

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Caracterización de la respuesta de angiotensina II en la vía de
señalización de insulina en adipocitos aislados de epidídimo de ratón**

TESIS QUE PRESENTA

L.N. NICOLE JUSTINE MORENO LICONA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOQUÍMICA

DIRECTOR DE TESIS:

JESÚS ALBERTO OLIVARES REYES

CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE, 2019

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Transducción de Señales del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y con el apoyo técnico de las biólogas Judith Hernández Aranda y Esperanza Jiménez Barrón. Durante el desarrollo del mismo la autora fue becaria CONACYT (No. 632503). Este trabajo fue parcialmente apoyado por el donativo 167673 SEP/CONACYT

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud al doctor Alberto Olivares porque gracias a su apoyo fue posible la realización de este trabajo, la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo fue una experiencia de crecimiento y aprendizaje profesional y personal, sin su paciencia y consejos no hubiera sido posible la elaboración de este proyecto.

A mis asesores la doctora Angelica Rueda y Rafael Villalobos por sus revisiones y gran disponibilidad para visitarlos y revisar los pendientes que tuviera sobre el proyecto.

A mis compañeras de laboratorio Karina, Huguet, Paola, Fernanda y Karla que me apoyaron en el aprendizaje de laboratorio con paciencia, solidaridad, ternura y cariño.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de Transducción de Señales: Ju, Paty y Esperanza porque su apoyo técnico fue esencial para la elaboración del proyecto, además de ser grandes personas de las que me llevo una linda enseñanza.

Al colegio de profesores por su enseñanza durante las materias que me brindaron nuevos conocimientos y herramientas.

A Pris, Angie, Iety y Rocío por su apoyo en todos los trámites que realice para el posgrado.

A mis amigos de generación Cristian, Vicente, Jesús y Jessica que me apoyaron incondicionalmente durante los dos años de maestría.

A mi familia, que es lo más importante, mi madre por su apoyo incondicional en momentos difíciles y de enfermedad, a mi abuela que es como mi segunda madre, a mi hermana y mis tíos que son mi familia nuclear, a Alejandro y su familia que son como parte de mi familia.

Y finalmente al Conacyt por la beca otorgada durante el posgrado.

Porque sin todo el apoyo recibido no hubiera sido posible esta meta.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La hormona insulina, características y función	1
1.2 Características del receptor de insulina	3
1.3 Mecanismos moleculares de la vía de señalización de IR activada por la unión de insulina....	4
1.3.1 Vía de señalización de cinasas activadas por mitógeno.....	7
1.3.2 La vía de señalización de PI3K	8
1.4 Mecanismos de regulación de la vía de insulina	8
1.5 El sistema Renina-Angiotensina (RAS)	9
1.6 El tejido adiposo	12
2.- ANTECEDENTES	13
3.- JUSTIFICACION	19
4.- HIPÓTESIS.....	19
5.- OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
6.- MATERIALES Y METODOS	20
6.1 Obtención de adipocitos aislados	20
6.2 Estímulos con insulina	21
6.3 Estímulos con Ang II	21
6.4 Uso de Inhibidores	21
6.5 Lisado de los adipocitos para detener los estímulos	21
6.6 Cuantificación de proteínas	22
6.7 Western Blot	22
6.8 Obtención de imágenes en el microscopio digital	23
6.9 Análisis de resultados.....	24
7.- RESULTADOS	25
7.1 Caracterización de los adipocitos aislados.....	25

7.2	Estandarización de condiciones experimentales	25
7.3	El efecto de insulina	27
7.4	Efecto de angiotensina II	28
7.5	Efecto de angiotensina con insulina.....	29
7.6	Uso de inhibidores	31
8.-	DISCUSIÓN.....	33
9.-	CONCLUSIONES	36
10.-	PERSPECTIVAS	37
11.-	ANEXOS	37
12.-	BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Angiotensina II (Ang II)

Bisindolylmaleimida (BIM 1)

Dominio de homología de pleckstrina (PH)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)

Fosfatasas de residuos de tirosina (PTP's)

Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCR's)

Receptor con actividad de cinasa de tirosina (RTK)

Receptor de Angiotensina 1 (AT₁R)

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Receptor de insulina (IR)

Proteína cinasas C (PKC's)

Sistema Renina-Angiotensina (RAS)

Sustrato del receptor de insulina (IRS)

Tirosina (Tyr)

RESUMEN

Una de las vías más importantes en la homeostasis energética es la vía de señalización de la insulina, que regula la glucemia y es conocido que sus acciones son reguladas a través de mecanismos de regulación homóloga y heteróloga. Dentro de los mecanismos de regulación heteróloga se ha contemplado en diversos modelos celulares la participación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's). La evidencia del efecto de la hormona angiotensina II (Ang II) en la señal de insulina en diversos modelos celulares es vasta, mostrando un tipo de regulación negativa mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno a diferentes niveles de la cascada de señalización, principalmente en células vasculares. Sin embargo, en células adiposas la evidencia es escasa y controversial a pesar de la existencia de estudios que muestran una asociación entre el tejido adiposo y el sistema renina-angiotensina (RAS), y que podría participar en la patogénesis de la obesidad y la resistencia a la insulina. En este estudio evaluamos el efecto que tiene Ang II en la vía de señalización de insulina en células adiposas aisladas de tejido epididimal de ratón. Para esto se estandarizó el protocolo de aislamiento de adipocitos para después evaluar el efecto que genera Ang II sobre la vía de insulina, nuestros resultados muestran una regulación negativa por disminución en la fosforilación del receptor de insulina (IR) y, consecuentemente, de proteínas localizadas río abajo en la vía de señalización. Este efecto fue revertido con inhibidores de PKC's clásicas y nuevas, lo que sugiere que estas cinasas tienen un papel importante en el proceso de regulación.

