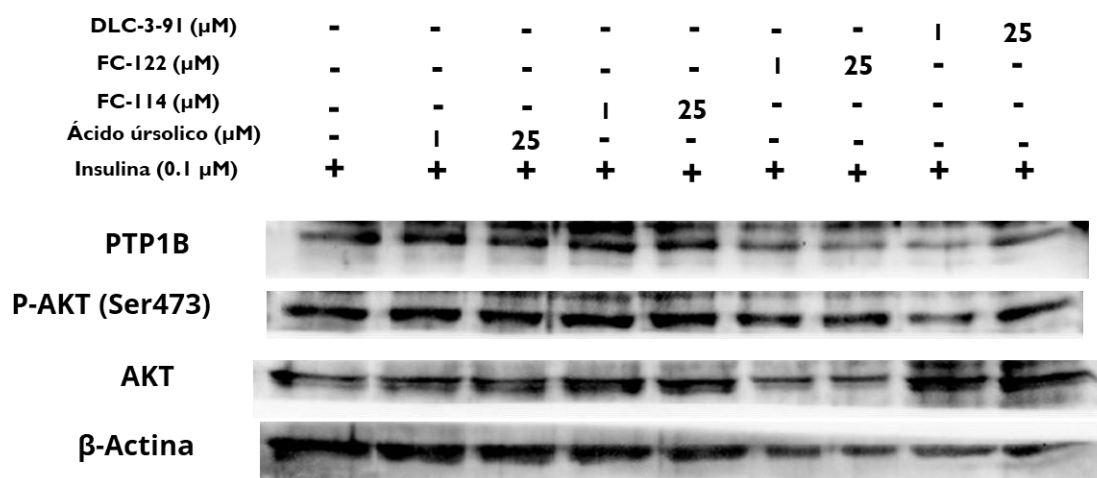
**Figura 16.** Réplica del western blot utilizando insulina 0.1  $\mu\text{M}$  para inducir resistencia.

La réplica de este western blot (Figura 16) arrojó un resultado clave para la validación de la metodología: los hallazgos anteriores se repitieron, lo que indicaba que la tendencia observada no era un resultado aislado, sino que podía ser un comportamiento reproducible.

En cuanto a PTP1B, nuevamente ambos tratamientos de control lograron inhibir su expresión, mientras que en las células con resistencia su sobreexpresión era evidente. En las células sin resistencia también se detectó PTP1B, pero con una intensidad de banda mucho menor en comparación con las células resistentes. Además, se examinó que los compuestos FC-114, FC-122 y DLC-3-91 mostraron una inhibición más efectiva de PTP1B en su concentración de 1  $\mu\text{M}$ , replicando el patrón observado en el primer experimento.

Respecto a AKT fosforilado, la tendencia también se mantiene. Se observa que, en las células con resistencia, AKT permanecía desfosforilado, mientras que, en las células tratadas, la fosforilación se recuperaba, lo que indicaba que la señalización insulínica estaba siendo restaurada. Este hallazgo fue relevante, ya que la variabilidad que afectaba los experimentos anteriores se había reducido considerablemente, consolidando este protocolo como el más consistente hasta el momento.

El hecho de haber obtenido dos westerns blots consecutivos con la misma respuesta representaba un avance significativo en la estandarización del modelo. Sin embargo, para fortalecer aún más la validez de esta metodología y confirmar su reproducibilidad, era necesario realizar una tercera réplica. Con tres experimentos concordantes, se podría establecer con mayor confianza que la metodología era funcional y adecuada para evaluar la inhibición de PTP1B en células resistentes a la insulina, lo que representaría un avance fundamental en este estudio.

