



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LABORATORIO DE BIOMEDICINA MOLECULAR
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN OBESIDAD Y DIABETES

ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL EN SUERO DE NIÑOS Y
ADULTOS CON Y SIN RESISTENCIA A INSULINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Q.B.P. WALTER DAVID CRUZ PINEDA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ISELA PARRA ROJAS

CODIRECTORA DE TESIS: DRA. OLGA LILIA GARIBAY CERDENARES

CHILPANCINGO GUERRERO, NOVIEMBRE DE 2018




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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 19 días del mes de junio de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis proteómico diferencial en suero de niños y adultos con y sin resistencia a insulina", presentada por el alumno Walter David Cruz Pineda, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dra. Isela Parra Rojas
Dirección de tesis



Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres
Codirección de tesis


Dr. Lorenzo Salgado Goytia

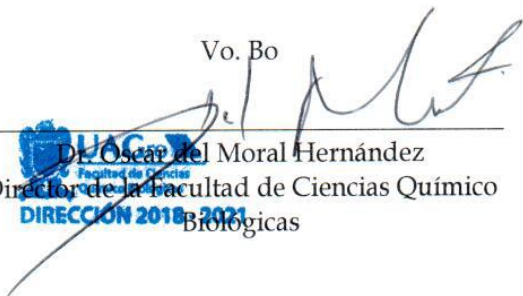

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán


Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Vo. Bo


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UAGro
Coordinación del Posgrado de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo


UAGro
Facultad de Ciencias
DIRECCIÓN 2018-2021
Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo la dirección de:

Dra. Isela Parra Rojas

La codirección de:

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

La asesoría de:

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Walter David Cruz Pineda recibió una beca (No. De registro 778762) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas de posgrados de calidad (PNPC).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isela Parra Rojas, siempre recordaré las palabras mediante las cuales me expresaba el gusto que le daría que yo trabajara con usted, pero el gusto mío es incomparable pues desde el inicio me otorgó su confianza para llevar a cabo este proyecto y eso fue el motivo de esforzarme. Espero haber cumplido de buena manera esa responsabilidad que estaba a mi cargo para con usted, la admiro, la respeto y la aprecio en gran medida.

A la Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres, el agradecimiento que quiero expresarle no cabe ni se puede plasmar en letras, es grande y es complejo, su ayuda fue incomparable y crucial para poder llegar al término de este proyecto, espero haber cumplido la mayor parte de sus expectativas.

Al Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, por permitirnos la colaboración con el laboratorio que tiene a su cargo, por esa sencillez y trato hacia mí que hicieron tan hospitalaria mi estancia en ese laboratorio.

Al Dr. Lorenzo Salgado Goytia, mi queridísimo Dr. Gracias por formar parte del comité tutorial de este trabajo, sus observaciones y sugerencias fueron de mucha ayuda y siempre las tomé en cuenta.

A la **Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán**, porque sin duda su participación fue muy importante para lograr el término de este proyecto, agradezco que estuviera pendiente de las correcciones y evaluaciones a lo largo del posgrado.

A la Biol. Paola Ramírez Macedo, la primera vez que llegué a la coordinación del posgrado, me encontré con una persona con esa actitud de servicio y nobleza que ahora ya no es muy frecuente encontrar, pero a ti te caracterizan. Perdí la cuenta de las veces que me ayudaste en cuestiones escolares y en algunas fuera de éstas, mi agradecimiento y reconocimiento es por lo que desempeñas pero mi cariño es por lo que eres.

Al Q.B.P. Luis Antonio Martínez Jiménez, por la paciencia y disposición de compartir conmigo las técnicas para poder iniciar este proyecto, en el cual participaste y realizaste parte de él. Gracias también por la ayuda en la estancia que pasamos en el Laboratorio de Proteómica, fue agradable trabajar juntos.

Al Lab. De Biomedicina Molecular, al **Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez** y a la **Dra. Berenice Illades Aguiar**, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
V. RESULTADOS.....	13
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIÓN	37
VIII. REFERENCIAS	38

I. RESUMEN

Introducción. La resistencia a la insulina es un estado en el cual las células blanco no responden de manera normal a las acciones fisiológicas de la hormona. La obesidad y la consecuente inflamación crónica de bajo grado favorecen el desarrollo de la resistencia a la insulina, sin embargo, los mecanismos moleculares que se asocian a esta condición en ausencia de obesidad y diabetes aún no están completamente esclarecidos. El suero sanguíneo además de ser una muestra de fácil acceso y bajo costo, constituye el secretoma de todas las células del organismo. **Objetivo.** En este proyecto se analizó el suero para conocer cuáles son las moléculas en el microambiente que probablemente están implicadas en el proceso de la resistencia a la insulina. **Metodología.** Se analizaron un total de 24 muestras de suero en 4 pools mediante electroforesis bidimensional, a través de un análisis semicuantitativo con el software PDQuest v.8.0.1, la identificación de las proteínas de expresión diferencial se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). **Resultados.** Se identificaron 10 proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa ($p < 0.05$), el análisis *in silico* mostró su localización subcelular, función y la relación directa de 8 de las 10 proteínas identificadas. **Conclusión.** El análisis proteómico del suero de pacientes con resistencia a insulina detectó proteínas como A1AT y CYB5R4, que participan en procesos relacionados con el estrés oxidativo en tejidos blanco y el estrés del retículo endoplasmático a nivel de páncreas, lo que podrían sugerir efectos a nivel de la producción de insulina y el deterioro en la vía de señalización generada en sus tejidos blanco

Palabras clave: Resistencia a la insulina, suero, electroforesis bidimensional, espectrometría de masas, análisis proteómico.

II. ABSTRACT

Introduction. Insulin resistance is a condition in which the target cells do not respond normally to the physiological actions of the hormone. Obesity and the consequent chronic inflammation of low grade have been associated with the development of the disease, however, the molecular mechanisms that are associated with the resistance to insulin in absence of obesity and diabetes are not yet completely clarified. The blood serum is a sample of easy access and low cost to analyze and constitutes the secretoma of all cells in the body. **Objective.** In this project serum was analyzed to know what are the molecules in the microenvironment that are probably involved in the process of insulin resistance. **Methodology.** We analyzed a total of 24 serum samples in 4 pools by electrophoresis, through a semi-quantitative analysis with the PDQuest software v.8.0.1, the identification of proteins of differential expression was performed using mass spectrometry (MALDI-TOF). **Results:** It was identified 10 proteins with statistically significant differential expression ($p < 0.05$), the *in silico* analysis showed its subcellular localization, function, and the direct relationship of 8 of the 10 proteins identified. **Conclusion:** the proteomic analysis of serum from patients with insulin resistance detected proteins as A1AT and CYB5R4, among others involved in processes related to oxidative stress in target tissues and stress of the endoplasmic reticulum at the level of pancreas, which might suggest effects at the level of insulin production and the deterioration in signaling generated in their target tissues

Keywords: insulin resistance, serum, electrophoresis, mass spectrometry, proteomic analysis.

III. INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona anabólica de 5.8 kDa que secretan las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas en respuesta a una diversa cantidad de estímulos, pero principalmente por el aumento de la glucosa circulante. Su principal función es mantener la concentración de glucosa en un rango de 80-105 mg/dL en sangre, promoviendo su internalización en los tejidos del músculo esquelético, hepático y adiposo, además de regular otras actividades como el metabolismo de los lípidos y la inhibición de la producción hepática de glucosa (Saltiel & Kahn, 2001).

Las funciones metabólicas de la insulina comienzan con la unión de la hormona al receptor. El receptor de insulina es una glucoproteína heterotetramérica de tipo tirosina cinasa (RTK's) formado por 2 subunidades alfa unidas por puentes disulfuro, que se ubican en el exterior de la membrana plasmática en la que están contenidos los sitios de unión a la insulina, y 2 subunidades beta que muestran una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular en la que están anclados los dominios con actividad tirosina cinasa (Youngren, 2007).

La unión insulina-receptor activa una serie de cascadas de señalización activando principalmente dos vías de transducción de señales: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), ambas regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas con la expresión génica y el metabolismo energético (White, 2002). La vía de señalización mediada por PI3K es el principal mecanismo involucrado en el metabolismo de la glucosa y lípidos (White, 2002). Las interacciones proteicas están reguladas en diferentes niveles a lo largo de la vía, desde el receptor, el sustrato del receptor de insulina (IRS), y otras proteínas que participan en la señalización río abajo como la propia PI3K; Akt o el transportador de glucosa GLUT4 (Gutiérrez-Rodelo *et al*, 2017).

La resistencia a la insulina es una condición en la cual está afectada la respuesta de las células blanco a la insulina, lo que provoca una disminución de la función fisiológica de la hormona (Himsworth, 2013), que resulta en hiperglucemia basal y posprandial y favorece el desarrollo de diabetes tipo 2 (Cameron *et al.*, 2008). En

esta condición, la reducida acción fisiológica de la insulina provoca un aumento de secreción de la hormona por parte del páncreas como respuesta compensatoria para mantener la homeostasis de la glucosa. Esta condición revela el estado hiperglucémico e hiperinsulinémico que caracteriza a los individuos con resistencia a la insulina, sobre todo posterior a la ingesta de una elevada cantidad de carbohidratos (Galgani & Ravussin, 2012).

El estándar de oro para el diagnóstico de la resistencia a la insulina es la técnica del clamp hiperinsulinémico-euglucémico, propuesta por DeFronzo *et al.* en 1979, que consiste en la administración de insulina de manera exógena hasta aumentar la concentración en 100 $\mu\text{U/ml}$ sobre su valor basal, manteniendo constante la concentración de glucosa en sangre en aproximadamente 90 mg/dL mediante ajustes periódicos con una infusión de glucosa. Bajo estas condiciones, la cantidad de glucosa administrada para mantener la normoglucemia indica la captación de glucosa y es inversamente proporcional al grado de resistencia a la insulina. (DeFronzo *et al.*, 1979).

En la práctica clínica, el cálculo del índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*) es el método más utilizado para diagnosticar resistencia a la insulina, se trata de un modelo matemático basado en la medición de glucosa e insulina en ayuno, calibrado a una función celular beta pancreática de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 calculándose a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucemia (mmol/l)} \times \text{insulinemia (\mu U/ml)} / 22,5.$$

Los valores de índice referidos inicialmente son de 1.0 para una población joven y sana, sin embargo, los valores pueden variar de una población a otra, describiéndose valores de hasta 1.96 para una población sana. Los individuos con valores superiores a 3.0 son diagnosticados con resistencia a la insulina y tienen el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas (Matthews *et al.*, 1985).

La patogénesis de la resistencia a la insulina es un proceso complejo, diversos estudios clínicos y experimentales sugieren que los factores ambientales, el estilo

de vida, enfermedades infecciosas principalmente de índole viral y degenerativas inducen cambios moleculares clave que pueden estar relacionados con la génesis y/o el curso de esta condición. (Figura 1) (Lasram *et al*, 2014).

