

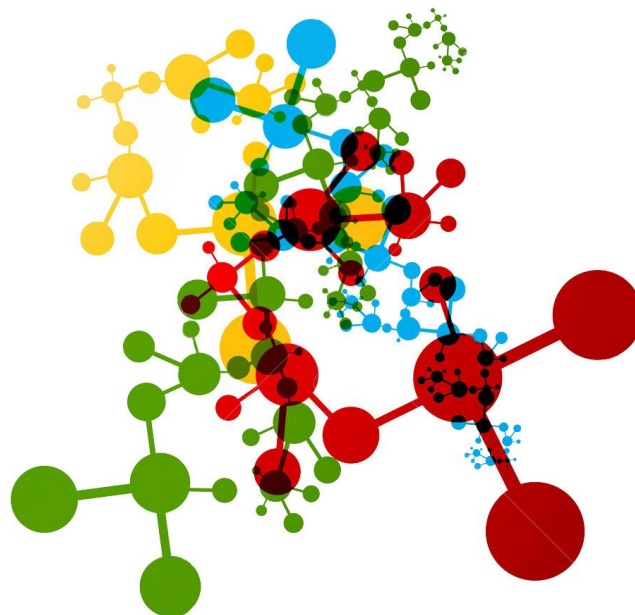
GRADO EN FARMACIA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Identificación y validación de PI3K: una kinasa
reguladora de la adipogénesis**

Identification and validation of PI3K: an adipogenesis
regulator kinase



ELIA ÁLVAREZ COIRADAS

Julio 2015

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Objetivos	16
Materiales y métodos	17
1. Adipogénesis. Diferenciación de adipocitos.....	17
1.1. Diferenciación de adipocitos	18
1.2. Tratamientos <i>in vitro</i> de cultivos celulares	19
2. Tinciones y toma de imágenes de acumulación lipídica	21
3. Lipólisis. Un ensayo funcional	23
Resultados	26
4. Adipogénesis	26
5. Los compuestos inhibidores de PI3K producen un efecto proadipogénico	27
6. Inhibición de la lipólisis mediada por inhibidores de PI3K	34
Discusión	37
Conclusiones	43
Bibliografía	44
Agradecimientos	55

RESUMEN

El tejido adiposo posee un papel central en el metabolismo energético, por lo que su funcionamiento inadecuado podría dar lugar a patologías metabólicas como la obesidad o la diabetes mellitus tipo 2. Este estado disfuncional se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, así como por un exceso de lipólisis. Asimismo, se acompaña de la acumulación de lípidos en tejidos ectópicos. Esto conduce a la aparición del síndrome metabólico, que se caracteriza por resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipemia, obesidad e hipertensión.

En la regulación del tejido adiposo participan distintas kinasas. Recientemente, se aislaron moléculas inhibitoras de kinasas que aumentan la adipogénesis y se identificaron sus dianas moleculares. Debido a su papel en la señalización de la insulina, en este trabajo se ha seleccionado a PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa) para continuar su identificación y validación como enzima reguladora del metabolismo. Para ello se emplea un ensayo fenotípico de adipogénesis en el que los inhibidores de PI3K conducen a una mejora de este proceso. Por otro lado, los inhibidores de PI3K dan lugar a una inhibición parcial de la lipólisis como resultado de su evaluación en un ensayo de este tipo. Así, es posible identificar a PI3K como una diana candidata en la regulación de la adipogénesis y, por consiguiente, en el tratamiento del síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2.

Palabras clave: kinasas, adipogénesis, PI3K, diabetes, lipólisis, metabolismo.

ABSTRACT

Adipose tissue plays a central role in energy metabolism, so its impaired function could lead to metabolic diseases such as obesity or type 2 diabetes mellitus. This dysfunctional state is characterized by hypertrophy and hyperplasia of adipocytes, as well as an excessive lipolysis. Likewise, it is accompanied by lipid accumulation in ectopic tissues. This leads to the emergence of the metabolic syndrome, which is characterized by insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidemia, obesity and hypertension.

Different kinases are involved in regulating adipose tissue. Recently, kinase inhibitors molecules which increase adipogenesis were isolated, and their molecular targets were identified. Because of its role in insulin signalling, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) has been selected in order to continue its identification and validation as a metabolism regulator enzyme. For this reason, an adipogenesis phenotypic assay was employed, where PI3K inhibitors lead to an improvement on this process. On the other hand, PI3K inhibitors result in a partial inhibition of lipolysis as a consequence of its evaluation in a lipolysis assay. Thus, PI3K can be identified as a candidate target in regulating adipogenesis and therefore, in the treatment of metabolic syndrome, obesity and type 2 diabetes mellitus.

Key words: kinases, adipogenesis, PI3K, diabetes, lipolysis, metabolism.

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo tiene un papel central en la regulación del metabolismo energético. Se trata de un órgano endocrino encargado de la homeostasis de nutrientes mediante el almacenamiento del exceso de energía que éstos proporcionan en forma de triglicéridos que, asimismo, regula la liberación de ácidos grasos en los periodos de ayuno. Existe un creciente interés en el estudio del tejido adiposo dada su importancia en el desarrollo de patologías metabólicas como la obesidad o la diabetes mellitus tipo 2 ⁽¹⁾.

La diabetes mellitus se define como un conjunto de alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas (OMS, 1999) ⁽²⁾. Esta patología afecta a más de 374 millones de personas en todo el mundo, lo que representa un 9% de prevalencia en adultos en el año 2014 ⁽³⁾. Además, la diabetes se asocia como primera causa de muerte a enfermedades cardiovasculares, y es la primera causa de ceguera, amputación no traumática y diálisis o trasplante renal en los países occidentales ⁽⁴⁾. De todos los casos de diabetes, el 90% son de diabetes mellitus tipo 2 ⁽²⁾. La prevalencia dicho tipo aumenta con la edad: resulta en un 10-20% en los mayores de 60 años frente a un valor inferior al 10% en los menores de 60 años ⁽⁵⁾. Con respecto a la tasa de mortalidad en España, oscila entre un 12,8 y un 30,4% de muertes por cada cien mil habitantes, de los cuales el 75% fallecen a causa de enfermedad cardiovascular ⁽⁶⁾.

De esta manera, la elevada prevalencia de diabetes, junto con el sobrepeso y la obesidad, constituye un grave problema de salud pública en todo el mundo. La obesidad se define como una patología caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa que resulta perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) clasifica un valor igual o superior a 25 kg/m² como sobrepeso, y uno de 30 kg/m² como obesidad ⁽⁷⁾. En el año 2014, el 39% de los adultos tenían sobrepeso, y el 13% eran obesos. La prevalencia de obesidad se ha doblado desde el año 1980, a pesar de que se puede prevenir con una adecuada educación para la salud. La principal causa del incremento de prevalencia que se ha producido en las últimas décadas es un desequilibrio del balance energético entre calorías ingeridas y consumidas, aunque también ha contribuido a ella el progresivo envejecimiento de la población. Así pues, se ha producido un aumento generalizado en las dietas ricas en grasas y una

marcada disminución de la actividad física relacionada con los estilos de vida sedentarios típicos de la forma de vida urbana ^(6,7).

La mayor parte de los diabéticos tipo 2 presentan asociados a esta patología sobrepeso u obesidad, factores que contribuyen al desarrollo de la misma. De hecho, un índice de masa corporal (IMC) elevado es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de diabetes tipo 2, como también lo es un índice cintura-cadera > 0,95, indicativo de obesidad abdominal. La inactividad física también constituye un factor de riesgo para el desarrollo de estas situaciones clínicas ^(2,4).

A pesar de que la relación está clara a nivel epidemiológico, no se conoce el mecanismo exacto que relaciona obesidad y diabetes. Se piensa que la capacidad de expansión del tejido adiposo es limitada. Se propone la hipótesis de que, una vez superado el límite de almacenamiento del exceso de energía en el tejido adiposo, el exceso de grasa comienza a almacenarse de forma anormal en órganos ectópicos, aunque relevantes para el metabolismo, principalmente en el músculo esquelético, hígado y páncreas ⁽⁸⁻¹¹⁾.

La acumulación de estos depósitos anómalos tienen como consecuencia lipotoxicidad, que se asocia a apoptosis y a la aparición el síndrome metabólico: un conjunto de manifestaciones que afectan a múltiples órganos y sistemas, caracterizado por intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipemia, obesidad central e hipertensión. Dichas manifestaciones incrementan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares ^(8,12-14).

El síndrome metabólico es consecuencia de la disfunción producida en el tejido adiposo por el exceso energético derivado de la dieta, que conduce a cambios en el mismo. Así pues, se produce hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, se aprecian cambios en la matriz extracelular, se ve incrementada la lipólisis, y se produce inflamación ^(1,15). Por lo tanto, el estudio del proceso de adipogénesis resulta clave para entender el síndrome metabólico, y se ve facilitado por la disponibilidad de modelos celulares de diferenciación adipocitaria ⁽¹⁶⁾.

La adipogénesis es el proceso por el que células indiferenciadas (preadipocitos) se diferencian a adipocitos o células grasas ^(16,17). Su principal regulador es el factor de transcripción PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) ^(1,18,19). PPAR γ es un receptor nuclear que presenta dos isoformas abundantes en el tejido adiposo, siendo PPAR γ 2 exclusiva del tejido adiposo blanco ^(18,20-22). Es un factor proadipogénico tan importante que puede producir esta diferenciación a

adipocitos en células como fibroblastos o mioblastos. Si se pierde su función, se produce lipodistrofia y un estado de resistencia a la insulina severo ^(17,23).

La adipogénesis, además de PPAR γ , requiere de algunos factores de transcripción de la familia C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein*), puesto que este proceso metabólico implica una cascada de transducción celular ^(1,16,18,21,22). Así pues, C/EBP α , junto con C/EBP β y C/EBP γ , tienen un papel imprescindible en el proceso de adipogénesis ⁽¹⁾. De hecho, este proceso puede producirse con la expresión de PPAR γ y C/EBP α (aunque nunca en ausencia de PPAR γ), pero no conduce a una diferenciación completa en ausencia de C/EBP β y C/EBP γ ^(16,21).

En los primeros momentos de la diferenciación C/EBP β y C/EBP γ activan la expresión de PPAR γ , que posteriormente promueve la de C/EBP α . Esta actividad retroalimenta positivamente la expresión del receptor nuclear, de manera que se favorece el mantenimiento del estado de diferenciación adipogénica. Una segunda señal de C/EBP β retroalimenta positivamente a PPAR γ , de forma que se refuerza la inducción de la diferenciación ^(1,16,22,24,25). Además, esta cascada adipogénica también induce la transcripción del receptor de insulina ^(16,17). Estos cambios en la expresión genética producidos durante la adipogénesis se mantienen durante toda la vida del adipocito maduro ⁽¹⁶⁾.

Una vez producidos los cambios adipogénicos, el tejido adiposo funcional regula el metabolismo energético mediante dos procesos principales: la lipogénesis y la lipólisis. A pesar de que la procedencia habitual de la grasa es la dieta (los adipocitos captan los ácidos grasos libres de la sangre), el tejido adiposo puede sintetizar lípidos a partir de glúcidos. Este último proceso se denomina lipogénesis *de novo*. Las enzimas encargadas de ello son la ácido graso sintasa y la acetil-CoA carboxilasa, así como la diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT), que cataliza la adición de un tercer acetil-CoA al diacilglicérido, y la lipoproteinlipasa, que proporciona ácidos grasos no esterificados para la síntesis de triglicéridos ^(1,26).

La lipólisis es el proceso de oxidación de los triglicéridos, que resulta en la liberación de ácidos grasos y glicerol. Las principales enzimas encargadas de la lipólisis son la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo (ATGL), la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la monoglicérido lipasa (MGL). Esta última completa el proceso metabólico hasta la generación de glicerol (constituye un marcador de lipólisis) y ácidos grasos (desde monoacilglicéridos) ^(1,26-28). En el tejido adiposo, a diferencia de otros órganos (donde los productos de la lipólisis se emplean en la síntesis lipídica o en la oxidación), los ácidos grasos y el glicerol resultantes de la lipólisis se liberan a la sangre para que puedan ser transportados a otros tejidos. La lipólisis puede inducirse por estímulos fisiológicos, como son los producidos por las

catecolaminas (adrenérgicos), que estimulan la adenilciclasa para producir AMPc. Así se activa la protein kinasa A (PKA), que fosforila la HSL y la perilipina-1, y esta última facilita la activación de ATGL⁽²⁷⁾.

La insulina constituye el inhibidor de lipólisis más importante a nivel fisiológico. Esta acción se lleva a cabo mediante la reducción de los niveles de AMPc, ya que la insulina activa la fosfodiesterasa 3b (PDE3b) a través de la fosforilación mediada por Akt. En la diabetes mellitus tipo 2 asociada a obesidad, a pesar de que los niveles de insulina puedan encontrarse elevados, esta acción supresora de la lipólisis se encuentra deteriorada^(1,13,27,29).

Como ya se ha mencionado, entre las manifestaciones y complicaciones del síndrome metabólico se encuentran la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2. Esta última se caracteriza por un defecto en la acción de la insulina, ya sea debido a un uso metabólico ineficiente y/o a una insuficiente producción^(4,30). La insulina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por las células β del páncreas que se libera como respuesta al aumento de la glucemia ocasionado por una comida. De esta manera, la insulina regula el metabolismo glucídico: incrementa la tasa de captación celular de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, e inhibe la gluconeogénesis y la glucogenolisis hepáticas. Sin embargo, las acciones de la insulina también afectan al metabolismo lipídico y proteico, de forma que se inhibe la lipólisis en el tejido adiposo y se incrementa la lipogénesis en dicho tejido, así como en el hígado, donde también estimula la síntesis de proteínas^(13,19,31).

La ineficacia de la insulina característica de la diabetes mellitus tipo 2 se debe inicialmente a la resistencia a la acción de esta hormona en los tejidos metabólicos⁽²⁾. Dicho estado se define como una disminución de la respuesta a niveles normales de insulinemia por parte de los tejidos diana, es decir, el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético⁽¹³⁾. Como resultado de ello, el organismo precisa niveles más altos de insulina para poder captar adecuadamente la glucosa de la sangre derivada de la alimentación y una inadecuada supresión de la gluconeogénesis hepática. Esta compensación inicial con una elevada insulinemia evoluciona con el tiempo hacia una producción y secreción insuficiente de insulina^(2,30,32,33). Dicha secreción es insuficiente debido al daño en las células β pancreáticas y a su subsecuente apoptosis producida por la elevada demanda a la que se ven sometidas con la hiperglucemia. De esta manera, el desarrollo de diabetes se produce cuando la insulina secretada es insuficiente para hacer frente a la resistencia a esta hormona en los tejidos^(30,33,34).