ABSTRACT

One key signaling transduction pathway in energy homeostasis is the insulin signaling cascade that regulates plasma glucose levels. The impairment in insulin response in adipocytes leads to an imbalance that is associated with several metabolic diseases. Studies performed in patients with metabolic syndrome showed that the levels of Angiotensin II (AngII), an octapeptide generated by the renin-angiotensin system (RAS), are increased in adipose tissue suggesting that this hormone is involved in the pathogenesis of obesity and insulin resistance. However, the mechanism associated with Ang II actions on insulin signaling in fat cells is still unclear. Thus, our work is focused on demonstrating that Ang II may exert detrimental effects on insulin signaling in isolated adipocytes from mouse epididymis. Firstly, we standardized the experimental protocol for adipocyte isolation. Secondly, we evaluated the effect that Ang II on the insulin signaling pathway. Our results show a negative regulatory effect of Ang II on the insulin receptor cascade. We found a decrease in the phosphorylation of the insulin receptor (IR) and consequently from proteins located downstream the IR signaling pathway. This effect was reversed by classic and new PKC's inhibitors, suggesting that these kinases play an important role in the regulatory process.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 La hormona insulina, características y función

La insulina es una proteína de 51 aminoácidos con actividad hormonal anabólica que desempeña un papel central en la regulación del metabolismo, pues controla las funciones energéticas esenciales, como el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Figura 1, Tabla 1).

La insulina es secretada por las células β en los islotes de Langerhans pancreáticos y es el producto biosintético de su precursor la preproinsulina, cuya proteólisis se consolida con el tráfico entre compartimentos celulares desde ribosomas del retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi (Weiss M *et al.*, 2014), donde se escinde la estructura del péptido y se unen los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro concluyendo con la formación de insulina.

Con la elucidación de la secuencia de aminoácidos de insulina por Sanger a en los 1953s, se supo que la insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas: A y B. En la Figura 1 se muestra la estructura de la hormona y se representan las dos cadenas, la cadena A contiene 21 residuos de aminoácidos unida por dos enlaces disulfuro a la cadena B, la cual tiene 30 residuos de aminoácidos (enlaces A7-B7 y A20-B19) (Weiss M *et al.*, 2014; Sanger F, 1977).

Las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos funcionan como un sensor energético en general y de la glucemia en particular. La síntesis y liberación de insulina se estimula al integrar señales desde la llegada del alimento al tracto digestivo hasta su absorción como, por ejemplo: el aumento de glucemia y de otros metabolitos en plasma, secreción de hormonas gastrointestinales y enzimas digestivas, activación de nervios parasimpáticos, etc. (Ward C y Lawrence M, 2011).

La insulina tiene un impacto en el metabolismo energético, regulando la síntesis de glucógeno, triglicéridos y proteínas; por otra parte, estimula la captación, almacenamiento y consumo de glucosa en casi todos los tejidos del cuerpo, pero sobre todo en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (en la Tabla 1 se enlistan las funciones de insulina en diferentes tejidos). Debido a su vital importancia, un desequilibrio en la función de la

hormona conlleva a diversas enfermedades, por lo que comprender la actividad de la hormona a nivel molecular es un blanco terapéutico para el tratamiento de diversas enfermedades.

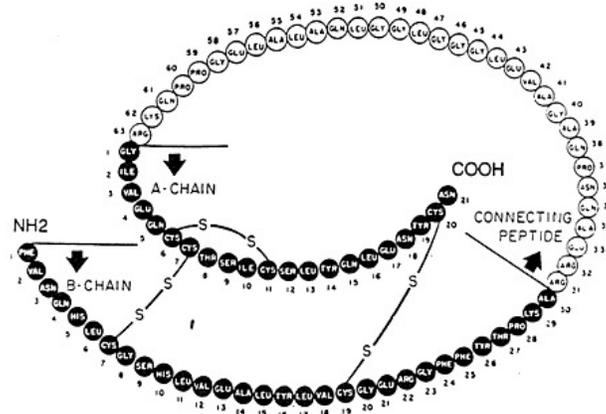


Figura 1. Estructura de la insulina human. Estructura primaria de la insulina, se muestran sus dos cadenas polipeptídicas compuestas por 51 aminoácidos, unidas por sus dos enlaces disulfuro (Weiss M *et al.*, 2014)

Su acción a nivel celular se da al unirse a su receptor, una glicoproteína una glicoproteína compuesta de varias subunidades, una de ellas transmembrana, con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (Figura 2). La cantidad de receptores de insulina es variable en función del tipo celular: en células que responden a la demanda del metabolismo energético es mayor, como por ejemplo el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo (Müller-Esterl, 2008).

Tabla 1. Funciones de insulina en diversos tejidos		
Hígado	Músculo	Tejido Adiposo
<ul style="list-style-type: none"> Incrementa la actividad y estimula la síntesis de la glucocinasa, favoreciendo la utilización de la glucosa. Aumenta la vía de las pentosas que aporta NADPH al estimular a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. 	<ul style="list-style-type: none"> Estimula la entrada de glucosa (por translocación de los GLUT 4 hacia la membrana). Aumenta la glucólisis por estimulación de la 	<ul style="list-style-type: none"> Estimula la captación (a través de GLUT 4) y utilización de glucosa por el adipocito. Aumenta la vía de las pentosas que aporta NADPH al estimular a la

<ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la glucólisis por estimulación de la glucocinasa, fosfofructocinasa I y de la piruvatocinasa. • Favorece la síntesis de glucógeno, estimulando la actividad de la glucógeno sintetasa (GS). • Reduce la gluconeogénesis, al disminuir principalmente la síntesis de la fosfo-enol-piruvato-carboxicinas (PEPCK). • Estimula la síntesis de proteínas. • Aumenta la síntesis de lípidos, al estimular la actividad de la ATP citrato liasa, acetil-CoA-carboxilasa, “enzima málica” y de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa. • Inhibe la formación de cuerpos cetónicos. 	<p>fosfofructocinasa I y de la piruvatocinasa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estimula la síntesis de glucógeno al estimular la actividad de la GS. • Favorece la entrada de aminoácidos a la célula y su incorporación a las proteínas, estimula la síntesis e inhibe el catabolismo de proteínas. • Estimula la captación y utilización de los cuerpos cetónicos. • La insulina estimula la bomba Na⁺ /K⁺, lo que favorece la entrada de K⁺ a las células 	<p>glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Favorece la captación de ácidos grasos al estimular a la enzima lipoproteínalipasa 1, que degrada los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas. • Estimula la síntesis de triglicéridos (al promover la glucólisis y la vía de las pentosas) e inhibe los procesos de lipólisis, por lo que se favorece la acumulación de éstos en los adipocitos
---	--	--

Tabla de elaboración propia, modificada de: Müller-Esterl 2008

1.2 Características del receptor de insulina

El receptor de insulina (IR por sus siglas en inglés), es un receptor transmembranal que consta de dos subunidades- α localizadas del lado extracelular (135 kDa) y dos subunidades- β transmembranales (95 kDa) unidas por enlaces disulfuro (Weiss M *et al.*, 2014). El IR es una enzima alostérica con actividad de cinasa de tirosina.

En su forma inactiva, el receptor tiene una conformación estructural en forma de V invertida (Figura 3) donde sus dominios extracelulares α se encuentran de manera unida y sus dominios transmembranales β separados. Cuando se une la insulina del lado extracelular, hay una transposición estructural del dominio extramembranal que se propaga a los dominios transmembrana, permitiendo su aproximación entre sí (Gutmann T *et al.*, 2018), lo que

facilita su actividad enzimática y la autofosforilación de los dominios citoplasmáticos de la cinasa.

Una vez activo el IR inicia la actividad intrínseca de cinasa de tirosina que autofosforila diversos residuos de tirosina (Tyr). Se han identificado 13 sitios potenciales de fosforilación de Tyr en la subunidad- β , algunos de ellos en el dominio catalítico que pueden funcionar como sitios de regulación de la actividad intrínseca del receptor; otros se localizan en las regiones yuxtamembranales y algunos otros cercanos a la cola carboxilo terminal (Ward C y Lawrence M, 2011). Todos ellos son de gran importancia pues funcionan como sitios de acoplamiento potenciales para proteínas de andamiaje en la cascada de señalización, tal es el caso del sustrato del receptor de insulina (IRS), del cual se hablará más adelante.

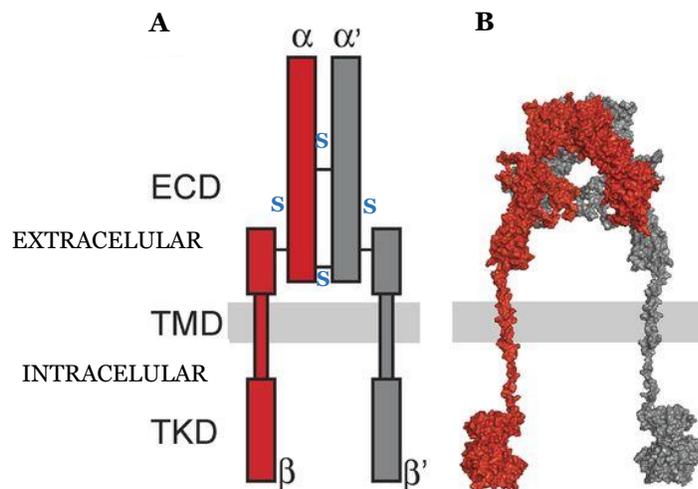


Figura 2. Receptor de insulina. A. Representación esquemática del receptor de insulina donde se muestran un ectodominio (ECD), la región transmembrana (TMD) y el dominio tirosina cinasa (TKD) con actividad enzimática. B. Receptor de insulina en representación cristalográfica. Obtenido de Gutmann T *et al.*, 2018