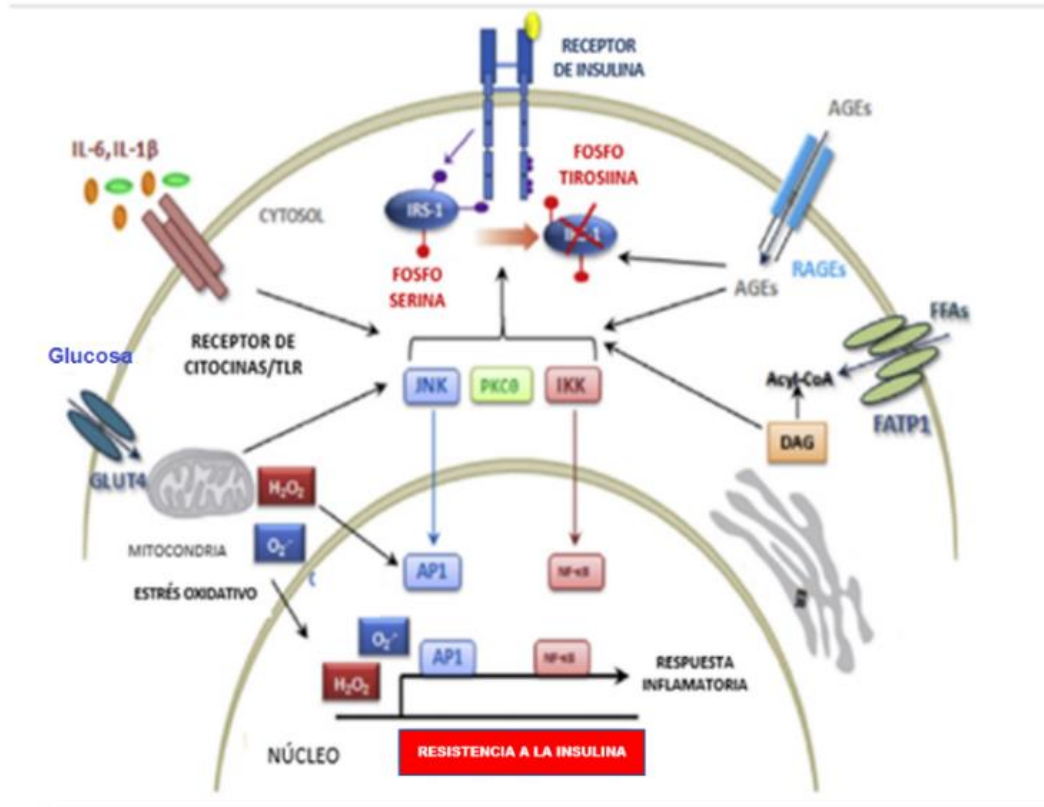


Figura. 1 Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es un mecanismo complejo en el cual parece ser iniciado y promovido por glucotoxicidad, lipotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo (adaptado de Lasram *et al*, 2014)

El estilo de vida actual favorece la continua exposición a xenobióticos como los pesticidas organofosforados y los carbamatos. Se ha demostrado que los organofosforados pueden inducir resistencia a insulina en modelos animales en donde se sugiere que el desarrollo de esta condición resulta de la acumulación de mayor cantidad de citocinas, ácidos grasos libres y especies reactivas del oxígeno (Mostafalou *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno tiene diversos efectos deletéreos tales como la activación de proteínas como la fosfatasa de fosfotirosinas 1B (PTP-1B) que es capaz de inhibir la fosforilación en residuos de tirosina tanto en el receptor de insulina como en IRS-1 (Gual *et al.*, 2005). El exceso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) altera la asociación entre el IRS-1 y PI3K cambiando la distribución de estas dos proteínas en el citosol (Nomiya *et al.*, 2004).

Algunas enfermedades infecciosas como la hepatitis C pueden estar implicadas en el desarrollo de resistencia a la insulina. Se ha observado el deterioro de IRS-1 e IRS-2 en pacientes con hepatitis C crónica (Kawaguchi *et al.*, 2004), ya que el virus irrumpe la vía de señalización de insulina por diversos mecanismos como la regulación positiva de las supresoras de proteínas de señalización de citocinas (SOCS), la activación de la vía mTOR/S6K1 y el aumento de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Shintani *et al.*, 2004, Bose *et al.*, 2012).

Se han reportado alteraciones de la señalización de insulina en tejido muscular de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, que incluyen la fosforilación de IRS-1 en serina, la disminución de la actividad PI3K, así como la reducción en la fosforilación de Akt y AS160 (Pauli *et al.*, 2011).

En la enfermedad de Alzheimer, una característica común es la resistencia a la insulina en el tejido cerebral generado por la fosforilación en serina de IRS-1 que resulta de la activación de procesos proinflamatorios inducidos por las microglías en respuesta a la acumulación de β -amiloide, desarrollando un papel importante en la aparición de déficit cognitivos (Heneka *et al.*, 2010, Heneka *et al.*, 2013)

En pacientes obesos con resistencia a insulina y diabetes tipo 2, se han reportado niveles elevados de citocinas proinflamatorias como TNF- α , interleucina 6 (IL-6) y proteína C reactiva (CRP) (Shoelson *et al.*, 2007, De Luca & Olefsky, 2008). Estas citocinas están implicadas en la vía de señalización de JNK y IKK/NF κ B, cinasas que fosforilan a factores de transcripción como AP1 y NF κ B, que activan genes implicados en la respuesta inflamatoria dando lugar a la disminución de la sensibilidad a la insulina (Cai *et al.*, 2005)

También los niveles elevados de glucosa pueden conducir a la muerte de las células β por la activación de NF κ B y PKC, estas a su vez activan el gen de la óxido nítrico sintasa inducible que cataliza la formación de óxido nítrico, estimulando a su vez a la apoptosis (Carpenter *et al.*, 2001). En las células blanco de la insulina la hiperglucemia provoca la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGE's) que pueden inhibir la actividad de IRS por la unión con su dominio activo (Cnop *et al.*, 2005), la interacción de los AGE's con su receptor mantiene la formación de estas moléculas e induce la inflamación reduciendo la sensibilidad a la insulina en la célula.

Mediante la proteómica se analiza de manera sistemática las proteínas expresadas en una condición particular con la posibilidad de identificar aquellas asociadas a la enfermedad y sus posibles complicaciones (Wilkins *et al.*, 1996). El conjunto de proteínas expresadas en una célula o tejido en un momento y condiciones determinadas conforma el proteoma. Analizar el proteoma implica además de la identificación de las proteínas y sus niveles de expresión, la caracterización de su estructura, las modificaciones postraduccionales, la función y localización subcelular, y las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA en estados de enfermedad (Cui *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007).

El suero sanguíneo es un fluido corporal que es útil para el estudio de muchas enfermedades, los niveles de proteínas que se pueden encontrar en él, reflejan en estado fisiológico o patológico de todo el organismo. El análisis de la expresión diferencial de proteínas a partir de muestras de suero derivadas de pacientes sin obesidad ni diabetes, pero diagnosticados con resistencia a la insulina, puede proporcionar información importante acerca de los primeros mecanismos alterados que favorecen el desarrollo o curso de esta condición.

IV. MATERIAL Y METODOS

Muestras de suero

Las muestras se obtuvieron del banco de sueros del Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Se seleccionaron 24 muestras de suero obtenidas de un estudio previo, de las cuales 12 corresponden a individuos adultos, 6 con diagnóstico de resistencia a la insulina mediante el índice HOMA y 6 sin resistencia a la insulina utilizados como control. Las 12 muestras restantes corresponden a 6 niños con resistencia a la insulina y 6 a niños sin resistencia a la insulina, utilizados como control (Cuadro 1 y 2)

Cuadro 1. Características generales de la población adulta clasificada con y sin resistencia a la insulina.

Adultos

ETIQUETA	EDAD	SEXO	IMC*	GLUCOSA (70-110)	INSULINA	HOMA (RI \geq 3.2)
1	21	Masculino	23.4	96	13.98	3.31
2	21	Femenino	18.6	76	19.69	3.69
3	18	Masculino	21.8	109	11.87	3.20
4	19	Masculino	23.0	104	16.68	4.28
5	19	Femenino	19.8	101	13.5	3.37
6	19	Femenino	23.0	80	25.1	4.96
7	20	Femenino	21.7	88	6.21	1.35
8	19	Femenino	23.6	76	7.26	1.36
9	19	Masculino	20.2	93	5.2	1.19
10	20	Masculino	21.4	73	4.3	0.78
11	19	Femenino	18.7	83	7.26	1.49
12	19	Masculino	21.9	86	3.37	0.72

*IMC. Índice de masa corporal

Cuadro 2. Características generales de la población infantil clasificada con y sin resistencia a la insulina.

Niños

ETIQUETA	EDAD	SEXO	IMC*	GLUCOSA	INSULINA	HOMA (RI \geq 2.4)
1	8	Femenino	16.1	85	12.41	2.60
2	6	Femenino	14.4	73	13.35	2.40
3	10	Masculino	17.7	95	10.23	2.40
4	10	Femenino	17.2	109	10.79	2.90
5	10	Masculino	19.0	109	10.56	2.84
6	11	Masculino	16.7	118	9.63	2.80
7	9	Femenino	15.1	100	2.88	0.71
8	9	Femenino	16.7	92	2.65	0.60
9	7	Masculino	14.1	68	7.07	1.19
10	9	Masculino	15.6	103	4.74	1.21
11	7	Masculino	16.7	92	6.37	1.45
12	9	Masculino	16.1	98	1.72	0.42

*IMC. Índice de masa corporal

Eliminación de proteínas abundantes (Albúmina e Inmunoglobulinas)

Para reducir la cantidad de proteínas abundantes en el suero, se utilizó el kit comercial Thermo Scientific Pierce Albumin / IgG Removal de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 10 μ l la muestra en 75 μ L con Buffer Binding/Wash y se añadió la muestra diluida a la base de gel, tapando la columna. Se agitó para formar una suspensión. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) en un agitador orbital usando una velocidad suficiente para mantener la mezcla en suspensión. Se retiró el tapón inferior de la columna y aflojó la tapa. Posteriormente se colocó la columna en el tubo centrifugando a 10.000 \times g durante 1 minuto, recuperando el filtrado y aplicando nuevamente la base de resina, tapando y volviendo a acoplar a la columna. Se incubó durante 10 min a TA en un agitador orbital, retirando posteriormente el tapón inferior de la columna y aflojando la tapa, devolviendo la columna al tubo y centrifugando a 10.000 \times g por 1 minuto para recolectar el filtrado. Se añadió 75 μ l de Binding/Wash Buffer a la base de gel y se centrifugó a 10.000 \times g durante 1 min para recoger el lavado en el mismo tubo. La muestra resultante puede ser preservada a -70 $^{\circ}$ C o procesada para su análisis.

Cuantificación de proteínas.

La cantidad de proteína de cada muestra se cuantificó utilizando el método de Bradford modificado (BIORAD, No. de Cat. 500-0205). Se realizó una mezcla de hidróxido de cloro, agua bidestilada y el reactivo de Bradford, para realizar una curva estándar utilizando como proteína de referencia albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, No. de Cat. A2153), la lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro (DU^R 800 Spectrophotometer) a una longitud de onda de 595 nm. Alícuotas de 2 µl de cada fracción y 18 µl del agua se cargaron por duplicado en una placa de microtitulación junto con 80 µl de reactivo de Bradford; las concentraciones de proteína se estimaron por absorbancia a 750 nm comparando con una curva estándar obtenida a partir de una serie de diluciones de albúmina sérica bovina.

Electroforesis unidimensional

Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE al 15 % de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). El corrimiento se inició aplicando 80 V durante 20 min aumentando el voltaje a 120 V durante 1 h. Los geles fueron teñidos con el kit Silver Stain Plus (BIORAD, No. de Cat. 161-0462 al 64).