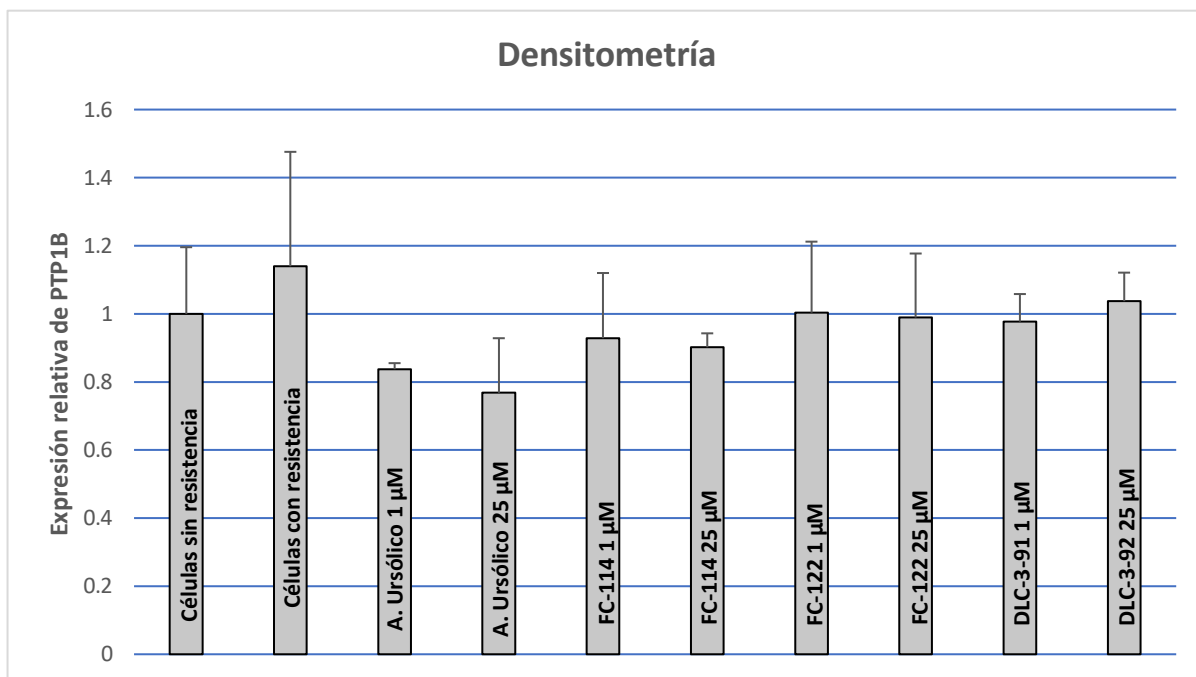


**Figura 17.** Tercera réplica del western blot utilizando insulina 0.1  $\mu\text{M}$  para inducir resistencia.

En esta última réplica (Figura 17), los resultados obtenidos mostraron una menor diferencia en la expresión de PTP1B entre las células con resistencia y aquellas tratadas con ácido úrsólico, en comparación con los experimentos anteriores. De manera similar, en AKT fosforilado tampoco se observa una variación marcada entre las células con resistencia y las células tratadas.

A pesar de que estos resultados no fueron tan claros como en las réplicas previas, se decidió incluir este western como la tercera réplica en el estudio, ya que se observa que los compuestos derivados del ácido glicirretínico sí lograron inhibir PTP1B, lo que indicaba que su efecto seguía presente bajo las mismas condiciones experimentales. Contar con tres westerns consecutivos permitiría realizar un análisis densitométrico más sólido, evitando depender de un solo experimento y proporcionando una visión más general sobre el comportamiento de la metodología.

El siguiente paso fue cuantificar la expresión de PTP1B mediante análisis densitométrico, lo que permitiría evaluar la tendencia global de los datos y determinar qué compuesto lograba una mejor inhibición de la proteína objetivo. Este análisis sería clave para analizar la funcionalidad de la metodología y poder obtener conclusiones más claras sobre este estudio.