1.3 Mecanismos moleculares de la vía de señalización de IR activada por la unión de insulina

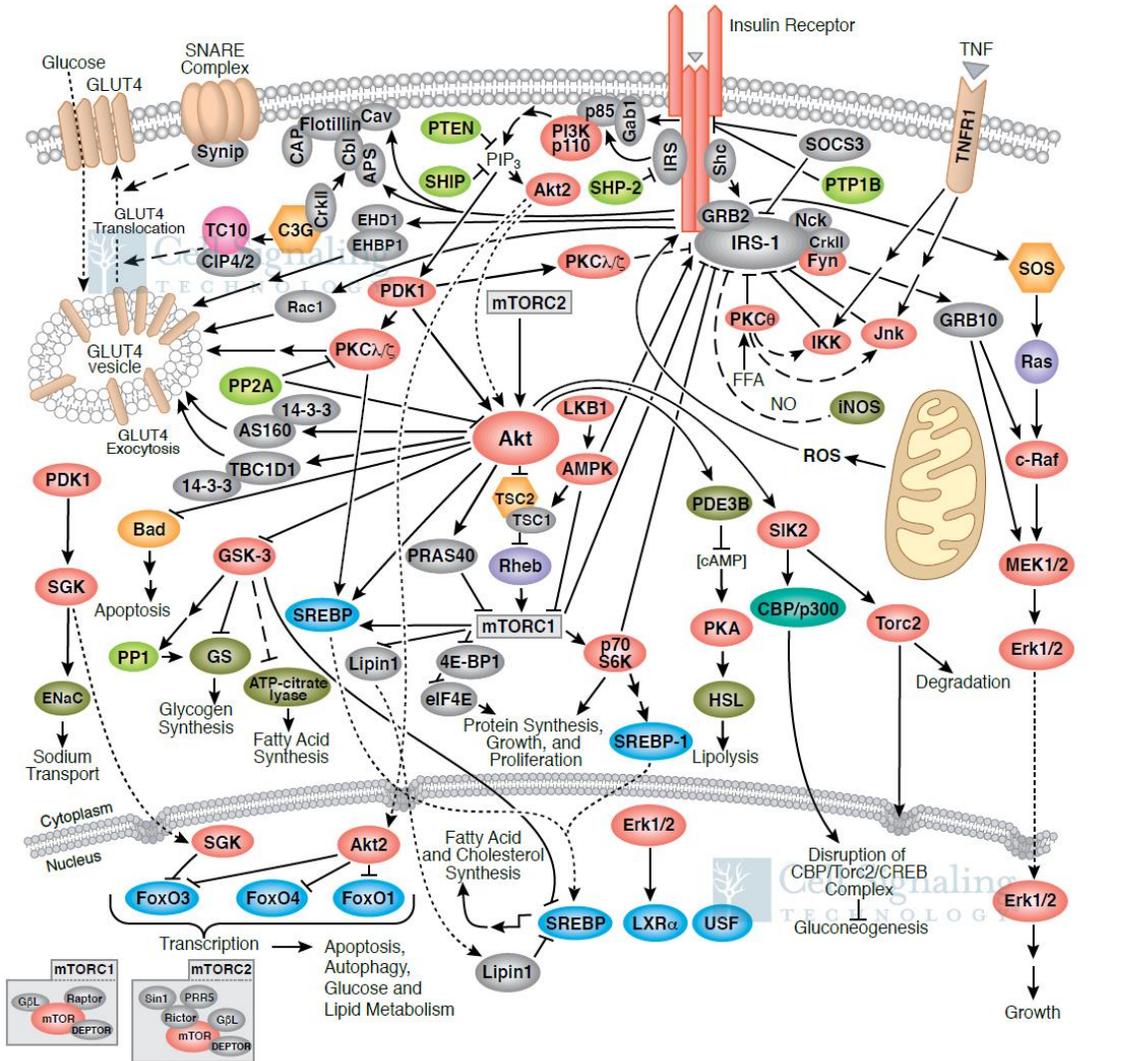
La unión de insulina al IR genera modificaciones posicionales que dan inicio a la actividad intrínseca de tirosina cinasa del receptor y consecutivamente la fosforilación de múltiples sustratos (figura 4). Entre éstos se encuentran el sustrato del receptor de insulina (IRS), la proteína transformadora Shc, proteína 2 asociada al factor de crecimiento (Grb-2), dedicador de citocinesis 1 (Dock1), E3 ubiquitina-proteína ligasa (Cbl) y proteína adaptadora con un

dominio PH y SH2 (APS) (White M, 2003), que proporcionan sitios de acoplamiento específicos (es decir, funcionan como proteínas *scaffold* o de andamiaje) para el reclutamiento de otras proteínas de señalización que conducen a la activación de dos principales vías de señalización:

- ✓ la vía de las cinasas Ras → MAP
- ✓ la activación de las cascadas de señalización PI-3K → Akt

La fosforilación del IRS es crucial para el comienzo de la vía de señalización y se podría considerar que es una proteína blanco en la regulación de diferentes cascadas de señalización de la insulina. Las proteínas IRS contienen un dominio de homología de pleckstrina (PH) en el extremo amino, adyacente a un dominio de unión a fosfotirosina (PTB). La cola C-terminal de IRS carece de actividad catalítica intrínseca, pero contiene numerosos sitios de fosforilación de tirosina (Haeusler R *et al.*, 2018), que permiten la unión de proteínas efectoras, como algunas enzimas (la fosfatidilinosol 3-cinasa, PI3K, la fosfatasa SHP2 o la tirosina cinasa FYN) o adaptadores como al supresor de las señales de citocina 1 y 3 (SOCS1 y SOCS3), a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2), proteína adaptador NCK, Proteínas Proto-Oncogénicas (CRK) y otros) (Shaw L, 2011; Saltiel R y Pessin E, 2002).

Insulin Receptor Signaling



Pathway Diagram Key

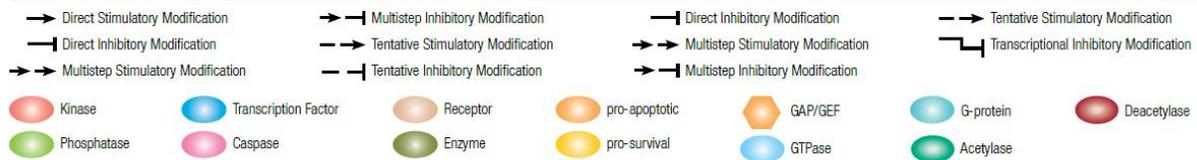


Figura 3. Regulación de la señal de insulina. La unión de Insulina a su receptor activa la cascada de señalización, los mecanismos de activación e inactivación intercomunicada regulan el crecimiento, metabolismo y apoptosis celular a través de fosforilaciones y defosforilaciones que generan modificaciones estructurales en las proteínas o de actividad enzimática a diferentes niveles de la cascada. Imagen tomada de Cell Signalling, 2018: <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-cellular-metabolism/insulin-receptor-signaling/pathways-irs>

1.3.1 Vía de señalización de cinasas activadas por mitógeno

La vía de señalización de las MAP cinasas es la vía principal por la cual se regula la síntesis de proteínas, efectos mitogénicos y de crecimiento celular. El inicio de esta vía comienza cuando el IR activado promueve la asociación de la proteína Shc, que se une al complejo Grb2/SOS; SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras (figura 4). La activación de Ras (GTP-Ras) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas (Olivares-Reyes *et al.*, 2009).