3.2.4. Electroforesis bidimensional

Para el procesamiento mediante electroforesis bidimensional, las muestras fueron disueltas en amortiguador para el isoelectroenfoco (130 µl), de acuerdo al protocolo descrito por O'Farrel (O'Farrel, 1975) y Klose (Klose and Kobalz, 1995). Los extractos solubles de proteínas (500 µg) se resolvieron en capilares de acrilamida de 18 cm de largo, con un rango de pH de 3 a 10 enriquecidos en un rango de 4 a 8 (lineal). Los capilares se pre-enfocaron, durante 24 h a TA, usando un voltaje de 1000 V por 40 min, sumergidos en sus extremos con una mezcla de Buffer básico con Hidróxido de Sodio y agua para el cátodo y para el ánodo se utilizó una mezcla de ácido fosfórico y agua. Después del pre-enfoque, se llevó a cabo el enfoque sobre un sistema IEF por 24 h a 2000 V. Antes de la electroforesis en poliacrilamida, las tiras de los capilares se sometieron a reducción, incubándolas durante 5 min (dos rondas) en una solución con 8 M de urea, 30 % de glicerol, 2 % de SDS y 125 mM de DTT. Posteriormente, las proteínas se separaron de acuerdo a su masa molecular (segunda dimensión), colocando los capilares equilibrados

sobre geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS y cubiertas con overlay agarosa. La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema protean® (BioRad, Hércules, CA, USA), a un voltaje de 500 V a 20 °C por 24 h. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie Coloidal (Amresco, No. de Ca. 6104-58-1) de acuerdo al protocolo descrito por Merrill (Merrill *et al.* 1981) y se escanearon en el densitómetro GS-800 (Bio-Rad, Hércules, CA). Las imágenes digitales fueron analizadas y comparadas con el programa PDQuest 8.0.1 Software (Bio-Rad), para su corte y procesamiento para espectrometría de masas. No se obtuvieron triplicados de los experimentos.

Espectrometría de masas (MALDI TOF)

Eliminación de tinción de azul de Coomassie del spot

Se utilizó una solución desteñidora (acetonitrilo y agua miliQ (50:50)), a la que se adicionaron 250 µL de bicarbonato de amonio al 2.5 mM, se realizaron dos lavados con un mL de la mezcla a cada tubo dejando desteñir durante dos horas, posteriormente las muestras se deshidrataron mediante dos lavados con acetonitrilo puro durante 10 minutos y se dejaron secar.

Digestión

Se agregaron 10 µl de una solución de tripsina a cada una de las muestras agitando al menos dos veces en el vórtex y dejando reposar 30 min en hielo, se removió el sobrenadante, posteriormente se adicionaron de 10-15 µl de agua, dejando en reposo toda la noche a 37°C.

Extracción

Se adicionaron 50 µl de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% a cada muestra manteniéndose en agitación por 45 minutos. Posteriormente se centrifugaron durante 10 segundos y se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf de 500 µL previamente rotulados con cada número de spot. Se adicionaron 50 µl de una mezcla de acetonitrilo al 50% más 0.1% de TFA, incubando por 30 minutos con homogenización en vórtex. Las muestras se centrifugaron por 10 segundos, se colectó el sobrenadante y se transfirió al Eppendorf de 500 µl correspondiente. Se adicionaron 50 µl de una mezcla de acetonitrilo al 70% más 0.1% de TFA y se incubaron por 20 minutos. Se centrifugó la muestra por 10 s. Se

colectó el sobrenadante y se transfirió a un Eppendorf de 500 μ l. Se secó el volumen por evaporación en el savant a TA por dos horas.

Adquisición de espectros de masa

Se realizó usando Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Alemania) y el espectro de masas peptídico fue adquirido en el modo de reflectrón. La lista de masas monoisotópicas se generó después de aplicar la función utilizando Flex Análisis de software 2.0. Se excluyeron de la lista los picos producto de la autólisis de la tripsina y los derivados de contaminación con queratinas. Las masas monoisotópicas del espectro fueron usadas para la identificación de proteínas con ayuda del motor de búsqueda MASCOT v2.2 (www.matrixscience.com). La búsqueda se llevó a cabo en NCBI. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: la tolerancia del péptido, 0,5-1 Da; especie, *Homo sapiens*. El número máximo de divisiones perdidas se estableció en 1.

Análisis bioinformático.

Las proteínas identificadas por espectrometría de masas, fueron analizadas en: UniProt (<http://www.uniprot.org/>), IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), Reactome (<http://www.reactome.org/>) , NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Geneontology (<http://geneontology.org/>). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: Especie: *Homo sapiens*; función; nombre; localización subcelular; secuencia(s), interacción, vías de señalización e información. Las proteínas seleccionadas fueron sometidas a un análisis *in silico* en Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>), que permite generar redes de interacciones moleculares entre las proteínas

V. RESULTADOS

Expresión de proteínas en geles de poliacrilamida en una dimensión 1D

Debido al rango dinámico de proteínas presentes en el suero sanguíneo, de las cuales la mayor cantidad está compuesta por albumina e inmunoglobulinas, las muestras fueron procesadas con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 70% como estrategia para la eliminación de éstas proteínas abundantes, y posteriormente lavadas con acetona para eliminar lípidos, sales y carbohidratos. Para comparar el perfil de expresión de proteínas se realizaron electroforesis 1D en geles de poliacrilamida al 15% con una concentración equivalente de 50 μg de proteína. En la figura 2 se muestran los geles de 1D con la expresión de proteínas de cada una de las muestras.

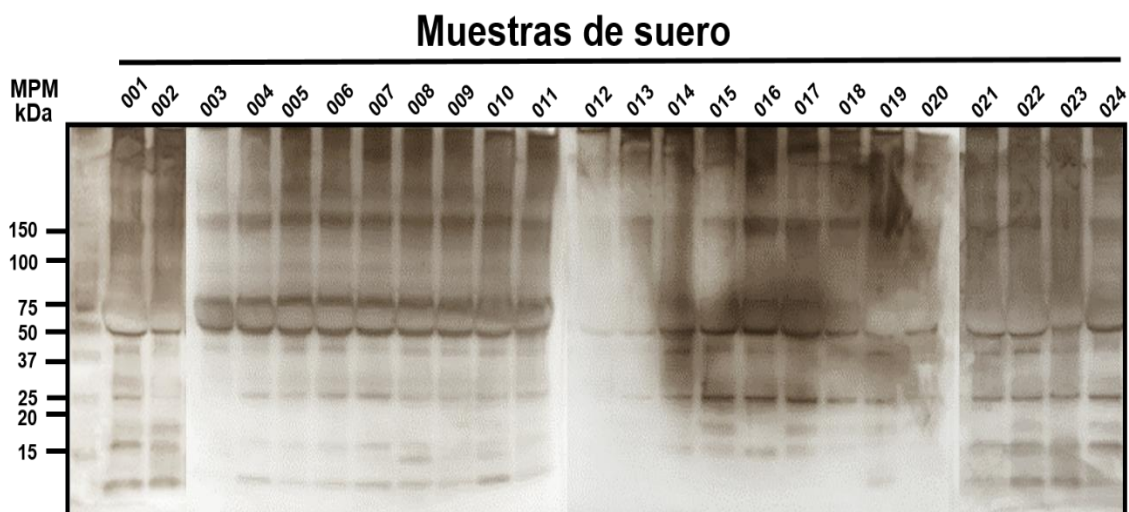


Figura 2. Sueros procesados con Sulfato de amonio. Las proteínas fueron procesadas a través de un SDS-PAGE a 15% y teñidos con Plata compatible con espectrometría de masas.

La comparación de la expresión de proteínas de las muestras procesadas con $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ generó perfiles proteicos muy similares, logrando visualizar expresión diferencial en la zona de bajo peso molecular, sin embargo, es claro que el procesamiento con $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ no elimina eficientemente las proteínas abundantes. Estos patrones de expresión pueden ser útiles para comparar, pero presentan la limitante de que en una sola banda podrían estar presentes diferentes proteínas con el mismo peso molecular y al realizar la identificación por espectrometría de masas

el resultado correspondería a la proteína más abundante y no necesariamente a la que muestre expresión diferencial.

Expresión de proteínas en geles de poliacrilamida en dos dimensiones 2D

Una vez determinado el patrón de expresión, se realizaron electroforesis en geles 2D, utilizando una columna de inmunoafinidad que tiene la capacidad de atrapar proteínas altamente abundantes como albúmina e inmunoglobulinas. Se observó que la columna tiene una baja eficiencia y la concentración de proteína total recuperada resultó muy baja, por lo tanto, se realizó un pool con 6 muestras para obtener 4 grupos a analizar: adultos con resistencia a la insulina, adultos sin resistencia a la insulina, niños con resistencia a la insulina y niños sin resistencia a la insulina. Después de obtener las muestras concentradas, cuantificadas y sin sales contaminantes, los ensayos de electroforesis bidimensional se realizaron en geles de poliacrilamida de 20x20 cm, con un rango de pH de 3-10 (zona de enriquecimiento de 4-8) y concentración de 650 µg de proteína por muestra. En la figura 3 se muestra el perfil proteico obtenido de la electroforesis 2D a partir del pool de muestras correspondiente a cada grupo de análisis.

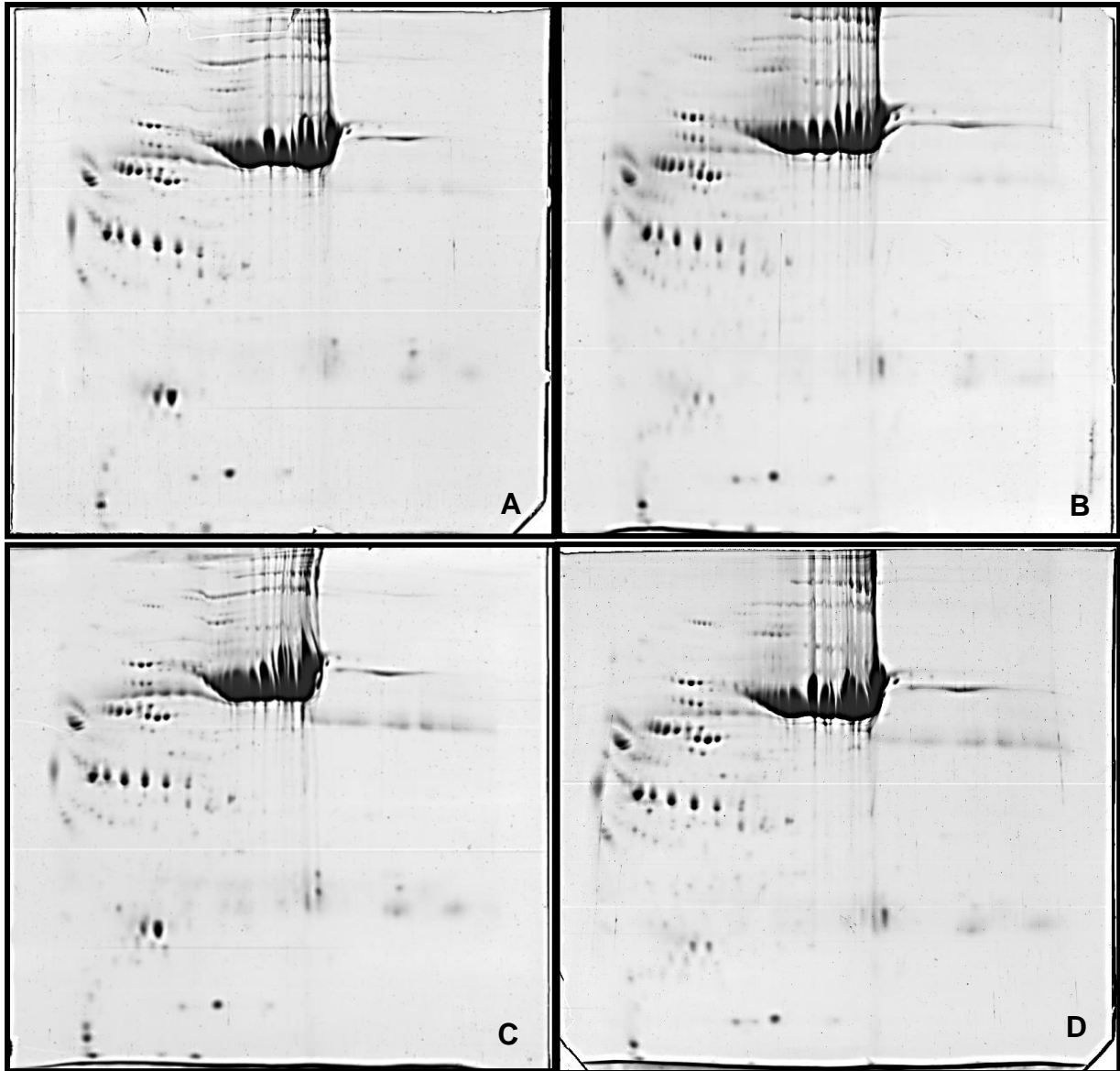


Figura 3. Electroforesis 2D en gel de poliacrilamida al 12% teñidas con azul de Coomassie. A) pool de muestras de adultos sin resistencia a la insulina. B) pool de muestras de niños sin resistencia a la insulina. C) pool de muestras de adultos con resistencia a la insulina. D) pool de muestras de niños con resistencia a la insulina

Análisis semicuantitativo de los perfiles proteicos.