La causa de la resistencia a la insulina es desconocida, aunque sí se han establecido factores que influyen en la misma, como el exceso de tejido adiposo ya mencionado. Recientemente, se ha visto que el músculo esquelético juega un papel principal en el metabolismo glucídico, de forma que defectos en la síntesis de glucógeno en este órgano pueden ser factores causales de la resistencia a la insulina ^(13,19,35). En este sentido, se ha establecido que los ácidos grasos pueden producir resistencia a la insulina mediante la inhibición de la activación del transportador de glucosa GLUT-4 por insulina en el músculo esquelético ^(35,36). Esto derivaría de la inhibición de la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS-1 en una señalización defectuosa de la cascada de activación de GLUT-4: receptor de insulina (IR), su sustrato IRS-1, PI3K, PKC ζ y Akt ^(8,13,19,35). Asimismo, una expresión elevada en el tejido adiposo de citoquinas inflamatorias (como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o la interleucina 6 (IL-6) se ha relacionado con la resistencia a la insulina: estimulan la fosforilación del IRS-1 en los residuos de serina, lo que conduce a la inhibición de la traslocación de GLUT-4 ^(13,37,38).

De esta manera, el tejido adiposo es una fuente importante de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-6. A pesar de que se conoce desde hace décadas que en el tejido adiposo se encuentran células inmunitarias, el descubrimiento de su papel en el funcionamiento del mismo es más reciente ⁽¹⁾.

Se ha demostrado que estas citoquinas proinflamatorias se producen en los macrófagos, los cuales se encuentran rodeando a los adipocitos, especialmente en la grasa visceral ^(1,39,40). El reclutamiento de los macrófagos se relaciona con la muerte adipocitaria: se produce la ruptura de su membrana plasmática, dilatación del retículo endoplasmático, y liberación de contenido intracelular al espacio extracelular ⁽³⁹⁾.

Comparado con el tejido adiposo de individuos delgados, el de sujetos obesos expresa cantidades significativamente mayores de mediadores inflamatorios ⁽⁴⁰⁾. Así pues, el número de macrófagos presentes en la grasa y la expresión de citoquinas proinflamatorias empeoran la sensibilidad a la insulina de los adipocitos del propio tejido adiposo, y causan este mismo daño en el hígado y en el músculo esquelético. Asimismo, TNF- α incrementa la lipólisis en los adipocitos, e IL-6 estimula la lipólisis y la liberación de triglicéridos a nivel hepático. Así pues, la inflamación crónica del tejido adiposo se considera un marcador temprano para el desarrollo de las complicaciones metabólicas de la obesidad, especialmente de la diabetes mellitus tipo 2 ^(1,38-40).

La regulación de los distintos procesos celulares controlados por insulina, se efectúa mediante una compleja cascada de señalización. En ella participan varias kinasas, proteínas que se encargan, de forma general en múltiples procesos celulares, de la transducción de una señal procedente de un estímulo ⁽⁴¹⁾. Como ya se ha mencionado, en presencia de insulina, el receptor de insulina (IR) (a cuyo dominio extracelular heterotetramérico se ha unido esta hormona) conduce a una tirosín fosforilación de las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS), las cuales activan dos vías de señalización: PI3K-Akt y Ras-MAPK, que regulan principalmente las acciones metabólicas de la insulina y el crecimiento y diferenciación celular, respectivamente ^(35,42). Así pues, PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase* ó fosfatidilinositol 3-kinasa) es una enzima perteneciente a la familia de las protein kinasas que regula la señalización de insulina a través de la generación del segundo mensajero celular PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica de 110 KDa (existen tres diferentes: p110α, β y δ) y una regulatoria de 85 KDa (posee cinco variantes: p85α, p55α, p50α, p85β, p55γ). No obstante, también existe otra clase de PI3K compuesta por la subunidad catalítica p110γ que, a diferencia de las anteriores (activadas por tirosín kinasas), se activa por receptores acoplados a proteínas G ^(42,84).

De esta manera, la unión de las proteínas IRS al heterodímero PI3K (concretamente se unen a la subunidad regulatoria p85, que resulta en el reclutamiento y activación de la subunidad catalítica p110) lleva a la producción de PIP₃ en la membrana plasmática a través de la fosforilación de fosfolípidos de membrana por PI3K. PIP₃ activa la cascada mediada por Akt, mediante la estimulación de la protein kinasa PDK. Akt es responsable de la transducción de la señal al citoplasma, mitocondria y núcleo celular, donde fosforila y activa múltiples sustratos ^(13,41-44).

Así pues, se ha visto que PI3K posee un papel fundamental en la captación de glucosa estimulada por insulina, tanto en el tejido adiposo como en el músculo esquelético. Por lo tanto, esta kinasa puede ser uno de los puntos en los que se produce la alteración de la cascada de señalización de la insulina en sujetos que presentan insulinoresistencia. La actividad de PI3K podría alterarse directamente por efecto de los ácidos grasos o de forma secundaria a desregulación de puntos anteriores de la cascada ^(13,19,31,35).

La actividad de PI3K, así como la de otras kinasas, puede encontrarse alterada en la resistencia a la insulina. De forma similar, en el tejido adiposo de los sujetos que presentan manifestaciones del síndrome metabólico, como ya se explicó con anterioridad, se produce hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, así como un aumento de la lipólisis. En estos cambios patológicos se altera el sistema

de señalización de estas células, en el que intervienen otras kinasas. En consecuencia, podrían ser enzimas candidatas en el tratamiento de la diabetes ⁽¹⁵⁾.

Las protein kinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de sustratos dependiente de ATP. El sitio de unión de ATP es una estructura altamente conservada en las distintas kinasas, que se diferencian en otros dominios catalíticos. Según las secuencias de estos dominios y su función bioquímica se establecen las relaciones entre las más de 500 kinasas humanas.

De las 518 kinasas humanas identificadas, 478 pertenecen a una superfamilia cuyos dominios catalíticos se relacionan en la secuencia, de forma que se pueden concentrar en grupos, familias y subfamilias según la similitud de sus secuencias de aminoácidos y de su función bioquímica (por ejemplo: fosforilan residuos de tirosina o de serina/treonina). No obstante, existen 40 kinasas denominadas “atípicas”, para las que no se ha establecido una relación en el parecido de su secuencia, pero sí se conoce o predice su actividad enzimática ⁽⁴⁵⁾.

Las protein kinasas ocupan un lugar central en los mecanismos de señalización celular. De esta manera, controlan múltiples procesos en las células, entre los que se incluyen: metabolismo, transcripción, regulación del ciclo celular, movimientos del citoesqueleto, apoptosis o diferenciación. También participan en la comunicación intercelular y en las respuestas fisiológicas, así como en el funcionamiento de los sistemas nervioso o inmunitario. Muchas de ellas se encuentran moduladas por fosforilación, que puede deberse a la propia kinasa o a otras enzimas. Ciertas mutaciones en las kinasas o algunas alteraciones en las vías de señalización en las que participan se relacionan con fenotipos patológicos. Por consiguiente, constituyen dianas terapéuticas atractivas para las que se han desarrollado inhibidores farmacológicos ^(45,46).

Así pues, las kinasas se han estudiado ampliamente en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Concretamente, algunas familias de protein kinasas regulan los distintos eventos del ciclo celular, los cuales se encuentran frecuentemente desregulados en las células cancerosas, que evaden los mecanismos fisiológicos de control del crecimiento y la supervivencia. En consecuencia, algunos inhibidores de kinasas (moléculas pequeñas) han sido aprobados como tratamiento de distintas patologías oncológicas ^(47,48).

Un ejemplo de regulación farmacológica del metabolismo mediante protein kinasas reside en el caso de la metformina. Se trata de una biguanida, un fármaco antidiabético oral que disminuye la resistencia a la insulina, reduce las complicaciones de la misma, así como la mortalidad, y no produce

aumento de peso ^(6,49). Su mecanismo de acción molecular consiste en la activación de la kinasa AMPK (*AMP-activated protein kinase*) en los hepatocitos y la activación de un complejo mitocondrial que da lugar a una respuesta deficiente al glucagón. AMPK es una kinasa reguladora del metabolismo sensible al ratio intracelular de AMP/ATP y que regula, entre otros efectos metabólicos, la gluconeogénesis y la síntesis de lípidos en el hígado, la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. Por lo tanto, la metformina incrementa la sensibilidad a la insulina, principalmente mediante la modulación del metabolismo lipídico ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

Tras haber realizado un ensayo fenotípico de High Throughput Screening (HTS) se han identificado distintas kinasas reguladoras de la adipogénesis. Para ello, se realizó un ensayo de adipogénesis con moléculas reguladoras del kinoma representado en la librería PKIS (Published Kinase Inhibitor Set) de GSK, que contiene 376 inhibidores de kinasas ⁽⁵³⁾.

La tecnología de High Throughput Screening (HTS) permite llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de un gran número de moléculas pequeñas (es decir, de bajo peso molecular) pertenecientes a una librería de compuestos en función de su actividad farmacológica en un sistema *in vitro* miniaturizado. Se caracteriza por su simplicidad, alta eficiencia, rapidez y bajo coste. Ha servido para el descubrimiento de nuevas moléculas (tanto naturales como sintéticas) candidatas a fármacos, desde su implementación a finales de la década de 1990. Asimismo, permite el descubrimiento de fármacos considerados *first-in-class*, es decir, aquellos que modulan de forma innovadora una diana o una ruta de señalización celular ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

El descubrimiento de fármacos *first-in-class* se puede dividir en una serie lineal de etapas, que incluyen: la identificación de la diana, el desarrollo del ensayo, el descubrimiento de moléculas *hit* y su validación, la progresión a un *lead* y su optimización, y el desarrollo de ensayos preclínicos en animales ⁽⁵⁴⁾.

Esta serie de etapas se corresponde con la primera de las dos principales clases de screening de fármacos, que pueden complementarse: basadas en una diana (*target-based screening*) o en un fenotipo (*phenotypic screening*) ^(54,57-59). El descubrimiento de fármacos basado en dianas consiste, en primer lugar, en la identificación y validación de una diana relevante para una patología (generalmente partiendo de modelos animales, observación clínica o descubrimientos en investigación básica). Posteriormente, se desarrollan ensayos de HTS para identificar moléculas que modulen dicha diana (tal y como se ha explicado con anterioridad), y se optimiza su estructura para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. En los últimos 30 años, este primer

enfoque ha sido el más utilizado por la industria farmacéutica y los centros de investigación académicos. Sin embargo, en los últimos años los screening fenotípicos han atraído interés, dado que permiten optimizar las propiedades de las moléculas como fármacos y debido a las limitaciones en el enfoque basado en dianas moleculares ^(57,60). Este abordaje es particularmente útil en el caso de la identificación de moléculas que no son selectivas para la proteína de interés, sino que afectan a otras dianas de la misma o distintas rutas celulares ^(57,58).

Un screening fenotípico consiste en la identificación y evaluación de compuestos que producen una respuesta biológica directamente en un sistema complejo ^(54,58,60,61). El mecanismo de acción y la diana de la molécula descubierta mediante este tipo de screening puede desconocerse incluso hasta la determinación de la eficacia del fármaco ⁽⁵⁷⁾.

Históricamente, el descubrimiento de fármacos se ha basado en un enfoque fenotípico, como es el caso del descubrimiento accidental de la actividad antibacteriana de la penicilina, de forma que se desconocía el mecanismo de acción o la diana de la mayoría de las moléculas incluso cuando éstas se han aprobado por las agencias reguladoras. Un famoso ejemplo es el del ácido acetilsalicílico, cuyo mecanismo de acción se tardó en conocer casi 100 años ⁽⁵⁷⁾.

Con respecto a los screening basados en dianas moleculares, un enfoque fenotípico permite proporcionar una mayor relevancia fisiológica dado que se emplean modelos biológicos. Asimismo, constituye un ensayo más relevante para ciertos estados patológicos. Del mismo modo, permite desarrollar moléculas para enfermedades cuya diana farmacológica no se ha descubierto, o incluso permite el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas ^(57,61).

En este contexto, se desarrollan modelos de enfermedad en los que se pueden identificar compuestos que mejoren el fenotipo de la patología. Algunos de ellos, como en el presente trabajo, son modelos celulares que proporcionan la complejidad de un sistema biológico complejo al mismo tiempo que permiten miniaturizar el fenotipo y desarrollar ensayos de HTS. En ellos, normalmente se pueden emplear células diferenciadas a partir de líneas pluripotentes ^(57,58,62,63).

En este sentido, se han desarrollado sistemas de captura y análisis de imagen con el objetivo de facilitar el proceso de descubrimiento de fármacos mediante screening fenotípico en modelos celulares. Estos métodos facilitan la visualización de los cambios fenotípicos y permiten su cuantificación, idealmente con una alta resolución y rendimiento. Los sistemas de detección más utilizados actualmente son aquellos que emplean la fluorescencia ⁽⁶³⁾.

Los *hits* identificados en estos ensayos fenotípicos pueden progresar a *leads* sin conocer necesariamente su diana molecular. No obstante, el conocimiento de la misma facilita la optimización de la estructura y farmacocinética del compuesto, y es un paso necesario para demostrar que el compuesto identificado es un candidato a fármaco ^(57,58). El proceso de identificación de la diana molecular puede resultar complejo ya que, en ocasiones, los compuestos estudiados pueden interactuar con otras dianas. Así pues, el fenotipo observado sería el resultado de la interacción con todas ellas: de ahí la importancia de la optimización de la selectividad del compuesto identificado ^(61,62).

Una vez se ha identificado una diana molecular, debe efectuarse su validación, de forma que se eliminen dianas candidatas que hayan podido dar un falso positivo: sólo porque la molécula se una a una determinada proteína, esto no quiere decir que ésta sea su diana terapéutica. Los ensayos desarrollados para ello incluyen métodos bioquímicos, biofísicos, genéticos o funcionales. Todo ello permite establecer la relevancia terapéutica de la molécula y de su diana ^(58,59,61).

Dado que el tejido adiposo posee un papel central en el desarrollo de enfermedades metabólicas, es un lugar del organismo atractivo para encontrar dianas terapéuticas de interés para estas patologías. Existe la hipótesis de que un proceso adipogénico eficiente que resulte en la generación de un gran número de adipocitos de pequeño tamaño (es decir, no sobrecargados de lípidos), con una excelente función de captación de la glucosa y un adecuado perfil hormonal, podría favorecer el metabolismo en pacientes obesos ^(1,11). Por el contrario, si se produce una expansión inapropiada de los adipocitos, esto podría dar lugar a una obesidad hipertrófica, caracterizada por un tejido adiposo mal regulado, con una adipogénesis dañada, que conduce a inflamación y resistencia a la insulina ⁽¹¹⁾.