GTP-Ras se une al dominio regulador de Raf situado en el lado amino-terminal, subsecuentemente Raf ya activa es liberada y fosforila activando la vía de las MAP cinasas, que involucra el reclutamiento y activación de MEK 1/2 y de las ERK (Figura 4). Las MAP cinasas tienen una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas, que participan principalmente en la regulación de la expresión génica en tejidos sensibles a la insulina (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

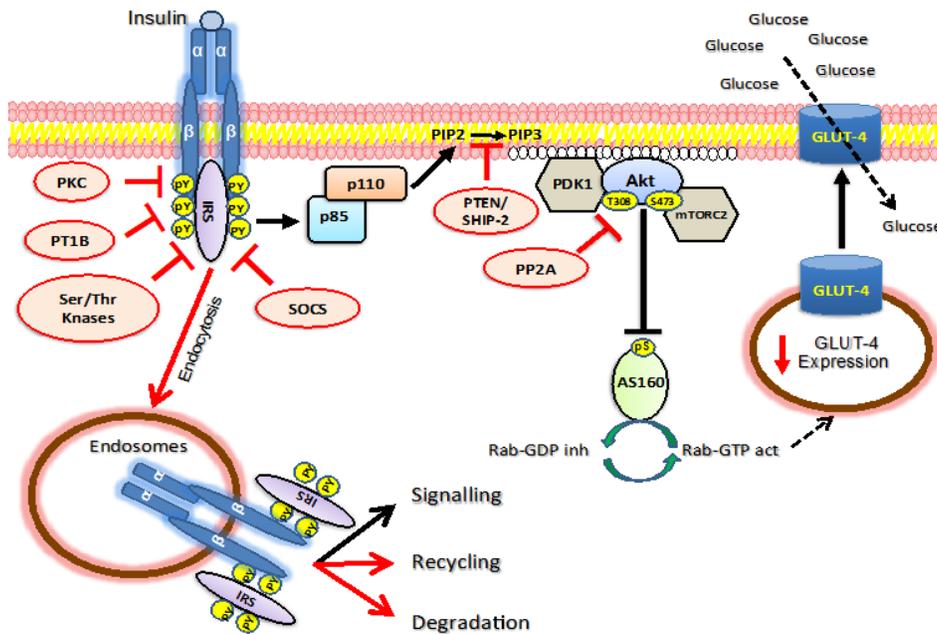


Figura 4. Mecanismos de desensibilización de la vía de insulina. Las acciones de la insulina son altamente reguladas para promover el adecuado funcionamiento de sus acciones metabólicas, promotoras del crecimiento y la proliferación celulares por lo tanto la regulación de su vía es altamente controlada por diferentes mecanismos (Vázquez-Jiménez, *et al.*, 2017).

1.3.2 La vía de señalización de PI3K

La enzima PI3K se activa por fosforilación en la subunidad p85 generada por el acople con IRS que lo recluta a la membrana plasmática para ser fosforilado por el IR, dicha fosforilación genera un cambio conformacional que permite la activación de su subunidad catalítica. PI3K convierte PI (4,5) P2 (un fosfolípido de inositol en la membrana plasmática denominado fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato) a PI (3,4,5) P3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato), que recluta a la proteína cinasa B (PKB) y a la proteína cinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido (PDK1) a la membrana plasmática, una vez unidos PDK1 activa la PKB (figura 4). La cinasa de proteínas B (PKB), también conocida como Akt, regula diferentes vías del metabolismo celular, entre los sustratos que fosforila se incluyen BAD (importante para la supervivencia celular), GSK3 β (reglador del crecimiento celular y síntesis de glucógeno), mTOR (síntesis de proteínas), ULK1 (su fosforilación inhibe autofagia) y FOXO1 (control de la expresión génica) (Figura 4). Cuando existe actividad aumentada de Akt, los factores de transcripción DAF16 y FOXO1 se acumulan en el citoplasma debido a su exclusión nuclear, esta situación inhibe la gluconeogénesis hepática y la diferenciación de los adipocitos, mientras que promueve la función de las células β pancreáticas. La expresión reducida de FOXO1 compensa la resistencia a la insulina en muchos organismos y tejidos (Olivares-Reyes *et al.*, 2009), por lo que los medicamentos que secuestran FOXO1 en el citoplasma podrían ser eficaces en el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

1.4 Mecanismos de regulación de la vía de insulina

El encendido de la vía de señalización de insulina debe permanecer por un tiempo finito, pues si se prolonga generaría desórdenes celulares que conlleven a estrés metabólico. Para regular esta situación existen diversos mecanismos que actúan a diferentes niveles de la cascada de señalización de insulina, modulando la duración y la extensión de la vía (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Los diferentes mecanismos que desensibilizan la señal de insulina se pueden observar en la figura 4 donde se contemplan: 1.- la internalización del receptor de insulina mediante vesículas de clatrina y caveolinas donde el complejo insulina-receptor es endocitado para su reciclamiento o degradación. 2.- la activación de fosfatasa (PTP α , PTP- ϵ , LAR, PTP-1B y SHP-2) que actúan a nivel del receptor de insulina defosforilando los residuos de tirosina del

asa catalítica disminuyendo su actividad, a nivel de las proteínas IRS y fosfatasas que llevan a la defosforilación de los fosfoinositidos 3-fosfato. 3.- la activación de cinasas que fosforilan al IR en residuos de serina/treonina que generan cambios conformacionales interrumpiendo el estado de activación.