Una vez establecidos los mapas de referencia de las cuatro condiciones de análisis y debido a que no se contaron con triplicados en los experimentos, la estrategia se orientó a la realización de un análisis semicuantitativo, Para ello, los geles fueron escaneados en el densitómetro GS-800 generando una imagen de los geles en formato TIF y analizados con el uso del Software PDQuest versión 8.0.1, el cual permite la autocomparación de forma precisa de los geles con poca o ninguna intervención manual.

Después de obtener las imágenes, el software PDQuest versión 8.0.1 identificó y marcó todos los spots localizados en todas las condiciones, generando una media de la intensidad medida en unidades arbitrarias de intensidad neta. De esta manera, el software detectó aproximadamente 250 puntos constitutivos en todas las condiciones.

Comparación de la expresión diferencial de proteínas en niños y adultos con y sin resistencia a insulina.

Debido a que la expresión de proteínas del pool de muestras de cada una de las condiciones se observa muy similar, la comparación de la expresión diferencial se realizó mediante el empalme de las imágenes de los geles y obteniendo un patrón de proteínas propias de cada condición, así como proteínas de expresión constitutiva en todas. Cada condición de comparación fue etiquetada con una señal de color y estas a su vez mostraron el número de puntos con diferente nivel de expresión (Figura 4).

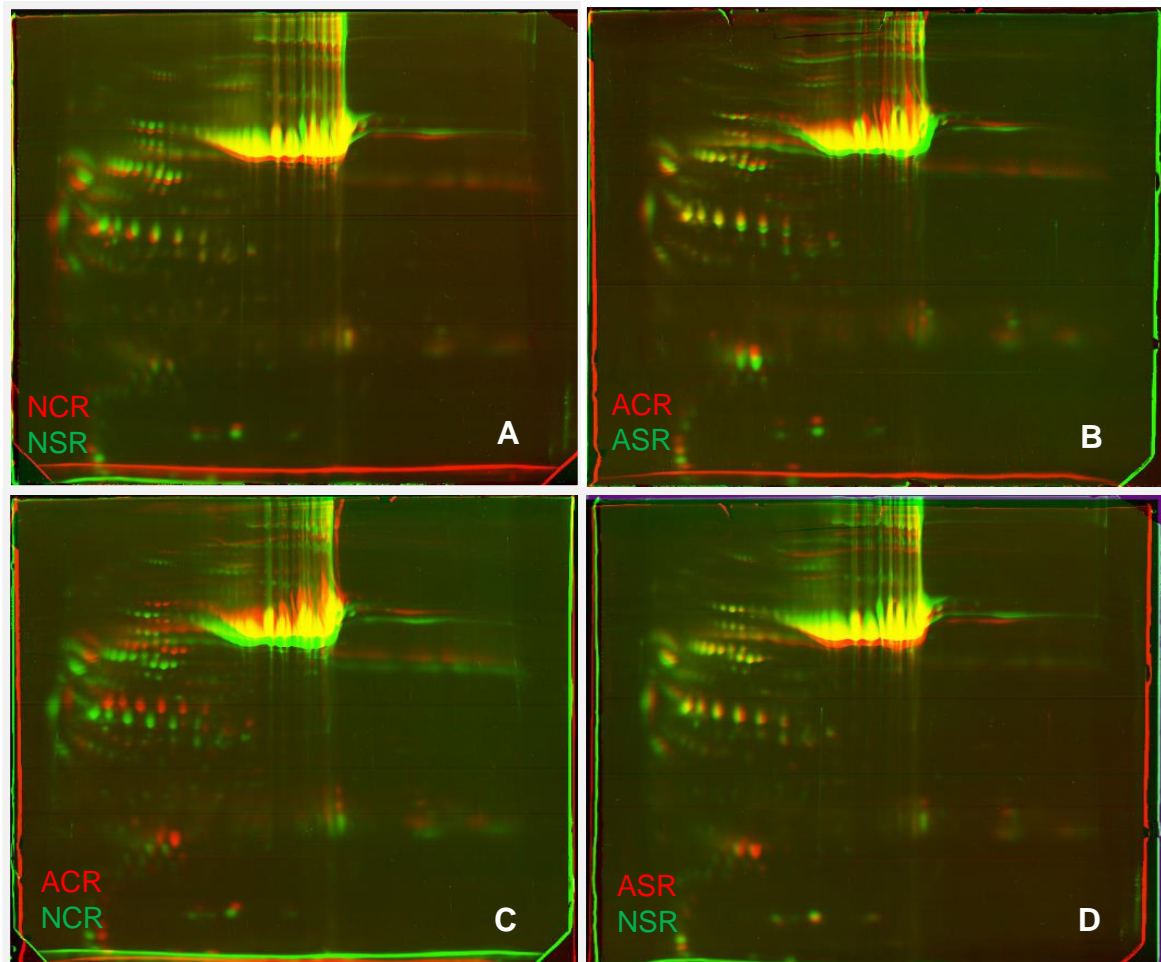


Figura 4. Imágenes virtuales generadas de la superposición de los geles 2D en presencia y ausencia de resistencia a la insulina. Cada condición fue marcada con un color, la superposición de puntos genera un color amarillo que indica la presencia de las proteínas en ambas condiciones comparadas. NCR: niños con resistencia a la insulina. NSR: niños sin resistencia a la insulina. ACR: adultos con resistencia a la insulina. ASR: adultos sin resistencia a la insulina.

Determinación del nivel de expresión diferencial de proteínas en presencia y ausencia de resistencia a insulina

Mediante el análisis digital con el software PD Quest V.8.0.1, las imágenes de los geles de cada una de las condiciones fueron comparadas y las proteínas con expresión diferencial fueron asignadas con un símbolo de color diferente con lo cual se pudo analizar dos condiciones por cada comparación (Tabla 1)

SÍMBOLO	CONDICIONES	No. DE SPOTS
	Comparación ASR vs ACR	214
	Comparación NSR vs NCR	238
	Comparación NSR vs ASR	283
	Comparación NCR vs ACR	243

Tabla 1. **Análisis comparativo de las de las condiciones.** Se detectaron un promedio de 250 proteínas expresadas diferencialmente en cada comparación.

Con las imágenes obtenidas de cada una de las condiciones, se generó una imagen virtual conocida como gel maestro, que localiza cada proteína en los cuatro geles obtenidos y su nivel expresión. En el gel maestro se genera un patrón general de expresión que concentra a todas las condiciones, y en las cuales se pueden observar condiciones que son redundantes, por lo que se observa el traslape de las señales en algunos de los puntos de expresión diferencial, sobre todo en condiciones asociadas a la resistencia a la insulina (Figura 5)

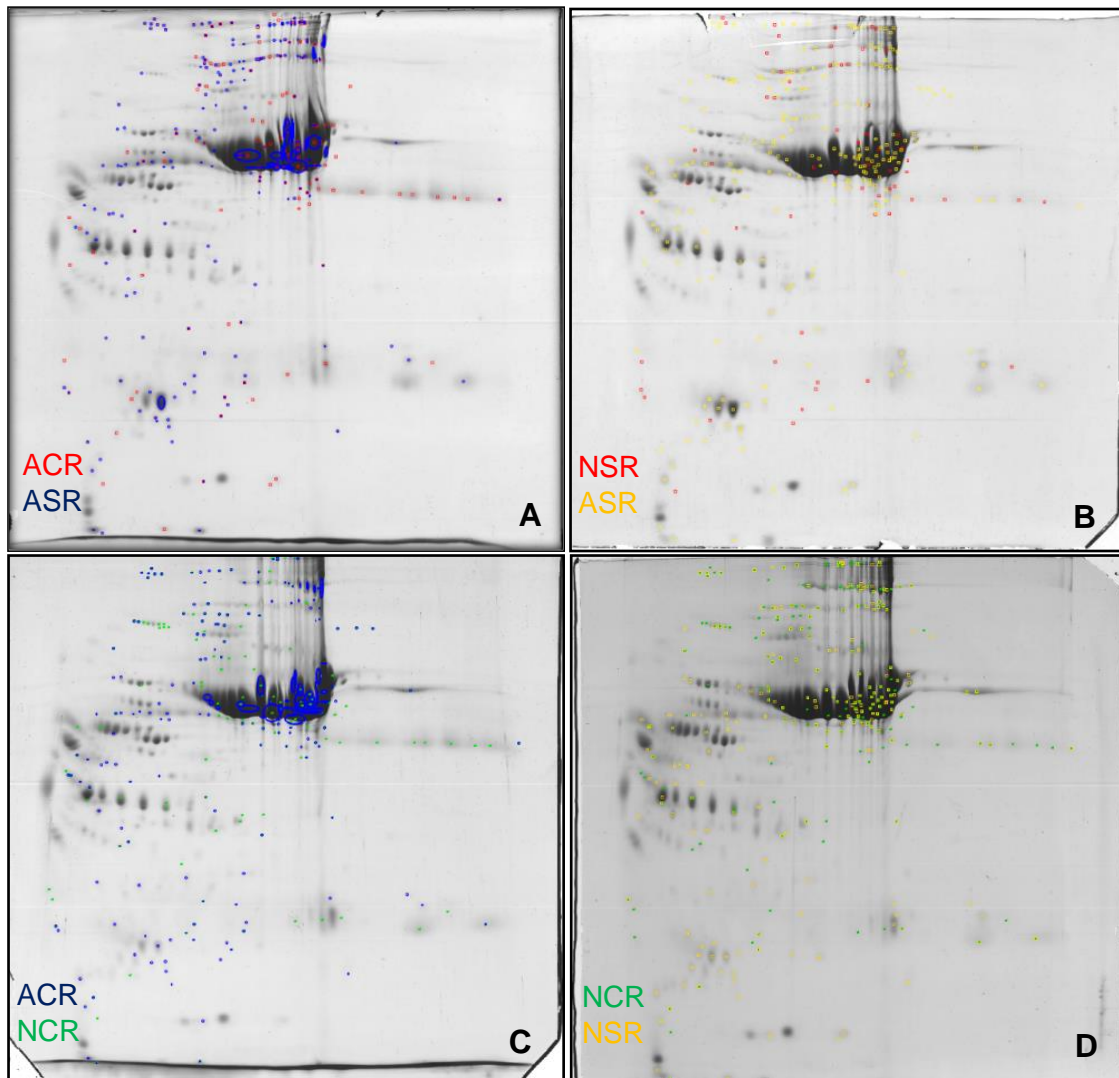


Figura 5. Imágenes virtuales generadas por la superposición de los geles de electroforesis 2D. Las proteínas sobreexpresadas fueron marcadas para realizar la comparación. NCR: niños con resistencia a la insulina. NSR: niños sin resistencia a la insulina. ACR: adultos con resistencia a la insulina. ASR: adultos sin resistencia a la insulina.

Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas expresadas diferencialmente.

De los 245 spots que en promedio se expresaron diferencialmente en cada condición comparada, fueron seleccionados 15 para su identificación mediante MALDI-TOF de los cuales 10 proteínas se identificaron con valores de score y cobertura estadísticamente significativos utilizando la base de datos MASCOT V2.2 (www.matrixscience.com) (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas de acuerdo al software Mascot (<http://www.matrixscience.com/>).

NOMBRE	PESO MOLECULAR TEÓRICO (PM _T)	PUNTO ISOELÉCTRICO TEÓRICO (PI _T)	SCORE	EXPECT	PEPTIDOS IDENTIFICADOS
Optineurina	65 922	5.12	58	0.039	M.SHQPLSCLTEK.E K.ELLTENHQLK.E K.EAMKLNQAMK.G K.EERQFFEIQSK.E R.MAEGEAEGSVK.E R.TVSTGTALSKYR.S K.LLQEHNNALK.T K.ALASKQLQMDMK.Q K.QLQMDMKQTIAK.Q+ OXIDACION (M) R.TSDSDQQA YLVQR.G
Complemento C3	187 148	6.02	73	0.00093	K.TIYTPGSTVLVLR R.IFTVNHK.L K.FYIYNEK.G K.GLEVTITAR.F R.ISLPESLKR.I K.RIPIEDGSGEVVLSR.K R.IPIEDGSGEVVLSR.K R.IPIEDGSGEVVLSR.V K.VLLDGVQNP.R.A R.TELRPGETLNVNFLR.M R.LVAYYTLIGASGQR.E K.IEGDHGAR.V R.VVLVAVDK.G K.LMNIFLK.D R.QGALELIK.K
Proteína no caracterizada misp3	24130	10.92	58	0.033	-.METPIEREIR.R+ OXIDACION (M) R.GLSPGRAGR.E R.ALERAR.A R.AGAQMQRDIER.E+ OXIDACION (M) R.ARSPPQPLGELK.R R.LPEPGRPRSAVQGGCR.V
Compañero de mTOR insensible a rapamicina	192 218	7.23	58	0.035	R.LQGVSNMRK.L R.LSDGFVAEAK.T R.ASAALNCLKR.F R.DQYLRVQK.D R.DGLARVILSK.I K.WHREYNYSK.Y K.TKQGC DILK.C K.SNSVSLVPPGSSHTLPRR.A R.FMKALSYASLDK.E K.QPIVD TSAES.-

Proteína con dominios de dedos de zinc 33b	90 683	8.6	56	0.046	K.SDEFNACGKLLLNK.H R.NTLSHRENTLQHEK.I K.LCLSQLQKGD.K.G R.THTGEKPFECLECGK.S R.THTGEKPYECNECGK.T K.SGLLHERK.H R.SHTGEKPYECNTRC.K
Alfa 1 antitripsina	46 737	5.37	69	0.0026	K.ITPNLAEFFSLYR.Q K.GKWERPFVK.D K.WERPFVK.D K.DTEEEEDFHVDQVTTVK.V K.FLENEDRR.S K.LSITGYDLK.S K.VFSNGADLSGVTEEAPLK.L K.VFSNGADLSGVTEEAPLK.S.A
Queratina tipo II de citoesqueleto 2 epidermal	65 433	8.07	57	0.042	R.GFSSGSVVSGGSR.R R.HGGGGGGFGGGGGFGSR.S K.SISISVAGGGGGFGAAGGFGR.G R.GGGFGGGSSFGGGSGFGGGFGGGFGGGR.F K.VDPEIQNVK.A K.RYLDGLTAER.T R.DYQELMNVKLALDVEIATYR.K R.GSSSGGGYSSGSSSYGSGGR.Q
Fosfatidilinositol 4 cinasa alfa	96 984	6.64	57	0.039	K.DCVVPYLLRLLK.G K.TSSVSSISQVSPER.G K.NDTVTPAELSELR.S R.LEYMRVLR.S K.VFDAFLNMMADK.A R.FSGTTGQMSDLNK.M K.MMVQDLHSALDR.S+ 2 OXIDACION (M) K.TNIYLDEEGHQK.D K.ITNVSAIKPYPK.G K.LTDEMVMIMGGK.M+ OXIDACION (M) K.LTDEMVMIMGGK.M+ 2 OXIDACION (M)
Citocromo b5 reductasa 4	59 474	7.6	59	0.028	K.VPLKQGR.S K.ECLVGRMAIKPAVLK.D+ OXIDACION (M) K.VLNGMLPK.S K.SQVTDTLAK.E K.IEIVLQK.K K.KENTSWDFLGHPLK.N K.DTGLYYR.K K.LMFFNK.T
Vinculina	124 302	5.50	56	0.051	K.RDMPPAFIK.V+ OXIDACION (M) K.NLPGGMTKMAK.M+ 2 OXIDACION (M) R.VMLVNSMNTVK.E K.MLGQMTDQVADLR.A+ OXIDACION (M) R.ELTPQVVSAARILLR.N K.TISPVMMDAKAVAGNISDPGLQK.S K.AGEVINQPMMAARQLHDEAR.K+ OXIDACION (M) K.RMALLMAEMSR.L

Análisis *in silico*

Una vez identificadas las proteínas, se procedió a realizar una búsqueda Bioinformática para determinar su función, localización subcelular y su probable papel en la resistencia a la insulina.

En primera instancia se revisaron las vías de señalización en las que participan las proteínas para determinar, si entre ellas existe una relación con algún proceso biológico importante. Reactome (<http://www.reactome.org/>) es una base de datos de acceso abierto, actualizada y revisada por pares en donde se encuentran integrados los procesos biológicos y las vías de señalización en los que participan proteínas reportadas en la investigación básica. El análisis mostró los procesos celulares en los que participan las proteínas identificadas son: Respuesta celular al estrés, Sistema Inmune, Síntesis de proteínas, Transporte de pequeñas moléculas, Transducción de señales, Homeostasis y Enfermedad (Figura 6).

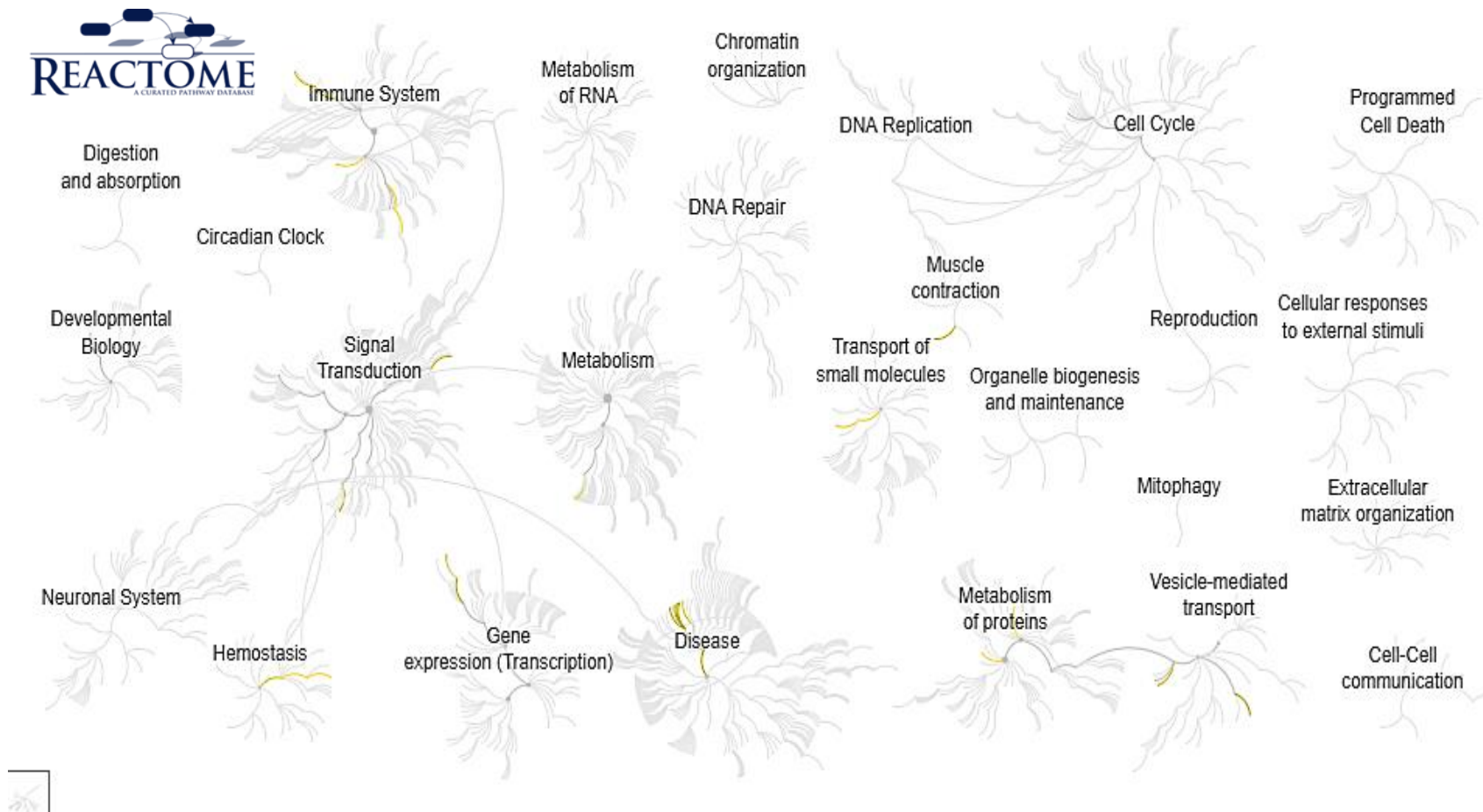


Figura 6. Procesos celulares que involucran a las 10 proteínas identificadas en pacientes con resistencia a insulina. La imagen muestra los principales procesos biológicos que se generan en la célula, en los cuales participa, se resaltan en amarillo los principales procesos celulares asociados a las proteínas analizadas *in silico*.

La localización subcelular y la función de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas se realizó con la ayuda de la base de datos UniProt (www.uniprot.org/), ésta es una base de datos que despliega toda la información relacionada con la proteína con evidencia experimental (Tabla 3).

Tabla 3. Localización subcelular y función de las proteínas.