**Figura 18.** Análisis densitométrico de la expresión de PTP1B a partir de tres réplicas de Western Blot. Se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a PTP1B en células con resistencia a la insulina y células tratadas con los diferentes compuestos evaluados. Las barras de error representan la separación estándar entre las réplicas, reflejando la variabilidad de los datos obtenidos. Los asteriscos en las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos respecto a las células con resistencia; si hay más de un asterisco representa una diferencia más significativa. Esta representación gráfica permite observar la tendencia general de la inhibición de PTP1B en respuesta a los tratamientos, destacando los compuestos con efectos más pronunciados.

El análisis densitométrico de PTP1B (Figura 18), realizado a partir de las tres réplicas del western blot con la misma metodología, mostró una tendencia clara en la expresión de esta proteína. Se observa que su expresión aumentó ligeramente en las células con resistencia a la insulina en comparación con las células en su estado basal, lo que indica que el modelo está captando los cambios esperados en la señalización insulínica.

En cuanto a los tratamientos, se observa que el ácido ursólico disminuyó significativamente la expresión de PTP1B, especialmente a la concentración de 25 µM, lo que sugiere un efecto claro en la inhibición de esta enzima. Un comportamiento similar se presentó con FC-114, que redujo la expresión de PTP1B en ambas concentraciones, aunque el efecto fue más pronunciado en 25 µM, lo que sugiere un impacto positivo en la recuperación de la señalización insulínica. Por otro lado, FC-122 también mostró una reducción en la expresión de PTP1B, aunque su efecto fue menos marcado en comparación con el ácido ursólico y FC-114. En el caso de DLC-3-91, se observó que a 1 µM redujo ligeramente la expresión de PTP1B, pero en 25 µM no se evidenció un efecto claro, lo que sugiere que su impacto en la inhibición de la enzima podría depender de la concentración utilizada.

Estos resultados sugieren que el modelo de resistencia a la insulina y la metodología utilizada permiten evaluar la inhibición de PTP1B, mostrando diferencias en la respuesta de los distintos tratamientos. Sin embargo, aún hay margen de mejora, ya que persiste cierta variabilidad en los resultados, lo que podría afectar la interpretación de algunas tendencias.

Optimizar aún más la metodología podría reforzar la diferenciación entre la expresión de PTP1B en células con resistencia y aquellas en su estado basal, y así mejorar la reproducibilidad del modelo.

## **7.- CONCLUSIONES**

En este estudio, se trabajó en la estandarización de un modelo de resistencia a la insulina en células HepG2 para evaluar disminución en los niveles de PTP1B. A través de múltiples ajustes metodológicos, se logró reducir la variabilidad y obtener resultados más consistentes, destacando que la inducción de resistencia con 0.1  $\mu$ M de insulina y el tratamiento por 1 hora y 30 minutos permitieron una mejor diferenciación en la fosforilación de AKT y la expresión de PTP1B.

El análisis densitométrico confirmó la tendencia observada en los westerns blots, mostrando que algunos compuestos, como FC-114 y ácido ursólico, lograron reducir los niveles de PTP1B de manera más efectiva. Sin embargo, persistió cierta variabilidad, lo que sugiere que aún hay margen de mejora en la metodología para reforzar la diferenciación entre células con resistencia y en estado basal.

Inicialmente, se había contemplado la realización de ensayos de captación de glucosa para evaluar de manera más directa la sensibilidad a la insulina en las células HepG2. No obstante, estos experimentos no pudieron llevarse a cabo debido a que el kit de glucosa, suministrado por el proveedor Sigma-Aldrich, nunca llegó, lo que impidió su implementación en este estudio.

A pesar de estas limitaciones, la metodología establecida representa un avance en la evaluación de inhibidores de PTP1B, proporcionando una base para futuros estudios enfocados en mejorar la señalización insulínica.