Muchos de los mecanismos que participan en la desensibilización de la señal de insulina son activados por la propia vía, donde participan enzimas que apagan o inhiben de manera homóloga la señal; sin embargo, puede existir la participación de señales iniciadas por vías no relacionadas con la vía de insulina que disminuyan o potencien la ruta de señalización y a dicho mecanismo se le conoce como regulación heteróloga.

En este sentido, se ha observado que los receptores acoplados a proteínas G (GPCR's) pueden modular de manera positiva o negativa la vía de señalización de insulina. En el estudio de Haxho F *et al.*, 2018 se propone un mecanismo de regulación positiva, donde muestran aumento de la fosforilación en residuos de tirosina en la subunidad catalítica del IR e IRS 1 promovida por la acción de un agonista del GPCR de neuromedina B, un potente factor estimulante para la contracción uterina, donde evidencian una transactivación heteróloga.

1.5 El sistema Renina-Angiotensina (RAS)

El sistema renina-angiotensina (RAS por sus siglas en inglés) tiene un papel importante en la regulación de la función cardiovascular y la fisiología renal, controlando la presión sanguínea y el equilibrio electrolítico a través de sus acciones vasoconstrictoras. Cualquier desbalance existente en algún componente del RAS tiene implicaciones fisiopatológicas.

Inicialmente se pensó que el RAS era exclusivamente un sistema endócrino que actuaba a nivel sistémico, pero actualmente está totalmente demostrada su existencia en diversos tejidos como corazón, vasos sanguíneos, riñón y tejido adiposo, donde tiene una acción local.

El componente final y principal efector del RAS es la angiotensina II (Ang II) una hormona producida a partir de su precursor angiotensinógeno, un glucopéptido de 485 aminoácidos incluido un péptido señal de 33 aminoácidos (Lu H *et al.*, 2016), el cual se hidroliza por la proteasa renina (enzima sintetizada en las células yuxtaglomerulares del riñón), originando el péptido angiotensina I (Ang I) compuesto por 10 aminoácidos y, finalmente, la enzima

convertidora de angiotensina (ECA) elimina dos aminoácidos carboxilo terminales de la Ang I, convirtiéndola en Ang II (Bader M y Ganten, D 2008; Castro P *et al.*, 2010).

Las acciones de Ang II son iniciadas cuando se une a su receptor; Ang II se puede unir a dos receptores AT₁ y AT₂, miembros de la familia GPCR's. Entre ellos poseen una homología del 30% en su secuencia, pero funcionalmente son distintos. La mayoría de los efectos de Ang II, como la vasopresión, la regulación de la secreción de aldosterona, la estimulación del crecimiento y la fibrosis, están mediados por el receptor AT₁, constituido por 359 aminoácidos y con peso molecular de 40 kD. Los GPCR's son receptores con siete dominios transmembranales (figura 5); su grupo C-terminal se localiza del lado citoplasmático, y es el responsable de transducir las señales. Por otra parte, el lado N-terminal se localiza del lado extracelular y algunas ocasiones es objeto de glicosilación en residuos de asparaginas (Miura S *et al.*, 2011; Guzmán-Silva y García-Sáinz, 2018).

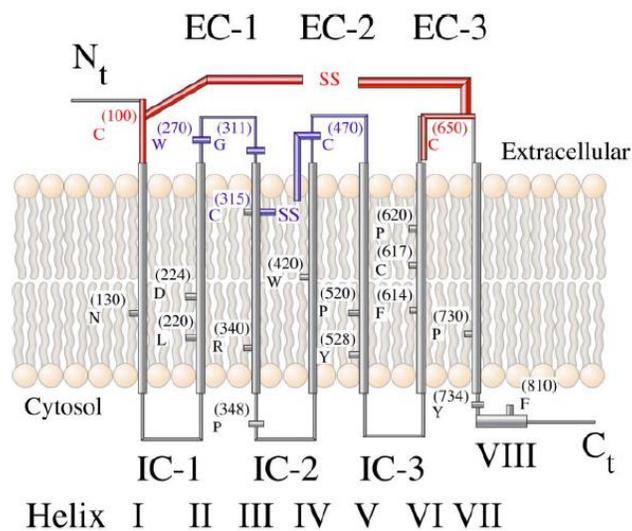


Figura 5. Representación esquemática de un GPCR. Se muestra la estructura del receptor de 7 pases transmembranales con sus dominios intracelulares (IC), extracelulares (EC), hélices adyacentes (I - VII) y dominios transmembranales. Se representan los segmentos de secuencias consensuadas en todos los GPCR's en letras negras, en azul se representan las inserciones incluido un enlace disulfuro extracelular encontrado en los receptores de Ang II, bradiquinina, endotelina, y otros GPCRs. Los residuos de aminoácidos conservados se muestran en código de una letra, así como su posición (Oliveira L *et al.*, 2007).

La activación del receptor AT_1 permite el acoplamiento a las proteínas G_q/G_{11} ; dicho acoplamiento genera la liberación de la subunidad $G_{\alpha q}$ que activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al fosfatidilinositol 2-fosfato (PIP_2) incrementando al inositol trisfosfato (IP_3) y al diacilglicerol (DAG). La generación de IP_3 estimula la liberación de calcio intracelular vía los receptores de IP_3 , que junto con DAG estimulan la actividad de la proteína cinasa C (PKC); en la figura 6 se muestra la señalización del receptor AT_1 .