NOMBRE	CÓDIGO UNIPROT	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	FUNCIÓN
Citocromo b5 reductasa 4 (CYB5R4)	Q7L1T6	Retículo endoplasmático	Implicada en la vía de respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Protección de las células beta del páncreas contra el estrés oxidativo. Reduce sustratos como el citocromo c y metahemoglobina.
fosfatidilinositol 4-cinasa alfa (PI4k)	P42356	Membrana celular	Producción del segundo mensajero inositol-1,4,5, -trifosfato
Queratina, tipo II de citoesqueleto epidermal 2 (KRT2)	P35908	Región extracelular Membrana celular Citosol	Proteína estructural de la epidermis. Contribuye a la cornificación terminal.
Alfa-1-antitripsina (A1AT)	P01009	Proteína secretada	Proteína de fase aguda con propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, y efectos antiapoptóticos. Inhibidor de serina proteasas principalmente la elastasa, pero también tiene afinidad por plasmina y trombina. La forma aberrante tiene actividad proteolítica contra insulina y plasmina.
Proteína con dominios de dedos de zinc 33b (ZNF33B)	Q06732	Núcleo	Probablemente participa en la regulación transcripcional
Compañero de mTOR insensible a rapamicina (RICTOR)	Q6R327	Citosol	Regula el crecimiento celular y la supervivencia en respuesta a hormonas. Componente del complejo mTORC2 que es crítico en la activación de AKT
Proteína no caracterizada MISP3	Q96FF7	ND**	ND*
Complemento C3 (C3)	P01024	Región extracelular	Activación del sistema de complemento, presentación del antígeno, interacciones célula-célula, y proliferación celular.
Optineurina (OPTN)	Q96CV9	Aparato de Golgi Endosoma	Mantenimiento del complejo de Golgi. Activación de la respuesta inmune innata en infecciones virales. Papel neuroprotector en ojo y nervio óptico.
Vinculina (VCL)	P18206	Membrana plasmática Citoesqueleto	Morfología celular Locomoción Regula la expresión de E-caderina

*ND. Para MISP3 sólo se tiene evidencia experimental a nivel del transcrito.

Para conocer la interacción directa o indirecta entre las proteínas identificadas, se realizó un interactoma proteico en la base de datos CytoScape V.3.6.0. a partir de los datos generados del análisis previo en la base de datos IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>). En la figura 7 se muestra el resultado de la interacción directa de 8 de las 10 proteínas identificadas, y su participación en procesos metabólicos, celulares, regulación biológica, respuesta a estímulos, biogénesis y procesos celulares diversos, mientras que sólo en 2 (ZNF33B y CYB5R4), no se cuenta con evidencia experimental de su asociación con las otras restantes.

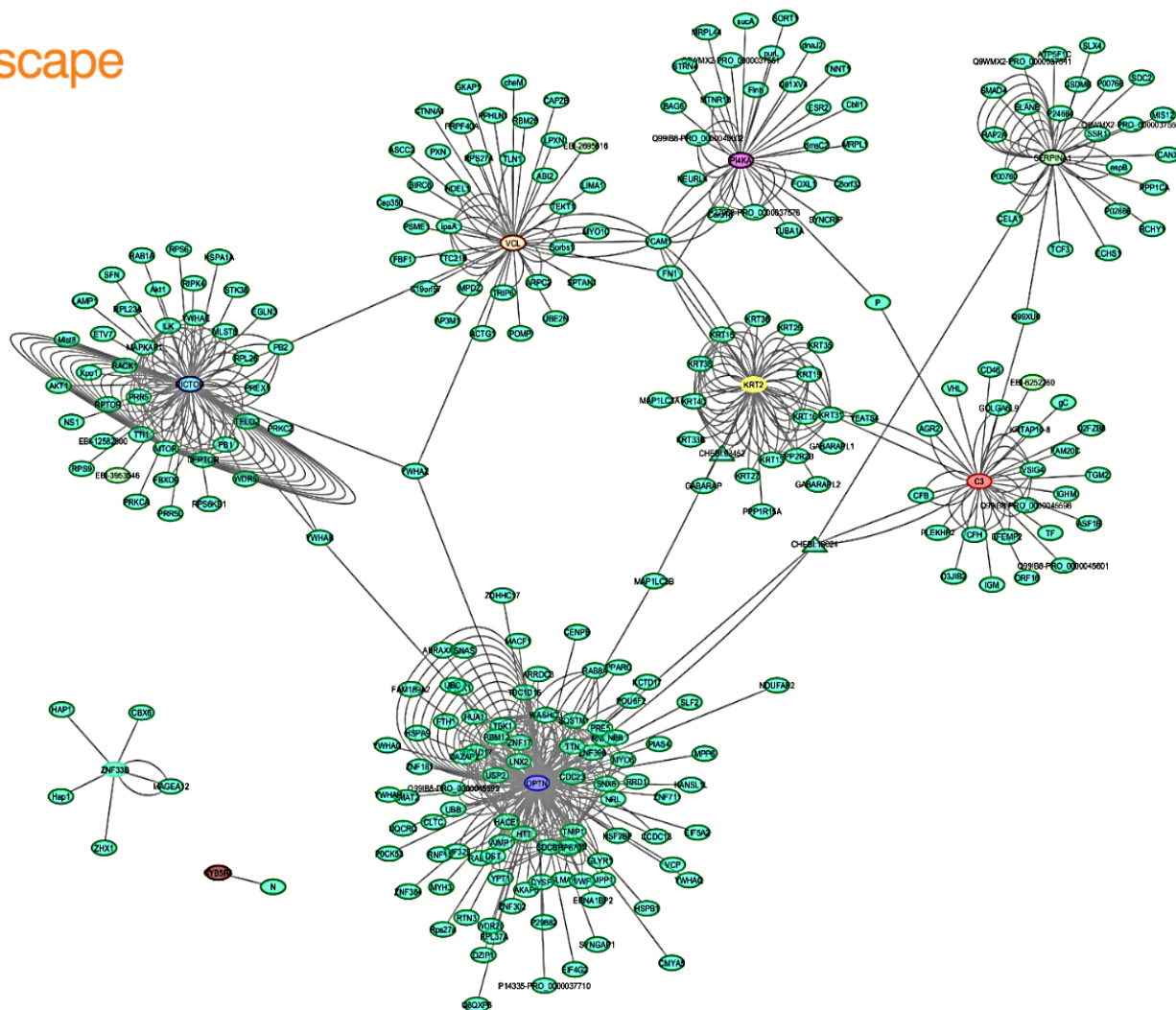


Figura 7. Análisis *in silico* de la interacción entre las proteínas identificadas. El interactoma construido en la base de datos Cytoscape muestra la red de interacciones, los nodos representan proteínas. Las conexiones entre las proteínas representan interacciones verificadas experimentalmente. Los nodos en verde indican interacciones funcionales (indirectas) secundarias e interacciones funcionales primarias.

Finalmente, se muestran los valores de expresión en términos de unidades arbitrarias de intensidad neta de las proteínas identificadas, resaltándose los valores de sobreexpresión con significancia estadística ($p < 0.05$) de cada proteína en las cuatro condiciones de análisis (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación semicuantitativa de la expresión de las proteínas en las condiciones de Resistencia a Insulina en Niños y Adultos en comparación con niños y adultos normales.

PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS MALDI-TOF						
*SSP	CÓDIGO UNIPROT	NOMBRE	ACR	ASR	NCR	NSR
7641	Q96CV9	Optineurina humana	360	77.8	260.6	406.1
1332	Q96FF7	Proteína no caracterizada misp3	3.8	238.3	1.7	35
2422	P01009	Alfa 1 antitripsina	7.7	36.1	44.2	46.6
8417	P35908	Queratina tipo II de citoesqueleto epidermal 2	22.8	0	0.3	3.3
8414	Q7L1T6	Citocromo b5 reductasa 4	479.9	20.2	255.7	7.1
2333	Q06732	Proteína con dominio de dedos de zinc 33b	837.1	908.9	501.4	3970.3
2621	Q6R327	Compañero de mTOR insensible a la rapamicina	245.2	241.3	136.2	587.1
8510	P01024	Componente 3 del complemento	649.6	690.1	129.7	9.9

*SSP: Coordenadas del "spot" en el gel maestro. ACR (Adultos con resistencia a la insulina), ASR (Adultos sin resistencia a la insulina), NCR (Niños con resistencia a la insulina), NSR (Niños sin resistencia a la insulina). Los valores de expresión están determinados como unidades arbitrarias de intensidad neta.

VI. DISCUSIÓN

Diversos mecanismos moleculares relacionados con la generación de resistencia a la insulina están asociados a factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, entre ellos, la lipotoxicidad, glucotoxicidad y el estrés oxidativo. Las alteraciones que inducen la señalización deficiente de la insulina incluyen mutaciones y modificaciones postraduccionales en el receptor, en IRS o en las diferentes proteínas que componen la vía de señalización localizadas río abajo. Las alteraciones más comunes en la resistencia a insulina son la disminución de receptores de insulina y de su actividad catalítica, el aumento de fosforilación en residuos de serina/treonina en IRS, el aumento de la actividad de las fosfatasa de tirosina, la disminución de cinasas como Akt, PI3K, y defectos en la expresión y función de GLUT4, todas estas alteraciones resultan en la reducción de la entrada de glucosa a las células de los tejidos blanco y la alteración a nivel metabólico (Gutiérrez-Rodelo *et al*, 2017).

El suero sanguíneo es un fluido biológico que contiene un proteoma bastante complejo, ya que, además de tener proteínas propias de la sangre, en él se encuentran otras proteínas provenientes de todas las células y tejidos del organismo, con un rango dinámico en el orden de las 10 magnitudes (Anderson & Anderson 2002). Por ser una muestra de fácil recolección mediante métodos no invasivos y de bajo costo, el suero resulta ser útil para determinar la expresión diferencial de proteínas en presencia o ausencia de muchas enfermedades. Diversos grupos de estudio han explorado las proteínas presentes en suero o plasma en pacientes y modelos animales con enfermedades metabólicas y las complicaciones derivadas de ellas como diabetes y aterosclerosis (Lepedda *et al.*, 2016), diabetes y retinopatías (Lu *et al.*, 2013) obesidad y diabetes (Kyohara *et al.*, 2017). En este trabajo se usó una columna de inmunoafinidad para la eliminación de proteínas abundantes en las muestras de suero, sin embargo, su eficiencia no fue adecuada ya que la cantidad de albumina e inmunoglobulinas presentes en los geles 2D aún era considerable. No obstante, se lograron identificar 10 proteínas con un valor de score significativo. Con base en los resultados, la proteína alfa 1

antitripsina (A1AT) se encontró con mayor expresión en niños y adultos sin resistencia a la insulina en comparación con niños y adultos con resistencia, de manera interesante la mayor diferencia en expresión se muestra entre el grupo de adultos con y sin resistencia a la insulina. La alfa 1 antitripsina es una proteína inhibidora de serina proteasas que muestra propiedades antiinflamatorias y antitrombóticas al igual que efectos antiapoptóticos (Stockley, 2015). A1AT se encontró disminuida en pacientes diabéticos con aterosclerosis y parece tener una función inhibidora de proteasas que protege contra la degradación de elastina de las paredes de los vasos sanguíneos (Lepedda *et al.*, 2016). En otro estudio realizado por Ramírez y Sánchez, los niveles séricos de A1AT no se relacionaron con el índice de resistencia a insulina en mujeres con y sin obesidad, lo que indica que esta proteína se expresa de manera independiente a la presencia de estas morbilidades (Ramírez & Sánchez 2014). La inflamación crónica y el aumento de la infiltración de células proinflamatorias sobre todo en tejido adiposo favorece la aparición de resistencia a la insulina, los neutrófilos son capaces de segregar proteasas como la elastasa neutrofílica y proteinasa, A1AT participa en la inhibición de estas 2 proteínas, por lo que la subexpresión de A1AT puede estar asociada a la resistencia a la insulina (Mansuy-Aubert *et al.*, 2013 Toonen *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la elastasa neutrofílica participa en la degradación del sustrato de receptor de insulina, por lo tanto, el desbalance entre esta proteína y su inhibidor la A1AT resulta en una transducción de señal y respuesta atenuada a la insulina (Talukdar *et al.*, 2012). lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos, en los cuales, los niveles de expresión de la proteína se encuentran disminuidos con respecto a la población sin resistencia a la insulina.