En este sentido, el mecanismo de acción de las tiazolidinodionas, apunta a la misma hipótesis ^(1,11). Las tiazolidinodionas son fármacos agonistas del receptor nuclear PPAR γ que producen sensibilización a la insulina, disminuyen la glucemia (se ve incrementada la captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo y disminuye la gluconeogénesis hepática) y los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, de los pacientes de diabetes mellitus tipo 2 tratados con estos antidiabéticos orales ^(1,8,64-68). Este último efecto se debe a que bloquean la liberación de ácidos grasos, al permitir su reesterificación en un ciclo fútil (desarrollado en los adipocitos). Dado que la elevación de los ácidos grasos en plasma conduce a resistencia a la insulina, éste puede ser uno de los mecanismos esenciales por los que las tiazolidinodionas sensibilizan los tejidos a la acción de la insulina ^(26,64).

Así pues, las tiazolidinodionas mejoran los parámetros metabólicos de los pacientes, a pesar de que se produce un incremento en la adiposidad. Este incremento se produce en los depósitos subcutáneos de tejido adiposo, mientras que la grasa ectópica disminuye ^(1,11,86). A pesar de poseer un mecanismo de acción potente, su utilidad clínica se ha visto limitada por la aparición de efectos adversos como el posible incremento de riesgo cardiovascular, osteoporosis o cáncer de vejiga ^(1,6,11,49,86).

El mencionado enfoque del tejido adiposo como regulador del metabolismo y, por lo tanto, candidato a la identificación de dianas terapéuticas en el mismo, se establece en el presente trabajo. Tras haber realizado un HTS con la librería PKIS se han aislado moléculas inhibidoras de kinasas que aumentan la adipogénesis y se han identificado sus dianas moleculares. De las dianas resultantes en ese HTS, se ha seleccionado PI3K para continuar su estudio, dado su elevado interés metabólico al participar ésta en la cascada de señalización de la insulina. Por consiguiente, se pretende confirmar la identificación e iniciar la validación de PI3K como diana reguladora de la adipogénesis y, en consecuencia, del funcionamiento del tejido adiposo. Para ello se emplearán ensayos fenotípicos propios del tejido adiposo, como son los de adipogénesis y lipólisis.

OBJETIVOS

La principal hipótesis de este trabajo consiste en que si se inhibe farmacológicamente la kinasa PI3K, esto implicaría una vía de regulación de la adipogénesis. De esta manera, la modulación de PI3K, dado su papel principal en la cascada de transducción de la señal de la insulina, que se ve alterada en las enfermedades metabólicas, podría resultar en la promoción de un proceso adipogénico correcto. Esto permitiría mejorar manifestaciones del síndrome metabólico como son la resistencia a la insulina o el perfil dislipémico derivado de un exceso de lipólisis. Los objetivos propuestos en este trabajo son:

1. La identificación y validación de kinasas reguladoras de la capacidad adipogénica. Concretamente, se pretende confirmar a PI3K como diana farmacológica e iniciar su validación mediante ensayos fenotípicos del tejido adiposo.
2. La evaluación de los efectos derivados de la inhibición farmacológica de PI3K en el proceso de lipólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ADIPOGÉNESIS. DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS

Para la preparación de cultivos celulares de tejido adiposo en la validación de la diana seleccionada se emplea la línea celular C3H10T1/2.

Dicha línea celular se caracterizó por primera vez en 1973 a partir de células embrionarias de ratón C3H^(69,70). Se trata de células madre pluripotentes (fibroblastos) de origen mesodérmico que poseen la capacidad de diferenciarse a tejidos preadiposo, premuscular o precartilaginoso⁽⁷¹⁾. De esta manera, constituyen modelos adecuados para el estudio de la adipogénesis. De hecho, este modelo celular de preadipocitos ha sido validado *in vivo*, de forma que al implantar dichas células en tejido subcutáneo de ratones sin timo se desarrolla tejido adiposo normal sin la necesidad de ser estimulado exógenamente⁽⁷²⁾.

La morfología de las células C3H10T1/2 difiere si se encuentran en cultivos celulares no confluentes o confluentes. Así pues, en el primer caso, se observa una forma característica de fibroblasto, es decir, de célula pequeña con el citoplasma alargado y con múltiples prolongaciones. Cuando se encuentran confluentes conformando una monocapa en la superficie de cultivo, se asemejan a las células epiteliales, con los núcleos separados uniformemente^(69,70).

La confluencia de las células C3H10T1/2, es determinante para poder llevar a cabo su diferenciación a adipocitos. De esta manera, las células detienen su proliferación cuando cubren totalmente la superficie de cultivo (ya que es la disponibilidad de espacio la que limita su crecimiento) y entran en fase de reposo G₀ del ciclo celular. Es en este periodo cuando, mediante un estímulo apropiado, pueden diferenciarse a adipocitos⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Una vez inducida la diferenciación, los preadipocitos vuelven a entrar en el ciclo celular y sufren uno o dos ciclos mitóticos conocidos como expansión clonal. Posteriormente se detiene su crecimiento definitivamente, lo que lleva a la expresión del fenotipo totalmente diferenciado^(72,75).

El proceso de adipogénesis implica una cascada de transducción celular en la que son determinantes los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP^(22,24,75-77). C/EBP β y C/EBP γ activan el receptor nuclear

PPAR γ en los primeros momentos, y posteriormente PPAR γ promueve la activación de C/EBP α , produciéndose una retroalimentación positiva entre estos dos factores. De esta manera, se favorece el mantenimiento de la diferenciación a adipocitos^(22,24,78).

1.1. Diferenciación de adipocitos.

Las células C3H10T1/2 se cultivan en placas Petri de cultivo celular de 10 y 15 centímetros (obtenidas de Thermo-Fischer) hasta obtener un crecimiento exponencial apropiado para su tripsinización a placas de 6 pocillos (Falcon) y de 96 pocillos (negras de fondo blanco con tapa (Cell Carrier 96 de PerkinElmer). La tripsina empleada, *Trypsin-EDTA 0,05*, procede de Thermo-Fischer. En el primer caso se siembran 50000 células por pocillo frente a 10000 células en el segundo caso. El medio de cultivo empleado es DMEM Glutamax™ (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* que lleva añadido 4,5 g/l de D-glucosa y piruvato) de Thermo-Fischer, al que se le añade un 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) 9665 procedente de Sigma-Aldrich y un 1% de antibiótico-antimicótico (A-A) (compuesto por estreptomina, anfotericina B y penicilina) de Thermo-Fischer. El FBS proporciona factores de crecimiento inespecíficos y favorece la supervivencia celular del cultivo, mientras que el A-A previene la contaminación microbiana procedente de bacterias y hongos.

Una vez alcanzan confluencia, se esperan dos días de manera que se detenga su crecimiento, como ya se ha explicado, y se encuentren en estado de mitosis para ser diferenciadas.

Posteriormente, las células se exponen a un medio inductor de adipogénesis. Se trata del mismo medio que se emplea en el mantenimiento celular (DMEM Glutamax™) suplementado al 10% con FBS 10099 Gibco (Thermo-Fischer) y 1% de antibiótico-antimicótico, al que se le añaden los siguientes compuestos para la diferenciación a adipocitos: insulina (solución de páncreas bovino 10 mg/ml) a una concentración final en el medio de cultivo de 5 μ g/ml, IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) a 0,5 mM, dexametasona (1 μ M) y rosiglitazona (1 μ M), todos obtenidos de Sigma-Aldrich.

La insulina es una hormona que promueve el anabolismo y la expresión de genes que favorecen la acumulación lipídica. Regula procesos como la captación de glucosa, la inhibición de lipólisis inducida por catecolaminas o la activación del receptor de IGF-1, todos ellos relacionados con la diferenciación a adipocitos^(72,79).

La dexametasona es un glucocorticoide, por lo tanto, perteneciente a un grupo de hormonas que promueven la adipogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* ^(72,80). Activa la expresión de los genes C/EBP δ y PPAR γ , que median esta diferenciación a adipocitos ^(24,78,81).

IBMX es un inhibidor no específico de fosfodiesterasas que, por este mecanismo, aumenta la concentración intracelular de AMPc, favoreciendo la activación de rutas celulares mediadas por el mismo ⁽⁷²⁾. Así pues, induce la expresión de C/EBP β ^(24,78,80-82).

La rosiglitazona es una tiazolidinodiona cuyo mecanismo de acción consiste en la activación de PPAR γ . Así pues, esto conduce a un incremento de la actividad adipogénica en el tratamiento de preadipocitos ^(22,72,75). *In vivo* se produce un incremento de la sensibilidad a la insulina y, en consecuencia, a sus efectos sobre el metabolismo lipídico y de los glúcidos ⁽⁸³⁾.

Una vez realizada la inducción de la diferenciación, transcurridos dos días, se renueva el medio de diferenciación (DMEM Glutamax™ con 10% FBS 10099 y 1% antibiótico-antimicótico) y se añade insulina a la misma concentración que la empleada durante la estimulación adipogénica (5 μ g/ml). Este proceso de renovación se repite en el mismo intervalo temporal hasta que se considera que se produce por completo la diferenciación a adipocitos, que ocurre a los 7 días tras la inducción.

1.2. Tratamientos *in vitro* de cultivos celulares.

Con el objetivo de validar fenotípicamente la diana seleccionada, es decir, PI3K, se selecciona un grupo de moléculas pequeñas cuya actividad inhibitoria sobre la misma es conocida.

La observación de cambios fenotípicos se lleva a cabo a partir de la presencia de adipogénesis en cultivos celulares de C3H10T1/2 tratados con los compuestos que se exponen a continuación.

Las células C3H10T1/2 se cultivan en placas Greiner negras de fondo transparente (Cell Carrier) de 96 pocillos. Se cultivan 10000 células con el medio expuesto con anterioridad (DMEM Glutamax™ suplementado con FBS 10099 y 1% A-A) y, siguiendo el protocolo de diferenciación tal y como se ha explicado, se induce la adipogénesis. No obstante, en este caso no se lleva a cabo el tratamiento de los pocillos con rosiglitazona (1 μ M).

En el mismo momento que se induce la adipogénesis en todos los pocillos de las placas correspondientes, se lleva a cabo el tratamiento con los compuestos inhibidores de PI3K

seleccionados. En primer lugar, se lleva a cabo una inspección visual para observar si se produce diferenciación al microscopio. Posteriormente, se confirman dichas observaciones y se llevan a cabo nuevos ensayos (hasta 3 repeticiones para confirmar los datos) así como el análisis de adipogénesis según el siguiente diseño:

En una de las columnas de pocillos de la placa de 96 incluye un control negativo sin diferenciación a adipocitos, es decir, de fibroblastos C3H10T1/2. Para ello se emplea el medio de mantenimiento ya descrito: DMEM Glutamax™ suplementado con un 10% de FBS 9665 y un 1% de A-A.

En otra de las columnas se tiene un control negativo de adipogénesis con el medio de diferenciación (DMI): DMEM Glutamax™ suplementado con un 10% de FBS 10099 y un 1% de A-A, y los inductores insulina (5 µg/ml), IBMX (0,5 mM) y dexametasona (1 µM). Una vez transcurren dos días, como se ha explicado con anterioridad, se renueva el medio y los suplementos pero no se añade IBMX ni dexametasona (sólo insulina a 5µg/ml). Este proceso de inducción y renovación del medio se lleva a cabo en todas las columnas de la placa (exceptuando la columna de control negativo).

A estas columnas también se les añade el disolvente DMSO a una concentración del 0,1% (dimetil sulfóxido de Sigma-Aldrich) para poder comparar con exactitud este control con los tratamientos con las moléculas que se presentan a continuación, ya que es el vehículo de las mismas.

El control positivo de diferenciación (con un 100% de adipocitos) se dispone en la columna 3. Se trata del medio de diferenciación anteriormente expuesto (DMI) al que se le añade rosiglitazona a una concentración de 10 µM.

El tratamiento *in vitro* con los compuestos inhibidores de PI3K se lleva a cabo desde el primer día de diferenciación (al mismo tiempo que se induce con el medio DMI) y se renueva al mismo tiempo que se refresca el medio. Todos estos compuestos se obtienen de MedchemExpress.

La columna 4 se trata con DMI y TGX-221 a la concentración de 10 µM (se prepara a una concentración de 10 mM en el disolvente DMSO). Es un inhibidor selectivo potente de la isoforma p110β de PI3K^(84,85).

La columna 5 se trata con DMI y BYL-719 a la concentración de 10µM (se disuelve en DMSO). Es un inhibidor selectivo de la isoforma p110α de PI3K⁽⁸⁶⁾.

La columna 6 se trata con DMI y CAL-101 a la concentración de 10 μ M (se disuelve en DMSO). Es un inhibidor selectivo de la isoforma p110 δ de PI3K ⁽⁸⁷⁾.

La columna 10 se trata con DMI y IC-87114 a la concentración de 10 μ M (se disuelve en DMSO.) Es un inhibidor selectivo de la isoforma p110 δ de PI3K ^(69,84).

La columna 11 se trata con DMI y PIK-75 a la concentración de 10 μ M (se disuelve en DMSO). Es un inhibidor selectivo de la isoforma p110 α ^(84,88).

2. TINCIONES Y TOMA DE IMÁGENES DE ACUMULACIÓN LIPÍDICA

Tras haber llevado a cabo un proceso de inducción de adipogénesis con los medios adecuados y los compuestos de interés, se valora la actividad adipogénica de estos últimos una vez transcurridos los siete días necesarios para completar el proceso. Para ello se emplea el análisis de imagen mediante microscopía de fluorescencia.

De esta manera, las células se tiñen con los colorantes fluorescentes Hoechst 33342 y AdipoRed, los cuales proceden de Thermo-Fisher y Celta ingenieros, respectivamente.

Hoechst 33342 es un colorante fluorescente con afinidad por las estructuras nucleares, concretamente se une a las dobles cadenas de ácidos nucleicos (ADN) y emite fluorescencia azul ⁽⁸⁹⁾. La emite a una longitud de onda de 461 nm (la longitud de onda de excitación es de 350 nm).

AdipoRed es una solución hidrofóbica de la tinción Rojo Nilo (*Nile Red*) optimizada para la emisión de fluorescencia ⁽⁹⁰⁾. Se trata de un colorante lipofílico, por lo que se fija a los triglicéridos de las gotas lipídicas con elevada afinidad. Emite fluorescencia roja a una longitud de onda de 572 nm (la longitud de onda de excitación es de 485 nm) ⁽⁹¹⁾. También se pueden emplear las longitudes de onda de la fluoresceína (485/535 nm), de forma que se observa fluorescencia verde.