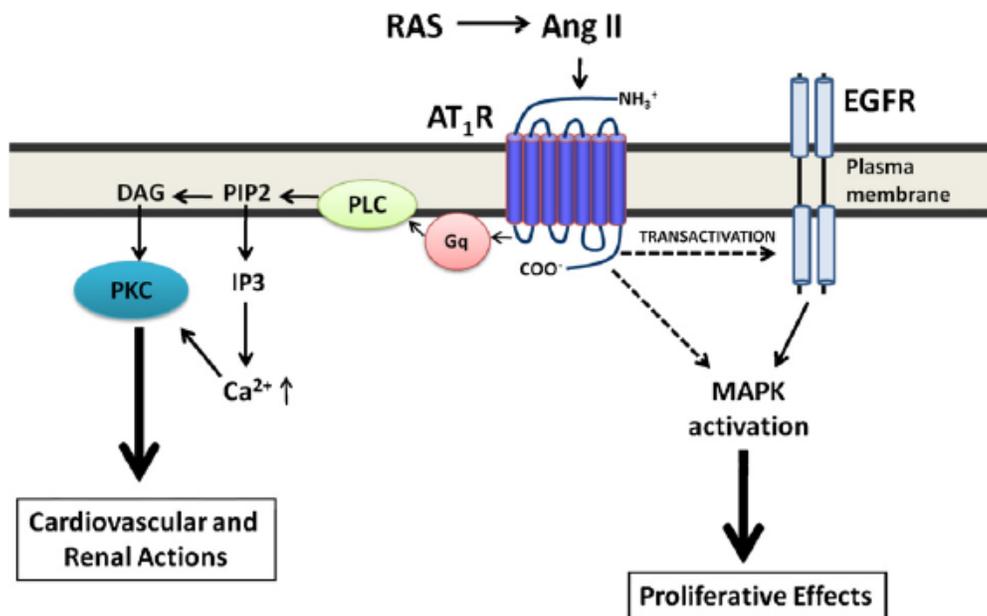


Figura 6. Vía de señalización de Ang II. Se muestra la cascada de señalización de Ang II/ AT_1 y su implicación en la transactivación de receptores como EGFR (Olivares-Reyes *et al.*, 2009).

Además de la función vasoconstrictora que promueve la unión de Ang II a su receptor (Ang II/ AT_1R), se ha estudiado el papel que tiene en relación con el crecimiento, proliferación y metabolismo celular (Oliveira L *et al.*, 2007). De manera general se ha demostrado que Ang II tiene influencia negativa en el metabolismo de glucosa sistémica en diversos tejidos y que la actividad de RAS aumenta en obesidad. En este sentido, diversos reportes han mostrado que los efectos proliferativos, de crecimiento y de migración celular de la Ang II/ AT_1R están conectados (Figura 7) con vías de señalización asociadas a receptores, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), entre otros receptores con actividad de tirosina cinasa (Carvalho J *et al.*, 2003).

1.6 El tejido adiposo

El tejido adiposo es una forma especializada de tejido conectivo cuya principal función en la homeostasis energética es almacenar lípidos obtenidos de manera exógena. La síntesis de triglicéridos en adipocitos depende de la síntesis o captación de glicerol-3-fosfato y ácidos grasos libres provenientes de la captación extracelular, la lipólisis intracelular o de la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Jones B *et al.*, 1997). El tejido adiposo (Fig. 7) está compuesto de células adiposas (adipocitos) y elementos celulares asociados como preadipocitos (células mesenquimales) fibroblastos, células de tejido muscular liso, células endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos (Oliveira L *et al.*, 2007; Cappa D, 2012).

En el ser humano existen dos clases de tejido adiposo, el más abundante es el tejido adiposo unilocular o “tejido adiposo blanco”, cuyas células poseen una sola vacuola de lípido almacenado. La segunda clase menos frecuente tanto en distribución como en cantidad es el tejido adiposo multilocular o “tejido adiposo marrón”, éste se localiza con mayor abundancia en recién nacidos (Dünner N *et al.*, 2013).

Los adipocitos uniloculares son muy grandes, llegan a medir hasta 100 μm de diámetro debido a la gran cantidad de lípidos que acumulan con una pequeña fracción citoplásmica, los lípidos que se encuentran en la gran vacuola central son triglicéridos.

El estudio del tejido adiposo es muy importante por los problemas de salud pública ocasionados por el aumento de sobrepeso y obesidad en el mundo y por reconocer la participación de los adipocitos en una amplia gama de procesos homeostáticos.

Después de la función de reserva energética, los adipocitos tienen un papel importante endocrino, pues liberan diversos péptidos bioactivos (adipocinas) con implicación en la regulación de rutas de señalización involucradas en la homeostasis de glucosa a nivel sistémico (Fig. 7) (Gastaldelli A *et al.*, 2017).

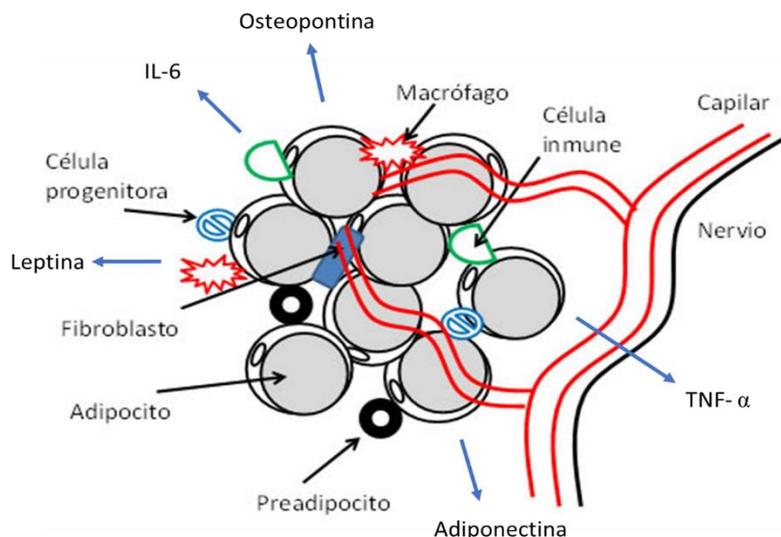


Figura 7. Estructura del tejido adiposo. El tejido adiposo está compuesto por células adiposas y elementos asociados indicados con flechas negras. Las hormonas secretadas por tejido adiposo se conocen como adipocinas y se representan con flechas azules. Figura modificada de Cappa D, 2012.