La citocromo b5 reductasa 4 (CYB5R4) se encontró mayormente expresada en niños y adultos con resistencia a la insulina comparados con niños y adultos sin resistencia. CYB5R4 es una proteína soluble de la familia de las flavo-hemoproteínas que se localiza en el retículo endoplasmático y tiene actividad reductora sobre diversos sustratos como citocromo C, ferrocianuro y metahemoglobina (Zhu *et al.*, 2004). Está implicada en la vía de respuesta al estrés del retículo endoplasmático y juega un papel importante en el mantenimiento de las

células beta pancreáticas posiblemente a través de la protección contra el exceso de especies reactivas del oxígeno. El estrés del retículo endoplasmático inducido por lipotoxicidad es uno de los mecanismos que puede inducir resistencia a la insulina y la pérdida de células beta pancreáticas. Zhang y colaboradores en 2010 mostraron que la función principal de la CYB5R4 es la protección de las células beta pancreáticas a través de la desaturación de ácidos grasos saturados responsables de generar el estrés del retículo endoplasmático y la subsecuente apoptosis (Zhang *et al.*, 2010). El estrés oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno también contribuye a la generación de estrés del retículo endoplasmático. La formación de enlaces disulfuro en las proteínas produce ión superóxido, en las células beta la generación de superóxido endógeno debe ser mayor debido a los 3 enlaces disulfuro que se forman en la insulina. En vista de la localización de CYB5R4 es probable que también tenga una función enzimática en el mantenimiento del estado redox del retículo endoplasmático (Xie *et al.*, 2004).

Optineurina (OPTN) se encontró con mayor expresión en muestras de niños sin resistencia a insulina, en muestras de adultos se encontró mayormente expresada en presencia de resistencia a la insulina. OPTN es una proteína adaptadora homóloga del modulador esencial de NFκB que se expresa en la mayoría de células y tejidos que también se ha identificado recientemente como un receptor de autofagia por daño mitocondrial y agregados proteicos (Slowicka *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la expresión de OPTN está mediada por la activación del complejo NFκB inducida por TNF-α y lo regula de manera negativa, en resistencia a la insulina diversas citocinas como IL-1 e IL-6 están aumentadas y su activación es una de las funciones de TNF-α, lo cual probablemente explique la sobreexpresión de OPTN obtenida en individuos con resistencia a insulina (Zhu *et al.*, 2007). De manera similar, la sobreexpresión de OPTN favoreció la supervivencia de células sometidas a estrés oxidativo, probablemente por la inhibición de la liberación de citocromo C que es un mecanismo pro-apoptótico derivado de las mitocondrias. Incluso OPTN fue capaz de cambiar su localización subcelular al núcleo por lo que podría regular directa o indirectamente su propia transcripción (De Marco *et al.*, 2006). El estrés oxidativo está relacionado con la resistencia a la insulina, esto

también podría explicar la sobreexpresión de OPTN en las muestras de suero de pacientes insulinoresistentes.

La proteína compañero de mTOR insensible a la rapamicina (RICTOR) forma parte del complejo mTORC2 y se ha demostrado que tiene un papel necesario para la fosforilación de AKT en serina 473 y treonina 308 que conlleva a su activación (Sarbasov *et al.*, 2005). La producción de especies reactivas de oxígeno por hiperglucemia en células hepáticas, demuestra jugar un papel importante en la incorrecta formación del complejo mTORC2, el complejo desasociado reduce la fosforilación de AKT y resulta en la aparición de hiperglucemia crónica, estrés oxidativo y resistencia a la insulina de manera generalizada, además parece ser que la expresión de RICTOR está regulada de manera positiva por la proteína sirtuina 1 (SIRT1) implicada en el metabolismo de la glucosa (Wang *et al.*, 2011). Incluso parece que RICTOR desempeña un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer, la cual también se ha asociado a la presencia de resistencia a la insulina, al favorecer la supervivencia celular mediante la inhibición de vías apoptóticas como las caspasas (Lee *et al.*, 2017).

La proteína con dominios de dedos de zinc 33B (ZNF33B) pertenece a la familia de proteínas de unión a DNA que probablemente participa en la regulación transcripcional. Debido a su función, la localización de esta proteína es en el núcleo celular, sin embargo, otros miembros de la superfamilia de proteínas con dedos de zinc se han encontrado en el suero y se han correlacionado de manera positiva con la adiposidad, índice HOMA, triglicéridos y valores de hemoglobina glucosilada. Además, probablemente pueda tener un papel en el deterioro de la señalización y en la generación de resistencia a la insulina, aunque los mecanismos no están dilucidados (Jia *et al.*, 2014).

Fosfatidilinositol-4 cinasa alfa (PI4K) es una cinasa lipídica que participa en la generación de fosfolípidos precursores del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3,4,5P₃) en la membrana celular (Bar-Lev *et al.*, 2015). La generación de PI3,4,5P₃ es un punto clave en la transducción de la señal por insulina mediante la vía PI3K, PDK1 y AKT se unen en la membrana plasmática a través de PI3,4,5P₃,

como resultado AKT se fosforila y activa, desasociándose de la membrana y fosforilando diversos sustratos (Eyster, 2007). Uno de los resultados de la activación de AKT es la traslocación de transportadores GLUT4 a la membrana favoreciendo la entrada de glucosa a células blanco de la insulina. Aunque es posible que PI4K no sea la única cinasa que participa en la generación de precursores de PI3,4,5P₃ (Bulley *et al.*, 2016), su disminución probablemente esté implicada en la atenuación de la transducción de la señalización y generación de resistencia a la insulina.

Componente 3 del complemento (C3) es una proteína plasmática con un papel central en la activación del sistema del complemento. Se ha relacionado de manera positiva los elevados niveles séricos de C3 con los componentes del síndrome metabólico e incluso se ha propuesto como biomarcador sinérgico para la resistencia a la insulina (Al-Domi & Al Haj Ahmad, 2017)

Vinculina es una proteína estructural que participa en la locomoción y es parte importante de la morfología celular. En presencia de diabetes esta proteína se ha encontrado disminuida en su expresión (Yohannes *et al.*, 2008). Diversas proteínas que tienen función estructural son secretadas de la célula en traumatismos y otras situaciones de estrés que conducen a apoptosis, por esta razón pueden ser detectadas en muestras de suero.

La resistencia a la insulina se considera como una condición precedente para el establecimiento de la diabetes mellitus tipo II y su presencia se ha asociado en gran medida a la obesidad, sin embargo, no hay reportes en los que se aborde un análisis proteómico diferencial en suero de individuos insulino-resistentes en ausencia de otras co-morbilidades como obesidad y diabetes, en este campo nuestro análisis constituye el primer informe de expresión diferencial de proteínas en una población joven no diabética, con normo peso y con resistencia a la insulina comparados con población control que no presenta la condición.

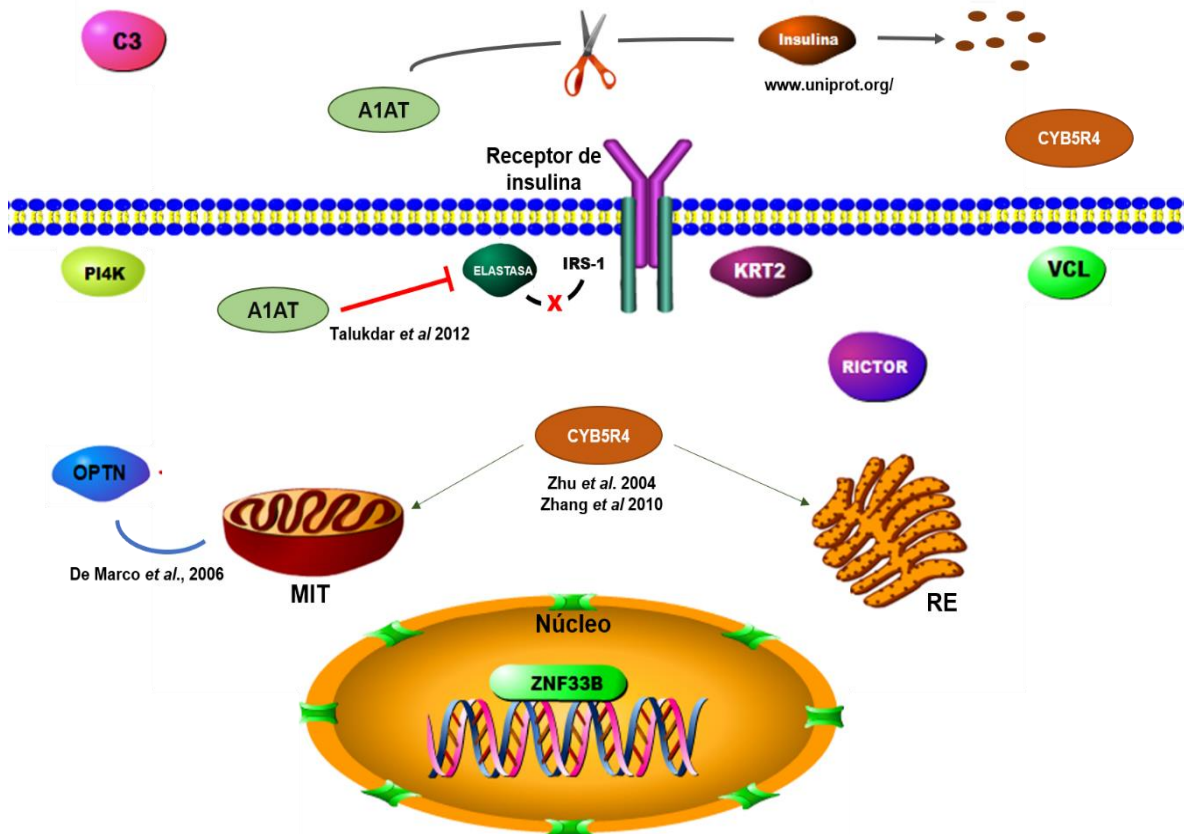


Figura 8. Modelo propuesto de las proteínas identificadas y su función e interacción con la resistencia a la insulina. Las acciones de la insulina están reguladas por diversas proteínas en el espacio intracelular así como en el microambiente extracelular. La proteína alfa 1 antitripsina (A1AT) es una proteína soluble que en su forma aberrante tiene acción proteolítica contra la insulina. De manera normal, A1AT inhibe la acción de la elastasa neutrofílica que a su vez participa en la degradación del sustrato de receptor de insulina (IRS-1) y deteriora la transducción de la señal. La citocromo B5 reductasa 4 es otra proteína plasmática que en el espacio intracelular de las células pancreáticas tiene una función de protección contra lipotoxicidad y producción de especies reactivas de oxígeno. Optineurina (OPTN) juega un papel importante en la supervivencia celular a través de la inhibición de la liberación de citocromo C inducida por estrés oxidativo, uno de los procesos relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina. Componente 3 del complemento (C3) es otra proteína plasmática que se ha propuesto como marcador de resistencia a la insulina. Las proteínas compañeras de mTOR insensible a rapamicina (RICTOR), fosfatidil 4 cinasa alfa (PI4K), queratina tipo II de citoesqueleto epidermal 2 (KRT2), vinculina (VCL), y proteína con dominios de dedos de zinc 33B (ZNF33B) son proteínas de localización intracelular que participan en procesos como señalización, regulación de la transcripción o que forman parte de la estructura celular, los mecanismos implicados pueden relacionarse indirectamente con la resistencia a la insulina y su determinación en suero probablemente sea producto del estrés celular u otros procesos derivados de la condición.