Para proceder a la tinción de las placas de cultivo celular tratadas con los inhibidores de PI3K, en primer lugar se retira el medio de cultivo y se lavan con DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) obtenido de Sigma-Aldrich. Esto debe hacerse con precaución, empleando puntas estrechas de pipeta Pasteur, dada la inestabilidad de los adipocitos presentes en la monocapa. En segundo lugar,

se añade paraformaldehído al 4% para la fijación de las células (previa filtración y preparación a partir de paraformaldehído 95% de Sigma-Aldrich), incubando el sistema 20 minutos a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se retira este compuesto y se lava con DPBS. A continuación, se añade una preparación de los colorantes fluorescentes diluidos 1:4000 en DPBS (10 ml) y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se retira la tinción y se lee la fluorescencia de la placa de cultivo o bien se conserva protegida de la luz y a 4°C hasta su análisis (de manera que se preserve la señal fluorescente).

Una vez se dispone de las placas de cultivo teñidas con los colorantes mencionados, se procede a su análisis. De esta manera, se toman imágenes y se cuantifica la señal fluorescente correspondiente a los acúmulos lipídicos de los adipocitos, que se encuentran marcados por AdipoRed. Para ello se emplea el equipo Operetta (microscopio de fluorescencia) y el software Harmony, de PerkinElmer.

Las imágenes proceden de los canales de fluorescencia de Hoechst y fluoresceína (que se puede emplear en la detección de AdipoRed, como ya se ha mencionado con anterioridad), y también se emplea la microscopía de campo claro, Bright-field. Así pues, se obtiene una imagen general de las células presentes en cada pocillo, se detectan sus núcleos (Hoeschst 33342) y se marcan los lípidos presentes en los adipocitos diferenciados (AdipoRed).

Asimismo, se realiza un análisis cuantitativo de los lípidos acumulados, efectuado en el software Harmony. Para ello, se seleccionan los núcleos celulares a partir de las tinciones con Hoechst 33342. Así, es posible identificar el citoplasma correspondiente a cada célula. A continuación, se establece un umbral de señal fluorescente correspondiente a la intensidad de los lípidos teñidos con AdipoRed para distinguir las células que se consideran positivas, es decir, los adipocitos, de los fibroblastos o células indiferenciadas. Para el diseño de los gráficos y el análisis estadístico de los datos se emplea el programa GraphPad Prism 5.

3. LIPÓLISIS. UN ENSAYO FUNCIONAL

Se emplea un ensayo funcional celular de lipólisis para conocer si la actividad adipogénica observada en el análisis de fluorescencia tras el tratamiento de las células C3H10T1/2 con los compuestos inhibidores de PI3K se debe a la inhibición de este proceso metabólico celular o si es consecuencia directa de una inducción de la lipogénesis.

Para poder desarrollar este ensayo de lipólisis se precisan adipocitos diferenciados. Para ello, se siembran 50000 células C3H10T1/2 en placas de 6 pocillos (medio de cultivo DMEM Glutamax™ suplementado con un 10% de FBS 9665 (Sigma-Aldrich) y un 1% de A-A). Una vez alcanzan la confluencia, se esperan dos días para comenzar el proceso de diferenciación descrito anteriormente. A los siete días tras la inducción se obtienen adipocitos completamente diferenciados.

Una vez se obtienen los adipocitos, se retira el medio de mantenimiento de la diferenciación y se añade un medio sin lípidos: DMEM Glutamax™ suplementado con un 2% de BSA libre de ácidos grasos (albúmina sérica bovina; *bovine serum albumin fraction V, fatty acid free* procedente de Roche) y un 1% de A-A. Se emplea BSA libre de ácidos grasos dado que la albúmina se une a estos compuestos y a otros lípidos (función de transporte en el organismo). Así, este suplemento permite que cuando se realice la detección de los lípidos liberados al medio se pueda afirmar que su presencia se debe a la actividad de las células adipocitarias y no a compuestos ya presentes en el medio de cultivo.

Al día siguiente de la introducción del medio sin lípidos en las células, se lleva a cabo el tratamiento de con los inhibidores de PI3K: CAL-101 e IC-87114 a concentraciones de 10 μ M en ambos casos.

Los controles negativos del ensayo de lipólisis consisten en el tratamiento de uno de los pocillos de la placa con insulina a la concentración de 5 μ g/ml y otro de los pocillos con WWL-229 a 10 μ M, compuesto obtenido de Sigma-Aldrich. La inhibición de la lipólisis es una conocida acción de la insulina⁽⁹²⁾. Una acción que conduce al incremento del almacenamiento de lípidos y a la disminución de la liberación de ácidos grasos a sangre. La transducción de la señal intracelular resultante de la unión a su receptor (IR) a través de las vías PI3K y Akt y la activación de la fosfodiesteras 3B llevan a una inhibición de PKA que resulta en una disminución de la actividad (mediante fosforilación) de la HLS (*hormone-sensitive lipase*) y de la hormona perilipina 1⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

WWL-229 es un compuesto inhibidor de la lipólisis basal que induce la diferenciación a adipocitos y la acumulación de lípidos. Se trata de un inhibidor selectivo de las serín hidrolasas implicadas en la lipólisis: carboxilesterasa 3 (Ces 3) en ratones y CES1 en humanos ⁽⁹⁶⁾.

El control negativo sin compuesto del ensayo se hace con el tratamiento de otro de los pocillos de la placa con DMSO a una concentración del 0,1%, ya que es el vehículo empleado para la disolución de los compuestos de tratamiento.

Para observar la actividad lipolítica de los adipocitos expuestos a los anteriores compuestos se realiza una inducción de este proceso metabólico en una placa de ensayo de 6 pocillos diferente, aunque tratada de igual forma en el caso anterior. Así, se añade el agonista adrenérgico β no selectivo isoproterenol (Sigma-Aldrich), a una concentración de 10 μ M. Se trata de un inductor de la lipólisis a través de la estimulación de la adenilato ciclasa (y consecuente aumento de AMPc) característica de sus receptores adrenérgicos (acoplados a proteínas Gs) ⁽⁹²⁾. Su mecanismo lipolítico no depende de la activación directa de la HSL ^(97,98).

Una vez realizados los tratamientos con los inhibidores de PI3K y la inducción de la lipólisis se esperan 24 horas para hacer el análisis del proceso. Para ello se emplea un kit de ensayo colorimétrico de determinación espectrofotométrica. El ensayo incluye los reactivos: Free Glycerol Reagent, Triglyceride Reagent y Glycerol Standard Solution (Sigma-Aldrich).

El fundamento de este ensayo consiste en una hidrólisis enzimática de los triglicéridos por una lipasa (lipoproteinlipasa), que lleva a la liberación de glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol producido se mide mediante una serie de tres reacciones enzimáticas que conduce a la generación de un producto indicador (quinoneimina) que presenta un máximo de absorbancia a 540 nm. Concretamente, el glicerol resultante de la hidrólisis de los triglicéridos se fosforila como consecuencia de la acción de la enzima glicerol kinasa sobre ATP. El consiguiente glicerol fosfato se oxida por la glicerol fosfato oxidasa a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno, el cual, en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa, produce el cromógeno quinoneimina ⁽⁹⁹⁾.

El incremento que se pueda producir en la absorbancia será directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra. Estas lecturas de absorbancia se llevan a cabo en el lector de placas Infinite M1000 (TECAN).

Para proceder a la determinación de la concentración real de triglicéridos en cada uno de los pocillos se diseña una placa de ensayo de 96 pocillos, cuya absorbancia se leerá en el espectrofotómetro. Se

preparan y atemperan los reactivos. Se añaden 10 µl de blanco (agua destilada), de cada pocillo de la placa de 6 tratada con anterioridad por duplicado y de muestras de concentración conocida de triglicéridos en dilución seriada de Glycerol Standard a su pocillo correspondiente. La concentración de triglicéridos del reactivo Glycerol Standard es de 2,5 mg/ml, que se diluye diez veces en el pocillo con mayor concentración de la curva patrón.

A continuación, se pipetea 80 µl de Free Glycerol Reagent en cada pocillo y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se lee la absorbancia de la placa en espectrofotómetro a 540 nm, que se definirá como “absorbancia inicial” (*initial absorbance* (IA)). Posteriormente, se añaden 20 µl de Triglyceride Reagent en cada pocillo, mezclado este reactivo con el contenido ya presente. La placa se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se lee la absorbancia de la misma, en este caso, “absorbancia final” (*final absorbance* (FA)).

Finalmente, una vez obtenidos los valores de absorbancia de las dos lecturas de la placa de ensayo de 96 pocillos se procede al cálculo de la concentración real de triglicéridos en cada muestra. Para ello, se emplea la siguiente ecuación:

$$\frac{FA_{\text{muestra}} - (IA_{\text{muestra}} \times F)}{FA_{\text{estándar}} - (IA_{\text{blanco}} \times F)} \times \text{Concentración de estándar} \quad \text{Donde } F = \frac{0,81}{1,01} = 0,80$$

Para el diseño de los gráficos y el análisis estadístico de los datos se emplea el programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

4. ADIPOGÉNESIS

Tras haber realizado el proceso de diferenciación de las células C3H10T1/2 a adipocitos en presencia de los compuestos inhibidores de PI3K y sus correspondientes controles se pueden observar los cambios producidos en las placas de cultivo de 96 pocillos. La actividad adipogénica diferencial se valora una vez completados los siete días necesarios para este proceso.

Así pues, en un microscopio invertido de campo claro pueden apreciarse los cambios morfológicos típicos de la adipogénesis (**Figura 1**). Mientras que en el control negativo sin medio de diferenciación se aprecian las características propias de los preadipocitos, en el control positivo con rosiglitazona y, en menor medida, en los pocillos tratados con los inhibidores de PI3K, se observa con claridad la morfología de los adipocitos. De esta manera, los preadipocitos pierden su forma típica poligonal, de citoplasma alargado y con múltiples prolongaciones, a favor de una morfología redondeada, con acumulación de un importante número de gotas lipídicas en el citoplasma.

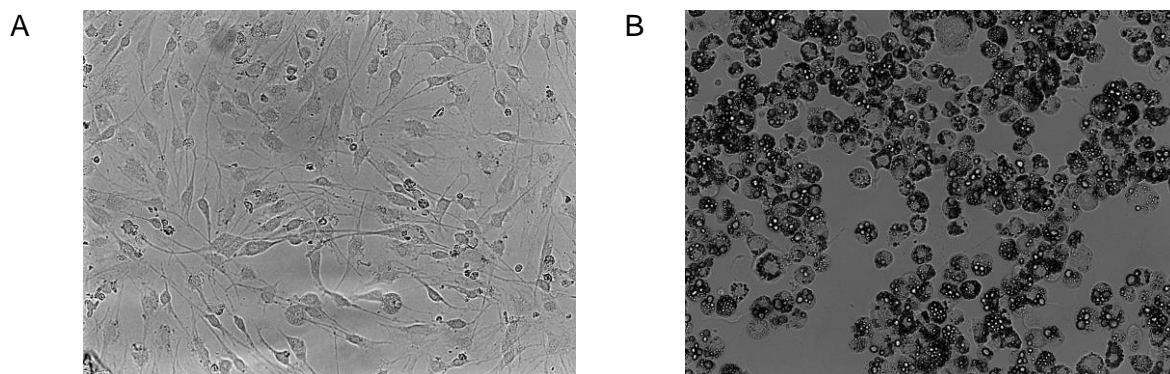


Figura 1. Adipogénesis en células C3H10T1/2.

- A) Fibroblastos C3H10T1/2 cultivados en medio DMEM Glutamax™ suplementados con FBS 9665 y A-A. Se observa su morfología típica poligonal, con citoplasma alargado y múltiples prolongaciones.
- B) Adipocitos tras inducción de adipogénesis en células C3H10T1/2 en medio DMEM Glutamax™ suplementados con FBS 10099 y A-A y tratados con dexametasona, IBMX, insulina y rosiglitazona. Destaca su morfología redondeada, con acumulación de abundantes gotas lipídicas en el citoplasma.

5. LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE PI3K PRODUCEN UN EFECTO PROADIPOGÉNICO

Las diferencias en el proceso de inducción de adipogénesis entre los compuestos inhibidores de PI3K empleados y los controles se analizan con mayor detalle a partir de las placas de 96 pocillos en las que se llevaron a cabo las tinciones fluorescentes explicadas con anterioridad. Así, se realiza un análisis de imagen mediante microscopía de fluorescencia con las tinciones de Hoechst 33342 y AdipoRed, que permiten el marcado de los núcleos celulares y de los lípidos de los depósitos adipocitarios, respectivamente. Se emplea el objetivo 20xWD del equipo Operetta para obtener las imágenes y analizar la acumulación lipídica (**Figura 2**).

En la columna control negativo de la placa de 96 pocillos tratada con el medio de mantenimiento DMEM Glutamax™ suplementado con un 10% de FBS 9665 y un 1% de A-A, no se produce ningún signo de diferenciación a adipocitos. Así pues, en el campo claro (Bright-field) se observa la morfología propia de los fibroblastos ya mencionada, los núcleos se tiñen con Hoechst 33342 y en el campo de la fluoresceína (AdipoRed) no se marcan las gotas de triglicéridos propias de los adipocitos, ya que no están presentes.