## 8.- REFERENCIAS

1. Álvarez-Almazán, S., Solís-Domínguez, L.C., Duperou-Luna, P., Fuerte-Gómez, T., González-Andrade, M., Aranda-Barradas, M. E., Palacios-Espinosa, J.F.; Pérez-Villanueva, J., Matadamas-Martínez, F., Miranda-Castro, S.P., Mercado-Márquez, C., & Cortés-Benítez, J. F. (2023). Anti-Diabetic Activity of Glycyrrhetic Acid Derivatives FC-114 and FC-122: Scale-Up, In Silico, In Vitro, and In Vivo Studies" *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 16: 12812. <https://doi.org/10.3390/ijms241612812>
2. Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). "The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise". *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 23: 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
3. Barrera Romero, O., Hernández Morejon, D., Izquierdo Paredes, A., & Rodríguez Alvarez, M. (2022). Cell Counts in Neubauer's Chamber. A teaching tool for management and developmental learning. *Salud, Ciencia Y Tecnología - Serie De Conferencias*, 1, 296. <https://doi.org/10.56294/sctconf2022296>
4. Eleftheriou, P., Geronikaki, A., Petrou, A. (2019). "PTP1b Inhibition, A Promising Approach for the Treatment of Diabetes Type II". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, volume 19, issue 4, pages 246-263, issn 1568-0266/1873-4294. <https://doi.org/10.2174/15680266190201152153>
5. Eizirik, D.L., Pasquali, L. & Cnop, M. (2020). "Pancreatic  $\beta$ -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure". *Nat Rev Endocrinol* 16, 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>
6. Galicia-García, U., Benito Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). "Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus". *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 17: 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
7. Nandi, Sisir, & Saxena, M. (2020). "Potential Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP1B) Enzyme: Promising Target for Type-II Diabetes Mellitus". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, volume 20, issue 29, pages 2692-2707, issn 1568-0266/1873-4294. <https://doi.org/10.2174/1568026620999200904121432>
8. Odeyemi, S., & Dewar, J. (2020). "In Vitro Antidiabetic Activity Affecting Glucose Uptake in HepG2 Cells Following Their Exposure to Extracts of *Lauridia tetragona* (L.f.) R.H. Archer" *Processes* 8, no. 1: 33. <https://doi.org/10.3390/pr8010033>
9. Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. (2023). <https://www.insp.mx/avisos/prevalencia-de-prediabetes-y-diabetes-en-mexico-ensanut-2022>
10. Richard, S. A. (2021). "Exploring the Pivotal Immunomodulatory and AntiInflammatory Potentials of Glycyrrhizic and Glycyrrhetic Acids". *Mediators of Inflammation*, vol. 2021, Article ID 6699560. 15 pages. <https://doi.org/10.1155/2021/6699560>
11. Teimouri, M., Hosseini, H., ArabSadeghabadi, Z. et al. (2022). "The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications". *J Physiol Biochem* 78, 307–322. <https://doi.org/10.1007/s13105-021-00860-7>
12. Tie, L., Xiao, H., Wu, D., Yang, Y., & Wang, P. (2021). "A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting". *Acta Pharmacol Sin* 42, 1015–1017 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00539-7>
13. Zhang, Q., Song, S., Jiang, R., Zhang, J., & Na, L. (2023). "Protective effect of manganese treatment on insulin resistance in HepG2 hepatocytes". *Nutrición Hospitalaria*, 40(4), 746-754. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.04521>

14. Mohammed Sayed Esawie, Hebatalla Said Ali, Manal Louis Louka, Amany Helmy Mohamed Hasanin, (2023). "Impact of High Glucose on Sorafenib Resistance in HepG2 Cell Lines". QJM: An International Journal of Medicine, Volume 116. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcad069.109>



Dr. Juan Francisco Cortés Benítez  
Nombre y firma del asesor interno  
No. Económico: 42603



Dr. José Carlos Páez Franco  
Nombre y firma del asesor externo  
Céd. Profesional: 7399261