VII. CONCLUSIÓN

Se identificaron 10 proteínas diferencialmente expresadas en suero de niños y adultos con y sin resistencia a la insulina. El análisis bioinformático muestra que estas proteínas parecen participar en procesos que se han relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina, como el estrés de retículo endoplasmático, el deterioro de la señalización de la insulina, e incluso, la fragmentación de la insulina por proteínas con actividad proteolítica, por lo que su expresión diferencial podría estar relacionada con la presencia o ausencia de esta condición.

VIII. REFERENCIAS

- Al-Domi, H. A. & Al Haj Ahmad, R. M. (2017). Association between complement component C3 and body composition: a possible obesity inflammatory biomarker for insulin resistance. *Hayder Asia Pac J Clin Nutr* 2017;26(6):1082-1087
- Anderson, N. L. & Anderson, N. G. (2002). The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects *Mol & Cell Proteomics*, 1, 845-867.
- Bar-Lev, T. H., Harris, D., Tomić, M., Stojilkovic, S., Blumenfeld, Z., Brown, P., et al. (2015). Role of PI4K and PI3K-AKT in ERK1/2 activation by GnRH in the Pituitary Gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol*, 415, 12–23. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.029>
- Bose, S. K., Shrivastava, S., Meyer, K., Ray, R. B., Ray, R. (2012) Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J Virol*. 2012;86:6315–6322.
- Bulley, S. J., Droubi, A., Clarke, J. H., Anderson, K. E., Stephens, L. R., Hawkins, P. T., & Irvine, R. F. (2016). In B cells, phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase- α synthesizes PI(4,5)P₂ to impact mTORC2 and Akt signaling. *PNAS*, 113(38), 10571–10576. <http://doi.org/10.1073/pnas.1522478113>
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-1 and NF- κ B. *Nat Med*, 11, 183-190.
- Cameron, A. J., Magliano, D. J., Zimmet, P. Z., Welborn, T. A., Colagiuri, S., Tonkin, A. M., et al (2008) The metabolic syndrome as a tool for predicting future diabetes: The AusDiab study. *J Intern Med*, 264, 177-186.
- Carpenter, L., Cordery, D. & Biden, T. J. (2001) Protein Kinase C δ Activation by Interleukin-1 β Stabilizes Inducible Nitric-oxide Synthase mRNA in Pancreatic β -Cells. *J. Biol. Chem*, 276, 5368-5374.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J. C., Jörns, A., Lenzen, S. & Eizirik, D. L. (2005) Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 54, S97-S107.
- Cui, J. W., Wang, J., He, K., Jin, B. F., Wang, H. X., Li, W., et al. (2004) Proteomic analysis of human acute leukemia cells. *Clin Cancer Res*. 10, 6887.
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., Andres, R. (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 237, E214-E223.
- De Luca, C. & Olefsky, J. M. (2008) Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS lett*. 582, 97-105.
- De Marco, N., Buono, M., Troise, F., Diez-Roux, G. (2006) Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus. *Biol Chem*, 281(23):16147-56. doi:10.1074/jbc.M601467200
- Dineley, K. T., Jahrling, J. B. & Denner, L. (2014) Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, 72, Part A, 92-103.

- Eyster, K. M. (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ*, (1):5-16. DOI:10.1152/advan.00088.2006
- El-Zayadi, A. R. & Anis, M. (2012) Hepatitis C virus induced insulin resistance impairs response to anti viral therapy. *World J Gastroenterol*, 18(3):212-24. doi: 10.3748/wjg.v18.i3.212
- Everett, C. J. & Matheson, E. M. (2010) Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Int.*, 36(4), 398-401.
- Galgani, J. E., Ravussin, E. (2012) Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia*, 55, 737-742.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87(1), 99-109.
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., Olivares, J. A. (2017) Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac Med Mex.*, 153, 214-28.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Saecker, A., et al. (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493, 674-678.
- Heneka, M. T., O'banion, M. K., Terwel, D. & Kummer, M. P. (2010) Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 117, 919-947.
- Himsworth, H. P. (2013) Diabetes mellitus: Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Int. J. Epidemiol*, 42, 1594-1598.
- Jia, Y., Yuan, L., Hu, W., Luo, Y., Suo, L., Yang, M., et al. (2014) Zinc-finger BED domain-containing 3 (Zbed3) is a novel secreted protein associated with insulin resistance in humans. *J Intern Med*. 275(5):522-33. doi: 10.1111/joim.12170.
- Kawaguchi, T., Yoshida, T., Harada, M., Hisamoto, T., Nagao, Y., Ide, T., et al. (2004) Hepatitis C Virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3. *Am J Pathol*, 165, 1499-1508.
- Khurana, M., Traum, A. Z., Aivado, M., Wells, M. P., Guerrero, M., Grall, F., et al. (2006) Urine proteomic profiling of pediatric nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 21, 1257-1265.
- Kim, H. J., Cho, E. H., Yoo, J. H., Kim, P. K., Shin, J. S., Kim, M. R., et al. (2007) Proteome analysis of serum from type 2 diabetics with nephropathy. *J Proteome Res*, 6, 735-743.
- Kyohara, M., Shirakawa, J., Okuyama, T., Kimura, A., Togashi, Y., Tajima, K., (2017) Serum Quantitative Proteomic Analysis Reveals Soluble EGFR To Be a Marker of Insulin Resistance in Male Mice and Humans. *Endocrinology*. 158(12):4152-4164. doi: 10.1210/en.2017-00339.
- Lasram, M. M., Dhouib, I. B., Annabi, A., El Fazaa, S., Gharbi, N. (2014) A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 1;322:1-13. doi: 10.1016/j.tox.2014.04.009.

- Lee, H. K., Kwon, B., Lemer, C. A., de la Monte, S., Itamura, K., Ha, A. Y., et al. (2017). mTORC2 (Rictor) in Alzheimer's Disease and Reversal of Amyloid- β Expression-Induced Insulin Resistance and Toxicity in Rat Primary Cortical Neurons. *J Alzheimers Dis.*, 56(3), 1015–1036. <http://doi.org/10.3233/JAD-161029>
- Lepedda, A. J., Lobina, O., Rocchiccioli, S., Nieddu, G., Ucciferri, N., De Muro, P., et al (2016) Identification of differentially expressed plasma proteins in atherosclerotic patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* (5):880-6. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.03.007.
- Lu, C. H., Lin, S. T., Chou, H. C., Lee, Y. R., Chan, H. L. (2013). Proteomic analysis of retinopathy-related plasma biomarkers in diabetic patients. *Arch Biochem Biophys.* 529(2):146-56. doi: 10.1016/j.abb.2012.11.004.
- Mansuy-Aubert, V., Zhou, Q. L., Xie, X., Gong, Z., Huang, J. Y., Khan, A. R., et al (2013). Imbalance between Neutrophil Elastase and its Inhibitor α 1-Antitrypsin in Obesity Alters Insulin Sensitivity, Inflammation, and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), 534–548. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.005>
- Matsuda, M. (2010) Measuring and estimating insulin resistance in clinical and research settings. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 20, 79-86.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R.C. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412–419.
- Mostafalou, S., Eghbal, M. A., Nili-Ahmadabadi, A., Baeri, M., Abdollahi, M. (2011) Biochemical evidence on the potential role of organophosphates in hepatic glucose metabolism toward insulin resistance through inflammatory signaling and free radical pathways. *Toxicol Ind Health.*, 28, 840-851.
- Mullen, E., Ohlendieck, K. (2010) Proteomic profiling of non-obese type 2 diabetic skeletal muscle. *Int J Mol Med.*, 25, 445-458.
- Nomiyama, T., Igarashi, Y., Taka, H., Mineki, R., Uchida, T., Ogihara, T., et al. (2004) Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 320, 639-647.
- Pauli, J. M., Raja-Khan, N., Wu, X. & Legro, R. S. (2011) Current perspectives of insulin resistance and polycystic ovary syndrome. *Diabetic Med.*, 28, 1445-1454.
- Petyuk, V. A., Qian, W. J., Hinault, C., Gritsenko, M. A., Singhal, M., Monroe, M. E., et al. (2008) Characterization of the mouse pancreatic islet proteome and comparative analysis with other mouse tissues. *J Proteome Res.*, 7, 3114-3126.
- Ramírez-Alvarado, M. M., Sánchez-Roitz, C. (2014) Relación entre los niveles séricos de proteína C reactiva y α 1-antitripsina y la resistencia a la insulina en mujeres con obesidad. *Inves Clin*, vol. 55, núm. 3, pp. 249-259
- Saltiel, A. R., Kahn, C. R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M.(2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307(5712):1098-101. doi:10.1126/science.1106148

- Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tsutsumi, T., Tsukamoto, K., Kimura, S., et al. (2004) Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology*, 126, 840-848.
- Shoelson, S. E., Herrero, L. & Naaz, A. (2007) Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*, 132, 2169-2180.
- Slowicka, K., Vereecke, L., van Loo, G. 2016 Cellular Functions of Optineurin in Health and Disease. *Trends Immunol.* 621-633. doi: 10.1016/j.it.2016.07.002.
- Stockley, R. A. (2015) The multiple facets of alpha-1-antitrypsin *Ann Transl Med.* 130. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.04.25
- Talukdar, S., Oh, D. Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Olefsky, J. M. (2012). Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. *Nat Med.*, 18(9), 1407–1412. <http://doi.org/10.1038/nm.2885>
- Toonen, E. J., Mirea, A. M., Tack, C. J., Stienstra, R., Ballak, D. B., van Diepen, J. A., et al (2016). Activation of Proteinase 3 Contributes to Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Mol Med.*, 22, 202–214. <http://doi.org/10.2119/molmed.2016.00033>
- Wang, R. H., Kim, H. S., Xiao, C., Xu, X., Gavrilova, O., & Deng, C. X. (2011). Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest.*, 121(11), 4477–4490. <http://doi.org/10.1172/JCI46243>
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., et al. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 14(1), 61-5.
- Xie, J., Zhu, H., Larade, K., Ladoux, A., Seguritan, A., Chu, M., et al (2004). Absence of a reductase, NCB5OR, causes insulin-deficient diabetes. *PNAS.*, 101(29), 10750–10755. <http://doi.org/10.1073/pnas.0404044101>
- Youngren, J. F. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 873.
- Zhang, Y., Larade, K., Jiang, Z., Ito, S., Wang, W., Zhu, H., et al (2010). The flavoheme reductase Ncb5or protects cells against endoplasmic reticulum stress-induced lipotoxicity. *J Lipid Res.*, 51(1), 53–62. <http://doi.org/10.1194/jlr.M900146-JLR200>
- Zhu, G., Wu, C. J., Zhao, Y., Ashwell, J. D. (2007) Optineurin negatively regulates TNFalpha- induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Curr Biol.* 17(16):1438-43. doi:10.1016/j.cub.2007.07.041
- Zhu, H., Larade, K., Jackson, T. A., Xie, J., Ladoux, A., Acker, H., et al (2004). NCB5OR Is a Novel Soluble NAD(P)H Reductase Localized in the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*, 279(29), 30316–30325. <http://doi.org/10.1074/jbc.M402664200>