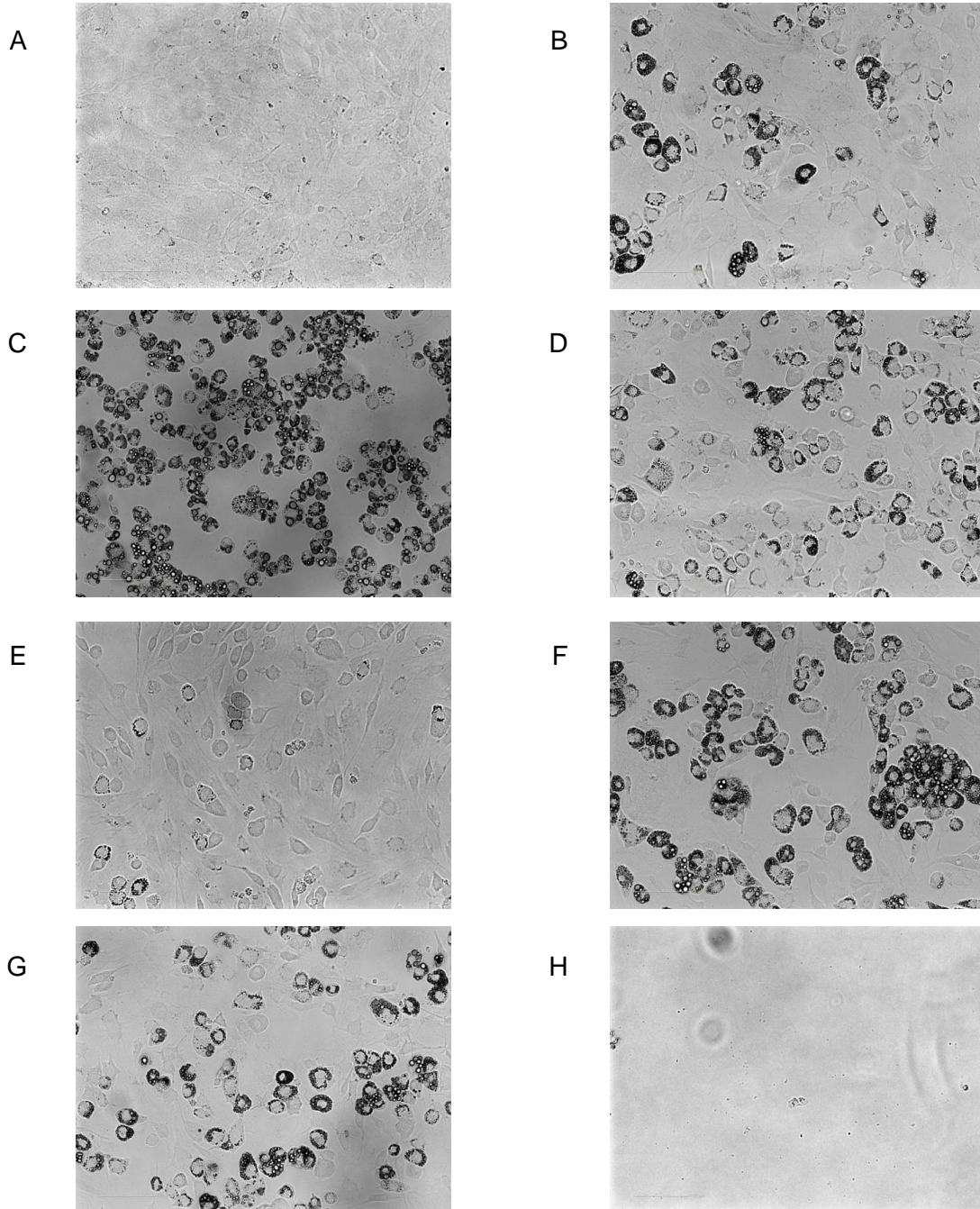
En el caso del control con el medio de diferenciación DMI al que se le añade DMSO, se puede observar actividad adipogénica residual, en bajo porcentaje, resultante de la inducción de la adipogénesis propia del medio empleado. Por consiguiente, se observa la presencia de células con morfología de fibroblastos junto con adipocitos, pudiendo distinguirlas ya en campo claro pero con mayor facilidad con la tinción AdipoRed, que permite una mayor sensibilidad.

La columna tratada con el control positivo de diferenciación, es decir, con el medio de diferenciación DMI junto con rosiglitazona 10 μ M, se observa el máximo número de adipocitos. De esta manera, sus características morfológicas se aprecian en el campo claro y con mayor selectividad en el campo de tinción de AdipoRed, que permite observar la gran presencia de lípidos en todos los adipocitos diferenciados. Por ello, la intensidad de fluorescencia emitida es la mayor de toda la placa de ensayo.

Los pocillos tratados con los compuestos inhibidores de PI3K muestran distintos porcentajes de adipogénesis situados entre el control negativo con DMSO y el control positivo. De esta manera, el análisis visual de la intensidad de la señal de AdipoRed (así como la morfología observada en Bright-field) permite establecer diferencias entre los inhibidores de PI3K: IC-87114 y CAL-101 son los inhibidores de PI3K que inducen una mayor diferenciación a adipocitos, seguidos por el porcentaje

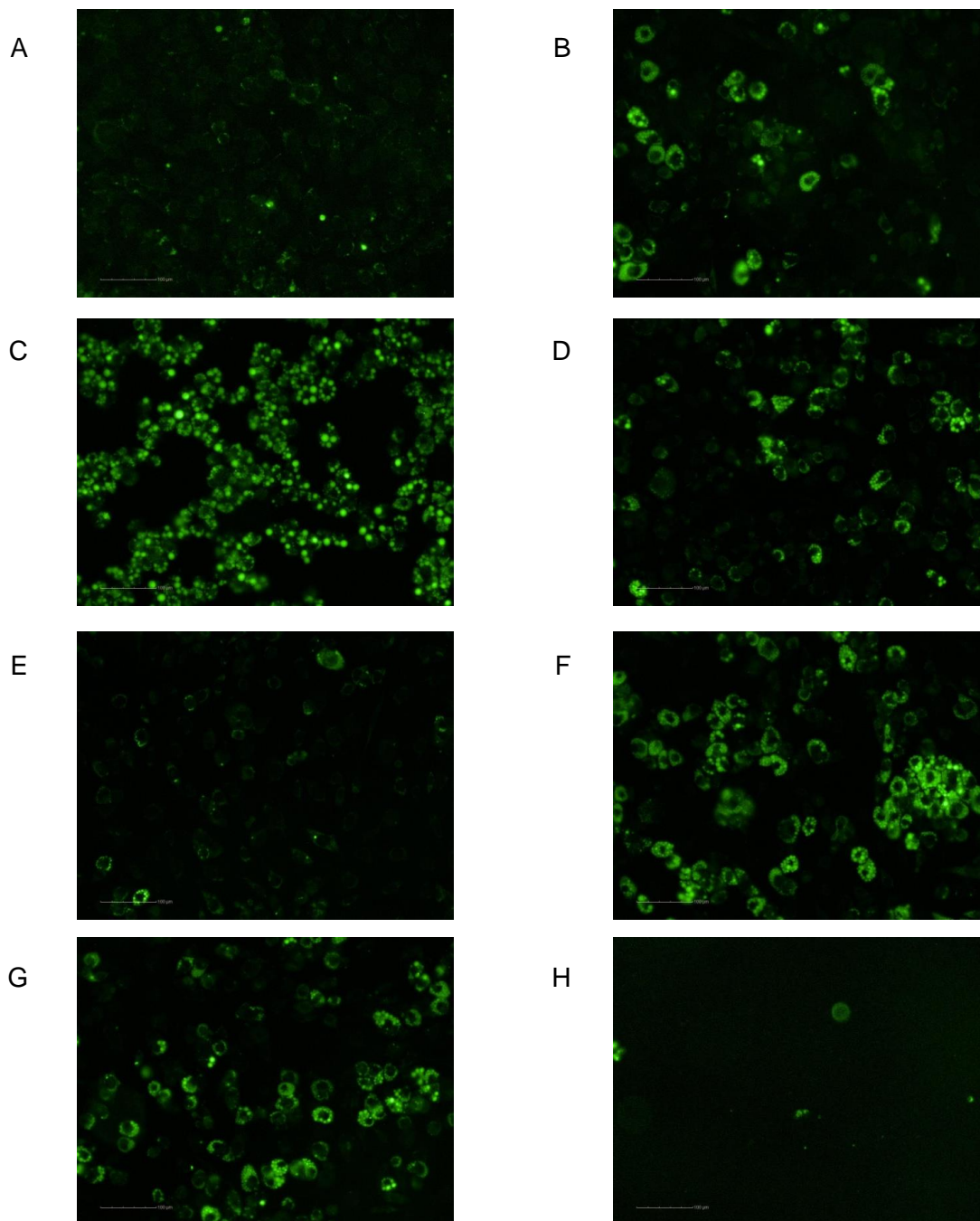
de diferenciación de TGX-221 y, por último, BYL-719, que no muestra una mayor inducción de la diferenciación que el control negativo con DMSO. Por otro lado, PIK-75 a la concentración de 10 μ M produce toxicidad a las células C3H10T1/2, de forma se activan procesos de muerte celular observables a los dos días de tratamiento con este compuesto (**Figura 2**).

Bright-field (microscopía de campo claro)



AdipoRed

Colorante fluorescente con elevada afinidad por las gotas lipídicas situadas en el citoplasma de los adipocitos: marcaje de las células C3H10T1/2 diferenciadas



Hoechst 33342

Colorante fluorescente con afinidad por los ácidos nucleicos presentes en el núcleo de las células:
marcaje nuclear de las células C3H10T1/2.

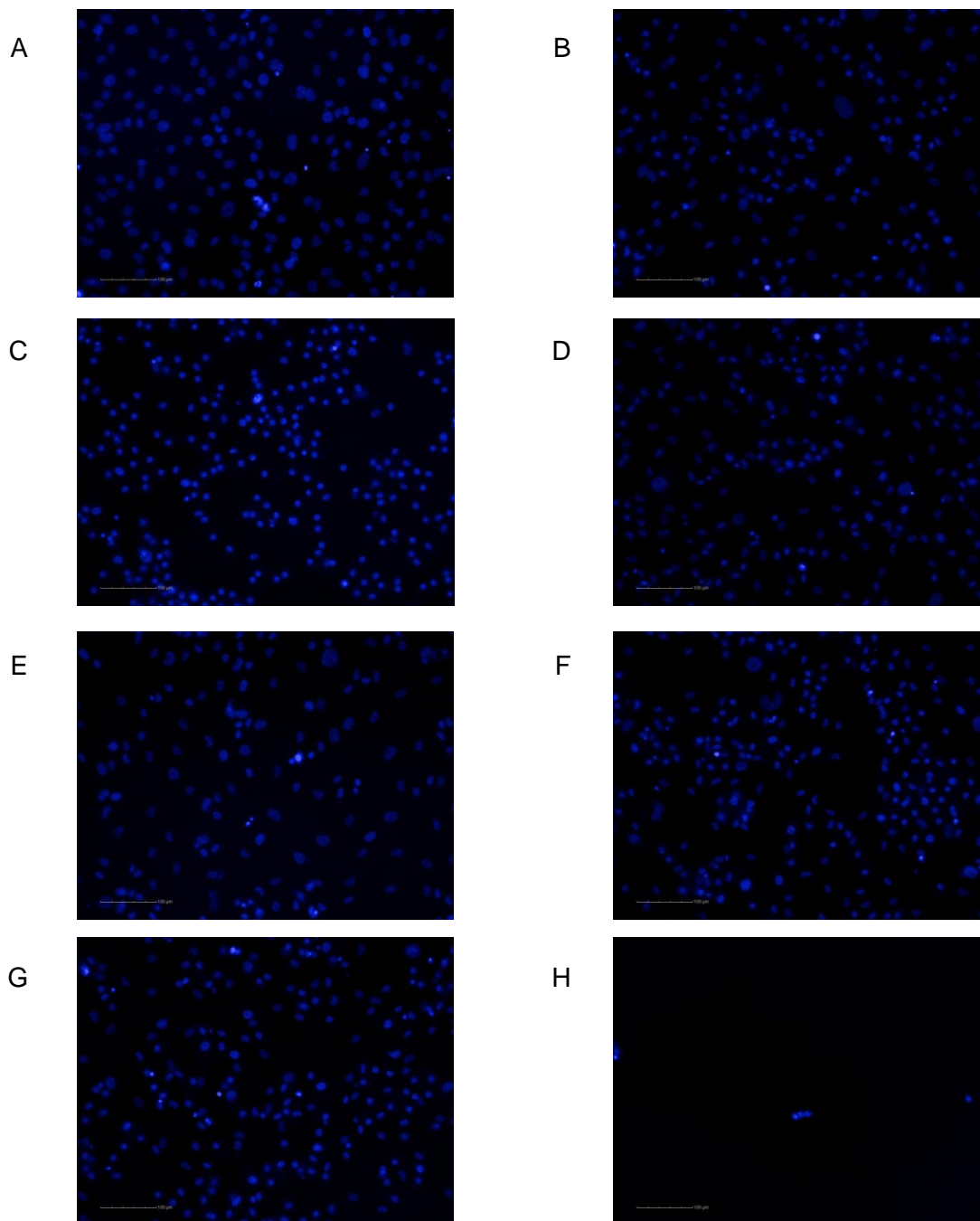


Figura 2. Imágenes de acumulación lipídica en tratamiento de células C3H10T1/2 con compuestos inhibidores de PI3K. Bright-field, AdipoRed y Hoechst 33342. Fotos con objetivo 20xwd del equipo Operetta.

- A) Preadipocitos: control negativo con fibroblastos C3H10T1/2. No se desarrolla adipogénesis.
- B) DMSO: control negativo con el vehículo DMSO. Existe un bajo porcentaje de adipogénesis.
- C) Rosiglitazona: control positivo con rosiglitazona. Todas las células C3H10T1/2 completan su diferenciación a adipocitos.
- D) TGX-221: inhibidor de la isoforma p110 β de PI3K que produce un porcentaje de adipogénesis observable mayor que el control negativo con DMSO.
- E) BYL-719: inhibidor de la isoforma p110 α de PI3K que no mejora el grado de adipogénesis conseguido con el control negativo con DMSO.
- F) CAL-101: inhibidor de la isoforma p110 δ de PI3K con actividad proadipogénica significativamente mayor que el control negativo con DMSO.
- G) IC-87114: inhibidor de la isoforma p110 δ de PI3K con actividad proadipogénica significativamente mayor que el control negativo con DMSO.
- H) PIK-75: inhibidor de la isoforma p110 α de PI3K que produce toxicidad (muerte celular: no se observan células).

El análisis cuantitativo de los lípidos acumulados se lleva a cabo mediante un método de High Content Screening (HCS) basado en imagen y de cuantificación de la señal de fluorescencia de AdipoRed. El umbral de señal fluorescente para considerar las células positivas es de 275, establecido a partir de la media de intensidad de fluorescencia del citoplasma de los pocillos pertenecientes al control negativo con DMSO. Esta intensidad se determina a partir de la población de células seleccionadas mediante sus núcleos, es decir, mediante el marcaje con Hoechst 33342, y la determinación de su citoplasma partiendo de dicha selección nuclear. Es dentro de la región citoplasmática de las células donde se determina la señal fluorescente (**Figura 3**). Para poder llevar a cabo este proceso, el software Harmony permite seleccionar los campos horizontales y planos verticales de cada una de las imágenes tomadas por el microscopio de fluorescencia (Operetta), de forma que ésta presente la mayor nitidez posible.

Dicho umbral de señal fluorescente permite la distinción entre las células que se consideran positivas, es decir, los adipocitos, de las células negativas o preadipocitos indiferenciados. En los pocillos control positivo con rosiglitazona se considera que se produce un 100% de diferenciación ($p < 0.0001$). De este modo, los pocillos tratados con medio de mantenimiento suponen un control negativo absoluto de diferenciación, en el que no se observa ningún adipocito.

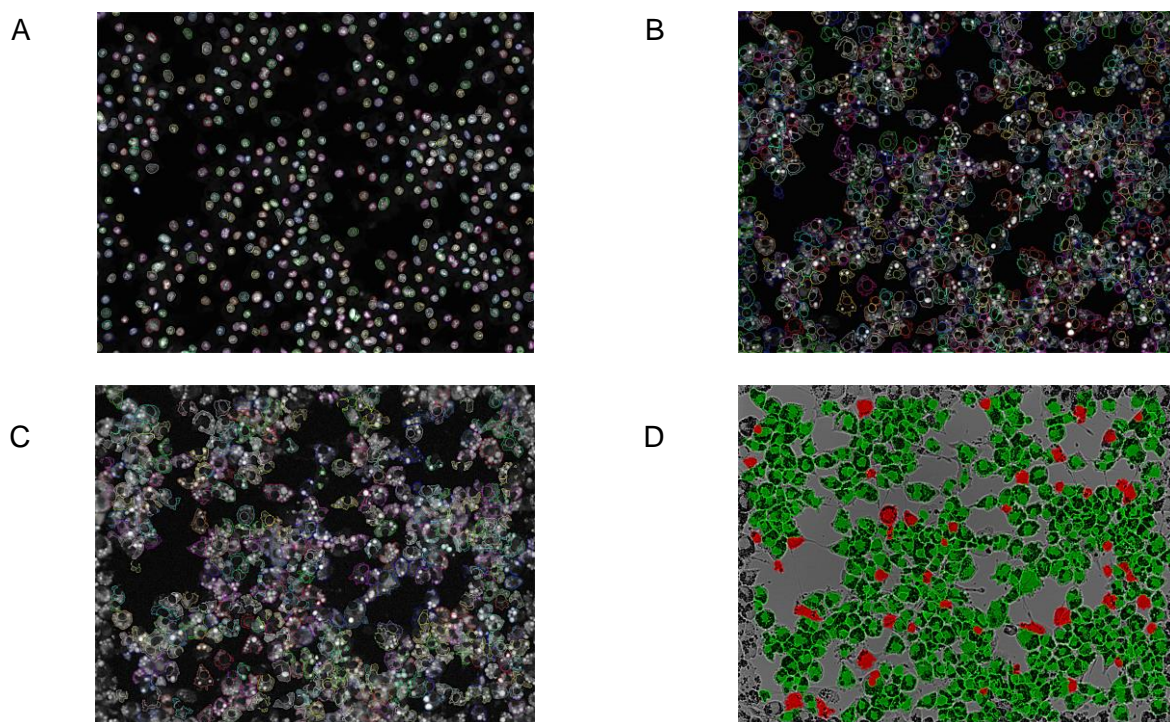


Figura 3. Análisis cuantitativo de adipogénesis en células C3H10T1/2 en formato HCS (software Harmony).

- A) Identificación de los núcleos celulares a partir de su tinción fluorescente con Hoechst 33342.
- B) Identificación del citoplasma de cada célula cuyo núcleo se ha seleccionado en A.
- C) Intensidad de fluorescencia de AdipoRed citoplasmática en las células seleccionadas.
- D) Células C3H10T1/2 positivas (adipocitos diferenciados). Se les atribuye esta cualidad a aquellas cuya intensidad de fluorescencia de AdipoRed en el citoplasma supera el umbral establecido.

Así pues, en relación al análisis cuantitativo del número de células positivas (adipocitos marcados con AdipoRed), se observan las diferencias mencionadas en la inspección visual de las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia (**Figura 4**). IC-87114 es el inhibidor de PI3K que induce una mayor diferenciación a adipocitos, de forma que el número de células consideradas positivas es mayor que el control, con una diferencia estadísticamente significativa sobre la inducción con el control negativo con DMSO ($p < 0,05$; $p = 0,0115$), que supone un 40,5% (para el análisis se emplea el estadístico t de Student). Ocurre algo similar con el tratamiento de las células C3H10T1/2 con CAL-101, con una diferencia significativa sobre el control ($p < 0,05$; $p = 0,0216$) y un porcentaje del 39,5%. El inhibidor TGX-221 da lugar a un número de adipocitos mayor que el control negativo en un 20,84%, tendencia que se confirma con el análisis visual de la tinción con AdipoRed, pero no es estadísticamente significativa con respecto al control negativo ($p = 0,334$). El inhibidor de PI3K BYL-

719, no supone una inducción de la adipogénesis mejor que el control negativo, lo que se refleja en que no existe un mayor número de células positivas o adipocitos.

Una vez analizada la capacidad proadipogénica de cada uno de los compuestos inhibidores de PI3K se pueden considerar los compuestos IC-87114 y CAL-101 como *hits*, ya que su empleo en modelos celulares C3H10T1/2 produce un fenotipo adipogénico de interés.

Este resultado con IC-87114 y CAL-101 diferencial con respecto a otros inhibidores de PI3K puede atribuirse a que ambos son inhibidores selectivos de la isoforma p110 δ y, en consecuencia, que ésta podría ser más relevante en la inducción de adipogénesis que las isoformas p110 α o β (inhibidas por BYL-719 y TGX-221).

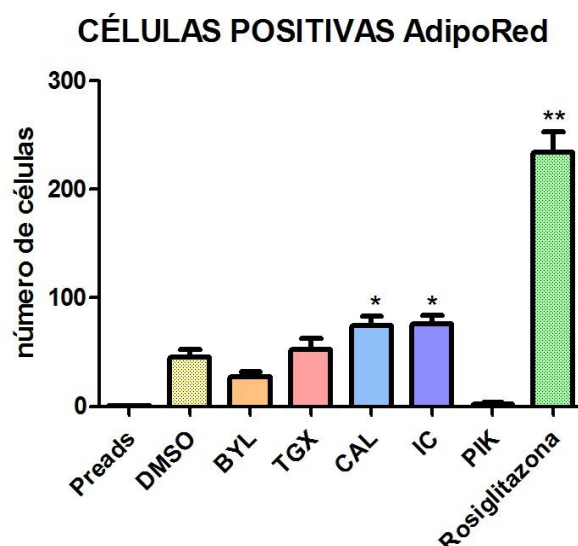


Figura 4. Análisis del número de células diferenciadas a adipocitos en el tratamiento con inhibidores de PI3K (células positivas).

Se muestra el número de células positivas (adipocitos) tras la diferenciación de la línea C3H10T1/2. Para ello se emplea un análisis de imagen y cuantificación de intensidad de fluorescencia de la tinción AdipoRed en cada uno de los tratamientos, que permite marcar las gotas lipídicas propias de los adipocitos y seleccionar el umbral de fluorescencia para considerarlas positivas (**Figura 3**). Los preadipocitos (Preads) representan el control negativo: células indiferenciadas. DMSO es el vehículo de los compuestos inhibidores de PI3K: se tratan C3H10T1/2 con el mismo para establecer un control negativo. Rosiglitazona lleva a la diferenciación del 100% de las células (control positivo). Las moléculas inhibitoras de PI3K BYL-719 (BYL), TGX-221 (TGX), CAL-101 (CAL), IC-87114 (IC) y PIK-75 (PIK) conducen a distinto número de células positivas, es decir, porcentaje de diferenciación (PIK-75 produce toxicidad celular).

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ son diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo con DMSO según el test t de Student de dos colas.

6. INHIBICIÓN DE LA LIPÓLISIS MEDIADA POR INHIBIDORES DE PI3K

Como ya se ha explicado con anterioridad, el ensayo funcional de lipólisis desarrollado permite conocer si la actividad adipogénica observada en los *hits* resultantes del análisis de imagen por microscopía de fluorescencia se debe a una inhibición del proceso metabólico celular de lipólisis o, por el contrario, a una inducción del proceso de lipogénesis. De esta manera, se seleccionan los compuestos inhibidores de PI3K que producen un fenotipo adipogénico más relevante, los *hits*: IC-87114 y CAL-101.

Una vez realizado el mencionado ensayo de lipólisis, se analizan los resultados de la concentración real de triglicéridos de cada muestra, resultante de la lectura de absorbancia de la placa de 96 pocillos, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{FA_{\text{muestra}} - (IA_{\text{muestra}} \times F)}{FA_{\text{estándar}} - (IA_{\text{blanco}} \times F)} \times \text{Concentración de estándar} \quad \text{Donde } F = \frac{0,81}{1,01} = 0.80$$

El valor de absorbancia final del estándar ($FA_{\text{estándar}}$) es de 0,502, el valor de absorbancia inicial del blanco (IA_{blank}) es 0,046, y la concentración de patrón (estándar) de 0,25.

Se observan diferencias significativas en la concentración de triglicéridos en el medio entre los pocillos del control basal de lipólisis realizado con el vehículo DMSO y los pocillos del mismo nivel basal pero a los que se les ha inducido el proceso de lipólisis mediante isoproterenol a la concentración de 10 μM 24 horas antes de realizar la medición de absorbancia. En consecuencia, se puede establecer que las diferencias observadas en los valores de triglicéridos pre y postinducción son estadísticamente significativas ($p = 0.001$, $p < 0.05$) y, por lo tanto, que se ha inducido de modo correcto el proceso de lipólisis (para el análisis se emplea el estadístico t de Student). Así pues, la concentración de triglicéridos más elevada encontrada en el sobrenadante del medio de cultivo celular se debe a una inducción del proceso lipolítico en los adipocitos (**Figura 5R**).

Con respecto a los controles negativos de lipólisis, es decir, con los compuestos inhibidores de este proceso metabólico insulina y WWL-229, no se observa una actividad inhibidora de la lipólisis en las placas basales, es decir, en las que no ha habido inducción lipolítica. De este modo, WWL-229 sí muestra una tendencia hacia una concentración de triglicéridos menor que el control basal de

lipólisis con DMSO (que implicaría una menor liberación de estos lípidos como consecuencia de una disminución del proceso de lipólisis), manifestada como un porcentaje menor en un 38,24% pero la diferencia existente entre dicha concentración no es estadísticamente significativa ($p = 0,0725$). En el caso de la insulina, esta concentración de triglicéridos en el estado basal no se presenta como menor que en el control con DMSO (lo que se refleja en un valor $p > 0,05$). En el caso de que los pocillos de los controles negativos se induzcan con isoproterenol, la insulina muestra una acción inhibidora de la lipólisis manifestada como una reducción de la concentración de triglicéridos significativa desde el punto de vista estadístico ($p = 0,0137$), que representa un porcentaje de 26,11%. Sin embargo, a pesar que con WWL-229 se aprecia esa misma tendencia (manifestada por un porcentaje de reducción de la concentración lipídica del 27,94%) la diferencia observada con DMSO no es significativa ($p = 0,0865$) (**Figura 5**).

Ocurre algo similar con los compuestos inhibidores de la diana PI3K, IC-87114 y CAL-101. Así pues, en ambos casos no se observa diferencia en la concentración de triglicéridos en las placas basales (no inducidas con isoproterenol) con respecto al control basal con DMSO. En el caso de la inducción de la lipólisis, sí se manifiesta una cierta tendencia (más marcada en el caso de CAL-101) en la inhibición de este proceso con respecto al control inducido DMSO, con porcentajes de diferencia en las concentraciones de triglicéridos de un 4,48% en IC-87114 y un 15,83% en el caso de CAL-101. Sin embargo, dicha diferencia no resulta estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (**Figura 5**).

Por lo tanto, puede observar que existe una tendencia a la inhibición del proceso de lipólisis por parte de los compuestos inhibidores de PI3K IC-87114 y CAL-101. Dicha inhibición se manifiesta como una reducción de la liberación de triglicéridos al medio donde se cultivan los adipocitos tratados con estos compuestos, y resulta marcada cuando se produce una inducción de la lipólisis por parte un agente externo, como es el isoproterenol.

Dado que la insulina es un inhibidor de la lipólisis y PI3K participa en el inicio de su vía de señalización, podría esperarse que una inhibición de PI3K condujese a un incremento de este proceso. Sin embargo, este efecto inhibidor de la lipólisis puede ser propio de los compuestos IC-87114 y CAL-101, ya que el ensayo se realiza en ausencia de insulina. Por ello, no tendría necesariamente que antagonizarse el efecto antilipolítico de esta hormona.

Por otro lado, la inhibición de PI3K por parte de estos compuestos podría no ser totalmente selectiva, de forma que afecten a otras kinasas o vías de señalización intracelular que conduzcan a este efecto

inhibidor de la lipólisis. Así pues, no se produciría mediado por la acción o la ausencia de acción de la insulina.

En cualquier caso, es necesaria la realización de estudios del mecanismo de acción de IC-87114 y CAL-101 como inhibidores de la lipólisis. Asimismo, sería interesante conocer el modo en que la inhibición de PI3K afecta a la señalización celular en el proceso de lipólisis.

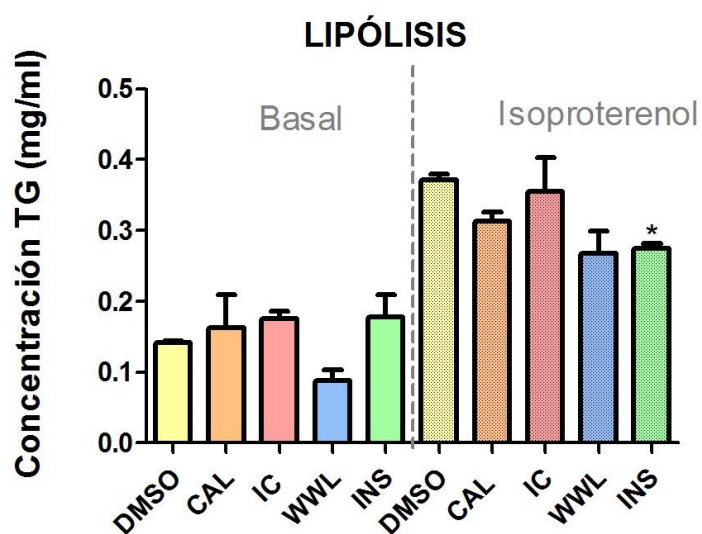


Figura 5. Ensayo de inhibición de la lipólisis.

Se muestra la concentración de triglicéridos (TG) en el medio de cultivo celular de la línea C3H10T1/2 en un ensayo de lipólisis basal y un ensayo de inducción de lipólisis mediante isoproterenol. DMSO es el vehículo de los compuestos inhibidores de PI3K (control basal). La inducción con isoproterenol (diferencia de TG en medio con DMSO y DMSO inducido) es correcta ($p < 0,01$). El control negativo realizado con WWL-229 muestra una tendencia a la inhibición de la lipólisis tanto en estado basal como inducido. La insulina (control negativo) es inhibidora de la lipólisis tras la inducción de este proceso. Las moléculas inhibidoras de PI3K CAL-101 (CAL) e IC-87114 (IC) muestran una tendencia hacia la inhibición del proceso de lipólisis cuando éste es inducido.

* $p < 0,05$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de inducción con DMSO según el test t de Student de dos colas.

DISCUSIÓN

Tras haber realizado un High Throughput Screening (HTS) de la librería de kinasas PKIS proporcionada por GSK, se ha visto el interés de la PI3K (fosfatidilinositol 3-kinasa) como diana farmacológica reguladora del metabolismo. Esto es debido a que, en los ensayos de screening en los que se emplearon compuestos inhibidores de la misma se observó que producían una actividad proadipogénica diferencial con respecto a los controles en un modelo de tejido adiposo *in vitro*. Así pues, en este trabajo se ha confirmado esta identificación y se ha comenzado el proceso de validación de la diana PI3K, así como de las moléculas de bajo peso molecular que la inhiben.

PI3K, como se ha explicado con anterioridad, es una protein kinasa encargada del inicio de la transducción de la señal de insulina en las células, tras ser fosforilada por los sustratos del receptor de insulina (IRS) al unirse esta hormona su receptor. La regulación de las acciones metabólicas de la insulina se efectúa a través de la vía PI3K/Akt. Para ello, PI3K, mediante la fosforilación de fosfolípidos de membrana, genera el segundo mensajero celular PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato).

En este trabajo se ha visto que la inhibición farmacológica de PI3K tiene un efecto proadipogénico. La inducción de la adipogénesis *in vitro* en un modelo de tejido adiposo puede entenderse como un mecanismo para mejorar este proceso metabólico y, en consecuencia, los problemas derivados de la acumulación ectópica de grasa (en músculo esquelético, hígado o páncreas) y la lipotoxicidad.

Dado el relevante papel de PI3K en la transducción de la señal del receptor de insulina, Foukas et al.⁽¹⁰⁰⁾ apuntan a que la inhibición farmacológica de la subunidad catalítica p110 α conduce a un efecto beneficioso en el metabolismo, así como a una mejora en la señalización de la insulina mediada por Akt. Establecen que dicho efecto se debe a la anulación de la regulación negativa de IRS a través de la serín fosforilación producida por distintas kinasas cuando se produce un estado de hiperinsulinemia mantenida, así como la hiperglucemia o las altas concentraciones de ácidos grasos. Así pues, en ese estudio se apunta que la inactivación parcial de p110 α en ratones de mediana edad los protege contra la resistencia a la insulina, la tolerancia a la glucosa, la acumulación de grasa, e incluso alarga ligeramente la esperanza de vida⁽¹⁰⁰⁾.

En este sentido, Ortega-Molina et al.⁽¹⁰¹⁾ indican que la inhibición de PI3K por PTEN, una fosfatasa que desfosforila los lípidos sobre los que actúa PI3K, protege a los ratones de resistencia a la insulina,

hiperglucemia y esteatosis hepática. Asimismo, incrementa el gasto energético y proponen que este efecto puede deberse a la inhibición de las rutas de retroalimentación negativas asociadas a la de la insulina⁽¹⁰¹⁾.

Por otro lado, Chattopadhyay et al.⁽¹⁰²⁾ establecen que la mutación inhibitoria de p110 α reduce la esteatosis hepática inducida por la dieta, y es posible que se produzca mediante la activación atípica de la protein kinasa C, la regulación positiva de la lipogénesis y el incremento de la captación de ácidos grasos. La esteatosis hepática es una comorbilidad frecuente en los pacientes diabéticos y obesos. Además, a pesar de la reducción de la vía de transducción de la señal insulínica, no se produce hiperglucemia⁽¹⁰²⁾.

La supresión de la isoforma catalítica p110 γ (de PI3K clase IB) mediante mutación en ratones se asocia a una mayor sensibilidad a la insulina, con una mejora en su señalización según Kobayashi et al⁽¹⁰³⁾. Además, se reduce la infiltración de macrófagos y la inflamación en los animales obesos (ya que p110 γ interviene en la migración leucocitaria mediada por citoquinas). Establecen que esa isoforma podría constituir una diana terapéutica en la resistencia a la insulina⁽¹⁰³⁾.

Sin embargo, existe la hipótesis de que, dado que la activación de la vía PI3K/Akt se necesita para que la insulina pueda llevar a cabo su acción, los inhibidores de PI3K podrían producir un efecto prodiabético, desregulando el metabolismo⁽⁴¹⁾. Esto es debido a que esta vía se encuentra dañada en la obesidad^(104,105). Así, la inhibición de la subunidad catalítica hepática p110 β en ratones, conduce a un empeoramiento de la sensibilidad a la insulina y a la tolerancia a la glucosa, a pesar de su reducido efecto sobre la fosforilación de Akt⁽¹⁰⁴⁾. Del mismo modo, la mutación inhibitoria en ratones de la subunidad p110 α hepática, conduce a resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia⁽¹⁰⁶⁾.

No obstante, los efectos derivados de la inhibición de PI3K dependen de las subunidades e isoformas sobre las que actúen los compuestos o las mutaciones. Una inhibición de la expresión mediante mutación de las subunidades regulatorias (p85, p55 y p50) de PI3K se traduce en una mejora de la sensibilidad a la insulina *in vivo*, de la tolerancia a la glucosa y de la hiperglucemia^(41,107-110). Esto se debe a que estas subunidades de PI3K estabilizan a las catalíticas e impiden la activación de la vía de transducción de la señal de insulina PI3K/Akt⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo y los estudios presentados previamente. La razón por la cual pueden existir diferencias probablemente reside en dos cuestiones

principales. En primer lugar, la inhibición farmacológica de PI3K es distinta que su inhibición mediante mutación supresora en animales transgénicos, en los que, por múltiples y diversos mecanismos compensatorios, el metabolismo puede regularse o desregularse de distinta forma que en los animales en los que se genera una supresión temporal mediante un determinado compuesto. En segundo lugar, la inhibición específica de una de las subunidades y una de las isoformas de PI3K e incluso de la propia kinasa, puede no ser selectiva, esto es, los compuestos que inhiben farmacológicamente esta diana pueden, a su vez, inhibir otras kinasas de la misma ruta de señalización o incluso de otras. Esto es debido, por un lado, a la similitud de lugar catalítico de las kinasas, el lugar de unión al ATP, que es homólogo para todas estas enzimas ⁽⁴⁵⁾. Dado que la mayor parte de los compuestos empleados son inhibidores competitivos de ATP, pueden darse problemas de selectividad. Por otro lado, la vía de transducción de la señal de insulina es muy compleja: en ella se producen múltiples procesos de fosforilación y desfosforilación (mediados por distintas kinasas) que conduce finalmente a la regulación de procesos celulares entre los que se incluyen el almacenamiento de energía, la captación de glucosa o la apoptosis celular ⁽¹¹²⁾.

En cualquier caso, los resultados de este trabajo, en el que la inhibición farmacológica de PI3K *in vitro* conduce a un fenotipo de adipogénesis y, en consecuencia, se establece como una diana de interés para el tratamiento de la obesidad y enfermedades metabólicas, se han visto confirmados *in vivo* durante la realización del mismo. Una publicación reciente relaciona la inhibición farmacológica de PI3K con un incremento del gasto energético, con protección contra la obesidad y el síndrome metabólico, y un alargamiento de la vida de ratones y monos Rhesus. Así pues, en los modelos animales se observa una reducción marcada de la adiposidad y el peso, acompañada de una disminución en la esteatosis hepática y una mejora en la tolerancia a la glucosa. Por ello, Ortega-Molina et al. ⁽¹¹³⁾ proponen que la inhibición farmacológica moderada de PI3K constituye una estrategia potencial en el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico ⁽¹¹³⁾.

La actividad proadipogénica de los inhibidores de PI3K fue cualitativamente diferente. El análisis de imagen mostró que los inhibidores de la isoforma p110 δ IC-87114 y CAL-101 indujeron una mayor diferenciación a adipocitos, con respecto al inhibidor de p110 β TGX-221 y BYL-719 y, por el contrario, el inhibidor de la isoforma p110 α PIK-75 produjo toxicidad celular ^(85,88,114-116).

Así pues, se consideraron IC-87114 y CAL-101 como compuestos *hits*, de forma que su resultado diferencial podría atribuirse a que ambos son inhibidores selectivos de la isoforma p110 δ y, en

consecuencia, que ésta podría ser más relevante en la inducción de adipogénesis que las isoformas p110 α o β (inhibidas por BYL-719 y TGX-221, respectivamente).

Estudios farmacológicos y genéticos han establecido que la subunidad p110 α , junto con la p110 β , son las predominantes en la sensibilidad a la insulina, y predomina en los tejidos diana de esta hormona. Estos resultados contrastan con los datos existentes sobre la isoforma p110 δ , que se expresa predominantemente en células de origen hematopoyético, especialmente en los leucocitos⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. La subunidad p110 β también se ha demostrado interés como diana en terapia antitrombótica⁽⁸⁵⁾.

No obstante, Chaussade et al.⁽¹¹⁴⁾ indican que la inhibición de las subunidades p110 β y δ puede tener un efecto similar sobre la sensibilidad a la insulina que la de p110 α en determinadas líneas celulares. Así pues, existe redundancia funcional entre las distintas isoformas de PI3K: el grado de redundancia depende de los niveles de expresión de cada isoforma en cada tipo celular⁽¹¹⁴⁾.

En cualquier caso, es difícil establecer los papeles concretos de las isoformas de PI3K en las distintas vías de señalización en las que participa esta kinasa, dada la falta de modelos animales disponibles y la dificultad en la obtención de inhibidores selectivos de una isoforma⁽⁸⁵⁾. Así pues, las isoformas de PI3K presentan homología en cuanto a las relaciones estructura-actividad. Así pues, los compuesto que inhiben p110 β presentan una tendencia hacia la inhibición de p110 δ más potente que a otra subunidad catalítica. Del mismo modo, los compuestos inhibidores de p110 α reconocen con mayor facilidad la estructura p110 γ ⁽¹¹¹⁾.

Debido a su papel central e inicial en la señalización de la insulina, se propone a PI3K como una posible diana alterada en la desregulación que se produce en la insulinoresistencia, una de las manifestaciones del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2. Se ha propuesto que PI3K podría alterarse directa o indirectamente en los mecanismos de resistencia a la insulina por acción de los ácidos grasos libres en sangre. Por consiguiente, conseguir su modulación farmacológica podría suponer una vía terapéutica contra las patologías metabólicas derivadas de la disfunción del tejido adiposo, como son la obesidad o la diabetes.

Hasta el momento, exceptuando a la metformina, no se han desarrollado fármacos antidiabéticos cuya diana farmacológica sean las protein kinasas. Por el contrario, la mayor parte de los antidiabéticos orales tienen su acción principal en la regulación de la hiperglucemia. A pesar de que estos fármacos presentan diversos mecanismos de acción, siguen existiendo problemas de

resistencias y tolerancia en un porcentaje importante de pacientes y, en consecuencia, constituyen una necesidad terapéutica no cubierta.

No obstante, la diabetes mellitus tipo 2 es una consecuencia de una serie de alteraciones metabólicas en diversos órganos y tejidos (no sólo en el páncreas, sino en el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo) que afectan metabolismo energético en global, y no sólo al glucídico.

De esta manera, es posible que el tejido adiposo, como uno de los actores principales en la desregulación metabólica, suponga un nuevo enfoque para el tratamiento de este tipo de patologías. Este enfoque supone concentrar los esfuerzos farmacoterapéuticos en la causa última de la patología, y no en el tratamiento de las manifestaciones como son la hiperglucemia o la dislipemia⁽¹¹⁷⁾. En el caso concreto de las protein kinasas, las vías PI3K/Akt, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) o AMPK (*AMP-activated protein kinase*) son esenciales para la homeostasis de la glucosa⁽⁴¹⁾. Su desregulación conduce frecuentemente al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. Así pues, resultan atractivas como dianas terapéuticas⁽⁴¹⁾.

Las vías PI3K/Akt, MAPK y AMPK han sido moduladas farmacológicamente con éxito en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Esto es debido a que todas ellas, así como otras vías en las que participan distintas protein kinasas, regulan otros procesos celulares además del metabolismo, como son la supervivencia celular o la proliferación⁽⁴¹⁾. Dichos procesos se encuentran alterados en las células cancerosas, que evaden los mecanismos fisiológicos de control del crecimiento y la supervivencia^(47,48).

En el caso concreto de PI3K, se ha visto que en algunos tipos de cáncer es frecuente la mutación del gen que codifica alguna de las isoformas esta kinasa, por lo que PI3K constituye una diana terapéutica oncológica^(100,104,115). Así, los inhibidores de PI3K muestran un gran interés farmacoterapéutico, debido a la común activación de PI3K en el cáncer⁽¹¹¹⁾. En este sentido, se ha aprobado recientemente el fármaco idelalisib para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica y linfoma folicular. Se trata de un inhibidor de la subunidad catalítica p110 δ de PI3K, que se encuentra hiperactivada en estas patologías oncológicas⁽¹¹⁸⁾. De hecho, esta hiperactivación es dependiente de la isoforma p110 δ , la cual permite la integración de la señalización de los receptores de membrana que promueven la proliferación maligna de las células B y su supervivencia⁽¹¹⁶⁾.

En consecuencia, dado que la vía de señalización de PI3K/Akt regula algunos procesos celulares que intervienen en el cáncer, es posible que existan problemas en la inhibición selectiva de PI3K como

diana reguladora del metabolismo. Por lo tanto, sería de interés identificar las isoformas de esta kinasa que se encuentran alteradas en el síndrome metabólico y estudiar las consecuencias de su inhibición con respecto a la proliferación celular.

Los resultados de este trabajo han demostrado la principal hipótesis: la inhibición farmacológica de PI3K conduce a un efecto proadipogénico. Esto se ha validado en un modelo celular *in vitro*, de forma que, empleando distintas moléculas inhibidoras, se ha confirmado este efecto. Asimismo, mediante un modelo de lipólisis se ha establecido la posibilidad de que estos compuestos puedan tener un efecto inhibitor de dicho proceso metabólico y, por lo tanto, que eviten la liberación de lípidos desde el tejido adiposo.

En consecuencia, se podría continuar la validación de PI3K como diana relevante en el metabolismo energético. Para ello, se puede emplear un método de quimio-proteómica, que establezca una relación causal entre la actividad enzimática de PI3K y el fenotipo proadipogénico observado cuando ésta es inhibida. De esta forma, se confirmarían definitivamente los resultados obtenidos.

Una vez hecho esto, sería posible determinar el mecanismo de acción de los inhibidores de PI3K, así como seleccionar un compuesto que resulte lo más potente y selectivo posible sobre esta diana farmacológica (relación estructura-actividad). Así, se podría optimizar un *lead* para iniciar el estudio del mismo en un modelo animal, es decir, en un ensayo preclínico. De esta manera, podría determinarse la eficacia y seguridad del *lead* optimizado en la regulación de la adipogénesis, de forma que se estableciese su potencial utilidad en el tratamiento del síndrome metabólico.

CONCLUSIONES

Se ha identificado PI3K como kinasa reguladora de la capacidad adipogénica y se ha iniciado su validación. Así, mediante ensayos de imagen en modelos celulares se ha visto que su inhibición farmacológica conduce a un fenotipo que promueve la adipogénesis. En consecuencia, se requiere la evaluación de PI3K como una diana candidata en la regulación del tejido adiposo, de forma que se optimice el mecanismo de acción de inhibidores de PI3K para el tratamiento de las patologías metabólicas.

Las moléculas que inhiben farmacológicamente PI3K conducen hacia una inhibición parcial del proceso de lipólisis. De esta manera, puede resultar interesante estudiar con mayor detalle este efecto *in vivo*, ya que podría evitarse la dislipemia causada por la liberación de lípidos a la circulación sistémica, propia de la obesidad y el síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Rosen E, Spiegelman B. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* 2014 1/16;156(1–2):20-44.
- (2) Assal J, Groop L. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 1999.
- (3) World Health Organization. Fact sheet: Diabetes [Internet]. Enero 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Acceso Marzo, 2015.
- (4) Artola Menéndez S. Estrategia en diabetes del sistema Nacional de Salud. 2012.
- (5) DECODE Study Group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care* 2003 Jan;26(1):61-69.
- (6) Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes tipo 2. 2008.
- (7) World Health Organization. Fact sheet: Obesity and overweight [Internet]. Enero 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acceso Marzo, 2015.
- (8) Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010 Mar;1801(3):338-349.
- (9) Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007 Sep;117(9):2621-2637.
- (10) Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 2013 Feb;34(1):1-11.
- (11) Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes* 2013 Sep;62(9):2997-3004.
- (12) Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 2005 Jan;149(1):33-45.

- (13) Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-1428.
- (14) Ortega-Molina A, Lopez-Guadamillas E, Mattison JA, Mitchell SJ, Munoz-Martin M, Iglesias G, et al. Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and rhesus monkeys. *Cell Metab* 2015 Apr 7;21(4):558-570.
- (15) Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 2009 Mar;5(3):e1000324.
- (16) Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 2002 Jan 1;16(1):22-26.
- (17) Park BO, Ahrends R, Teruel MN. Consecutive positive feedback loops create a bistable switch that controls preadipocyte-to-adipocyte conversion. *Cell Rep* 2012 Oct 25;2(4):976-990.
- (18) Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000 Jun 1;14(11):1293-1307.
- (19) Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000 Jul;106(2):171-176.
- (20) Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Apr 26;102(17):6207-6212.
- (21) Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* 1997 Dec 15;16(24):7432-7443.
- (22) Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2009 Apr;20(3):107-114.
- (23) Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Oct 10;92(21):9856-9860.
- (24) Lee JE, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARgamma expression during adipogenesis. *Cell Biosci* 2014 May 29;4:29-3701-4-29. eCollection 2014.

- (25) Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991 Sep;5(9):1538-1552.
- (26) Lafontan M. Advances in adipose tissue metabolism. *Int J Obes (Lond)* 2008 Dec;32 Suppl 7:S39-51.
- (27) Young SG, Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes Dev* 2013 Mar 1;27(5):459-484.
- (28) Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 2006 Dec 29;281(52):40236-40241.
- (29) Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, et al. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2010 Nov;30(21):5009-5020.
- (30) Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006 Dec 14;444(7121):840-846.
- (31) Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014 Jan 8;220(2):T1-T23.
- (32) Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am Heart J* 2005 Jan;149(1):33-45.
- (33) Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 2006 Jul;116(7):1756-1760.
- (34) Puri S, Hebrok M. Diabetic β Cells: To Be or Not To Be? *Cell* 2012 9/14;150(6):1103-1104.
- (35) Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 2006 May;119(5 Suppl 1):S10-6.
- (36) Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002 Jun;32 Suppl 3:14-23.

- (37) Stojavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014 Dec 28;20(48):18070-18091.
- (38) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(12):1821-1830.
- (39) Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005 Nov;46(11):2347-2355.
- (40) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(12):1796-1808.
- (41) Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med* 2012 Jan 11;14:e1.
- (42) Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Feb;7(2):85-96.
- (43) Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 Sep 1;4(9):a011189.
- (44) Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997 Apr 1;7(4):261-269.
- (45) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002 Dec 6;298(5600):1912-1934.
- (46) Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002 Apr;1(4):309-315.
- (47) Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009 Jul;8(7):547-566.

- (48) Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009 Jan;9(1):28-39.
- (49) García Soidán FJ, Malo García F, Modroño Freire MJ, López Álvarez JL, Novo Rodríguez JM, Martínez Vidal A, et al. Guía Clínica: Diabetes Mellitus tipo 2 [Internet]. 2014. Disponible en: <http://www.fisterra.com/guias-clinicas/diabetes-mellitus-tipo-2/>. Acceso Febrero, 2015.
- (50) Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* 2013 Sep;56(9):1898-1906.
- (51) Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2014 Mar;10(3):143-156.
- (52) Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001 Oct;108(8):1167-1174.
- (53) GlaxoSmithKline, editor. 2nd RSC Symposium on Chemical Biology for Drug Discovery. The Published Kinase Inhibitor Set: A resource to develop probes for the untargeted kinome; Mar 2012.
- (54) Eder J, Sedrani R, Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat Rev Drug Discov* 2014 Aug;13(8):577-587.
- (55) Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol* 2007 Sep;152(1):53-61.
- (56) Liu B, Li S, Hu J. Technological advances in high-throughput screening. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4(4):263-276.
- (57) Zheng W, Thorne N, McKew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today* 2013 Nov;18(21-22):1067-1073.
- (58) Cho YS, Kwon HJ. Identification and validation of bioactive small molecule target through phenotypic screening. *Bioorg Med Chem* 2012 Mar 15;20(6):1922-1928.
- (59) Titov DV, Liu JO. Identification and validation of protein targets of bioactive small molecules. *Bioorg Med Chem* 2012 Mar 15;20(6):1902-1909.

- (60) Harrison C. Phenotypic screening: A more rapid route to target deconvolution. *Nat Rev Drug Discov* 2014 Feb;13(2):102.
- (61) Schenone M, Dancik V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol* 2013 Apr;9(4):232-240.
- (62) Feng Y, Mitchison TJ, Bender A, Young DW, Tallarico JA. Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nat Rev Drug Discov* 2009 Jul;8(7):567-578.
- (63) Lang P, Yeow K, Nichols A, Scheer A. Cellular imaging in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2006 Apr;5(4):343-356.
- (64) Tordjman J, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Forest C, Antoine B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells. *J Biol Chem* 2003 May 23;278(21):18785-18790.
- (65) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995 Jun 2;270(22):12953-12956.
- (66) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem* 2001 Nov 2;276(44):41245-41254.
- (67) Barnett AH. Redefining the role of thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5(1):141-151.
- (68) Chana R, Lewington A, Brunskill N. Differential effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR gamma) ligands in proximal tubular cells: Thiazolidinediones are partial PPAR gamma agonists. *Kidney International* 2004 January 15, 2014;65:2081-2090.
- (69) Angulo I, Vadas O, Garcon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al. Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* 2013 Nov 15;342(6160):866-871.

- (70) Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* 1973 Dec;33(12):3231-3238.
- (71) Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000 Dec;130(12):3122S-3126S.
- (72) Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 2012;81:715-736.
- (73) Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 29;101(26):9607-9611.
- (74) Zhou H, Kaplan T, Li Y, Grubisic I, Zhang Z, Wang PJ, et al. Dual functions of TAF7L in adipocyte differentiation. *Elife* 2013 Jan 8;2:e00170.
- (75) Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000 Jun 1;14(11):1293-1307.
- (76) Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Apr 26;102(17):6207-6212.
- (77) Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* 1997 Dec 15;16(24):7432-7443.
- (78) Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991 Sep;5(9):1538-1552.
- (79) Klemm DJ, Leitner JW, Watson P, Nesterova A, Reusch JE, Goalstone ML, et al. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem* 2001 Jul 27;276(30):28430-28435.
- (80) Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* 2008 Oct;19(10):4032-4041.

- (81) Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 1996 Aug;16(8):4128-4136.
- (82) Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, et al. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* 2008 Jun;28(11):3804-3816.
- (83) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995 Jun 2;270(22):12953-12956.
- (84) Chaussade C, Rewcastle GW, Kendall JD, Denny WA, Cho K, Gronning LM, et al. Evidence for functional redundancy of class IA PI3K isoforms in insulin signalling. *Biochem J* 2007 Jun 15;404(3):449-458.
- (85) Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, et al. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* 2005 May;11(5):507-514.
- (86) Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3Kalpha inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2014 May;13(5):1117-1129.
- (87) Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011 Jan 13;117(2):591-594.
- (88) Zheng Z, Amran SI, Thompson PE, Jennings IG. Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: identification of a new region of nonconserved amino acids critical for p110alpha inhibition. *Mol Pharmacol* 2011 Oct;80(4):657-664.
- (89) Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem* 1977 Jul;25(7):585-589.
- (90) Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1985 Mar;100(3):965-973.

- (91) Shilpa K, Dinesh T, Lakshmi BS. An In Vitro Model to Probe the Regulation of Adipocyte Differentiation under Hyperglycemia. *Diabetes Metab J* 2013 Jun;37(3):176-180.
- (92) Fruhbeck G, Mendez-Gimenez L, Fernandez-Formoso JA, Fernandez S, Rodriguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* 2014 Jun;27(1):63-93.
- (93) Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 2013 May;56(5):949-964.
- (94) Nielsen TS, Jessen N, Jorgensen JO, Moller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol* 2014 Jun;52(3):R199-222.
- (95) Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, et al. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2010 Nov;30(21):5009-5020.
- (96) Dominguez E, Galmozzi A, Chang JW, Hsu KL, Pawlak J, Li W, et al. Integrated phenotypic and activity-based profiling links *Ces3* to obesity and diabetes. *Nat Chem Biol* 2014 Feb;10(2):113-121.
- (97) Morimoto C, Kameda K, Tsujita T, Okuda H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res* 2001 Jan;42(1):120-127.
- (98) Morimoto C, Tsujita T, Sumida M, Okuda H. Substrate-dependent lipolysis induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Aug 11;274(3):631-634.
- (99) McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1983 Mar;29(3):538-542.
- (100) Foukas LC, Bilanges B, Bettedi L, Pearce W, Ali K, Sancho S, et al. Long-term p110alpha PI3K inactivation exerts a beneficial effect on metabolism. *EMBO Mol Med* 2013 Apr;5(4):563-571.
- (101) Ortega-Molina A, Efeyan A, Lopez-Guadamillas E, Munoz-Martin M, Gomez-Lopez G, Canamero M, et al. Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metab* 2012 Mar 7;15(3):382-394.
- (102) Chattopadhyay M, Selinger ES, Ballou LM, Lin RZ. Ablation of PI3K p110-alpha prevents high-fat diet-induced liver steatosis. *Diabetes* 2011 May;60(5):1483-1492.

- (103) Kobayashi N, Ueki K, Okazaki Y, Iwane A, Kubota N, Ohsugi M, et al. Blockade of class IB phosphoinositide-3 kinase ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Apr 5;108(14):5753-5758.
- (104) Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, et al. Kinase-dependent and-independent functions of the p110 β phosphoinositide-3-kinase in cell growth, metabolic regulation and oncogenic transformation. *Nature* 2008;454(7205):776.
- (105) Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000 Feb;105(3):311-320.
- (106) Sopasakis VR, Liu P, Suzuki R, Kondo T, Winnay J, Tran TT, et al. Specific roles of the p110 α isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab* 2010 Mar 3;11(3):220-230.
- (107) Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 2005 Aug;54(8):2351-2359.
- (108) Kaneko K, Ueki K, Takahashi N, Hashimoto S, Okamoto M, Awazawa M, et al. Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic beta cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell Metab* 2010 Dec 1;12(6):619-632.
- (109) McCurdy CE, Klemm DJ. Adipose tissue insulin sensitivity and macrophage recruitment: Does PI3K pick the pathway? *Adipocyte* 2013 Jul 1;2(3):135-142.
- (110) McCurdy CE, Schenk S, Holliday MJ, Philp A, Houck JA, Patsouris D, et al. Attenuated Pik3r1 expression prevents insulin resistance and adipose tissue macrophage accumulation in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2012 Oct;61(10):2495-2505.
- (111) Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, et al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell* 2006 May 19;125(4):733-747.
- (112) Ma DK, Stolte C, Krycer JR, James DE, O'Donoghue SI. SnapShot: Insulin/IGF1 Signaling. *Cell* 2015 May 7;161(4):948-948.e1.

- (113) Ortega-Molina A, Lopez-Guadamillas E, Mattison JA, Mitchell SJ, Munoz-Martin M, Iglesias G, et al. Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and rhesus monkeys. *Cell Metab* 2015 Apr 7;21(4):558-570.
- (114) Chaussade C, Rewcastle GW, Kendall JD, Denny WA, Cho K, Gronning LM, et al. Evidence for functional redundancy of class IA PI3K isoforms in insulin signalling. *Biochem J* 2007 Jun 15;404(3):449-458.
- (115) Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3K α inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther* 2014 May;13(5):1117-1129.
- (116) Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, et al. CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011 Jan 13;117(2):591-594.
- (117) Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010 Mar;1801(3):338-349.
- (118) Yang Q, Modi P, Newcomb T, Queva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015 Apr 1;21(7):1537-1542.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora Mabel Loza, por brindarme esta fantástica oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación farmacológica. A Eduardo Domínguez, por su dedicación y orientación, así como por su apoyo constante. Mi gratitud hacia todos y cada uno de los miembros del grupo Biofarma, por su inestimable ayuda científica, técnica, informática, administrativa y por todos esos momentos de motivación personal.

A mi familia y amigos por su paciencia, confianza y cariño infinitos.