Se conoce que la grasa visceral tiene alta expresión de angiotensinógeno, particularmente en sujetos obesos (Dünner N *et al.*, 2013), y en tejido adiposo se describió RAS local; también, se sabe que el tejido adiposo secreta isoformas de peptidasas que sintetizan Ang II de angiotensinógeno, lo que confirma su RAS local. Sin embargo, las funciones autocrinas que ejerce no han sido descritas.

2.- ANTECEDENTES

Los mecanismos de transducción de Ang II han sido extensamente estudiados en células de los sistemas cardiovascular y adrenal evaluando las respuestas bioquímicas/fisiológicas post unión de Ang II a sus receptores (AT₁ y AT₂). Además de sus funciones vasoconstrictoras para la regulación electrolítica a nivel sistémico existe múltiple evidencia que demuestra que la hiper-actividad del RAS puede jugar un papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina en tejidos como músculo esquelético, hígado y corazón (Olivares-Reyes *et al.*, 2009; Sanni S *et al.*, 2018).

La Ang II interfiere con la señalización de insulina ya que los antagonistas del AT₁R mejoran la sensibilidad a insulina; por ejemplo, telmisartán, un antihipertensivo, mejoró la sensibilidad a insulina en pacientes hipertensos con síndrome metabólico (Koca N *et al.*, 2019).

En los modelos celulares mencionados, la resistencia a insulina se asocia con incrementos en las especies reactivas de oxígeno (ROS), inducida por hiperactividad del RAS (Fig. 8), donde las ROS son generadas por la unión de Ang II-AT₁R que activa a la NADPH oxidasa quien produce ion superóxido (O₂^{•-}) (Henriksen E, 2019; Whaley-Connell y Sowers J, 2018). A nivel molecular, los diferentes modelos muestran que la activación Ang II-AT₁R disminuye la fosforilación en residuos de tirosina del IRS estimulada por la insulina y la activación de Akt, demostrando así la interferencia entre las vías de señalización AT₁R e IR.

La evidencia de que RAS afecta la vía de insulina es bastante amplia y consistente; sin embargo, a pesar de que tejido adiposo secreta todos los componentes de RAS como órgano endócrino, los resultados en esas células aún son controversiales.

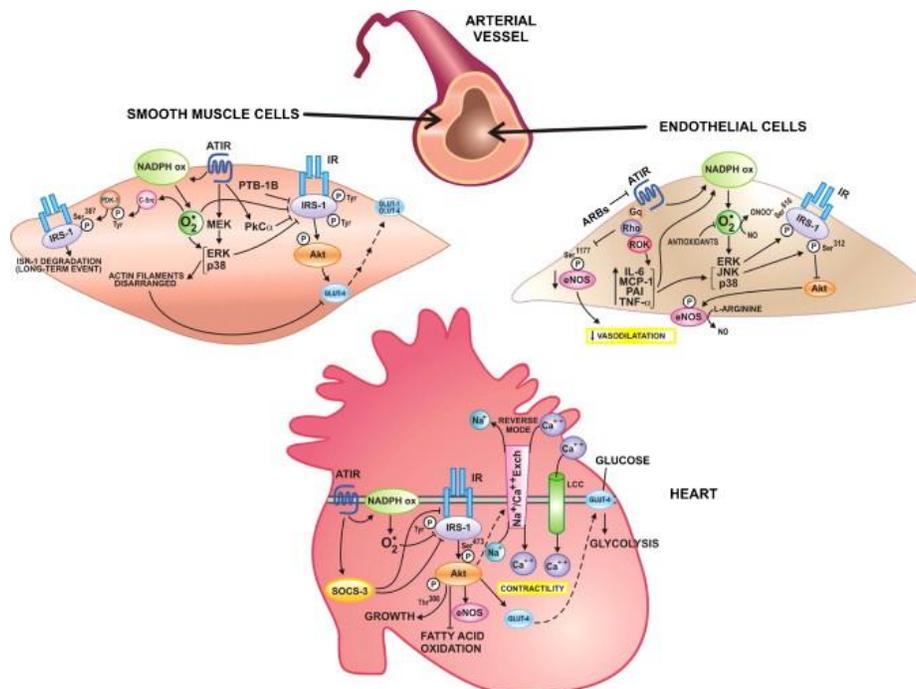


Figura 8. Influencia de Ang II en la vía de señalización de insulina. Se esquematiza la regulación de angiotensina sobre la vía de insulina en diferentes tejidos celulares (Olivares-Reyes *et al.*, 2009).

Desde el descubrimiento del RAS local en tejido adiposo, se analizó su participación en la fisiopatología de los trastornos asociados con la obesidad y, de hecho, estudios en humanos con obesidad e hipertensión muestran aumento de Ang II en tejido adiposo y en plasma, lo que sugiere que esta hormona puede estar implicada en la patogénesis de la obesidad y de la resistencia a la insulina (Kalupahana y Moustaid-Moussa, 2012; Fu Q *et al.*, 2017).

Hasta este momento se conoce, de manera general, que la sobre activación de RAS se da de manera sistémica y/o adiposa en modelos animales y en humanos obesos; sin embargo, las discrepancias en la regulación de los componentes del RAS demuestran la complejidad entre RAS y la obesidad. Por ejemplo, la administración de un antagonista del receptor AT₁ no tiene efecto sobre la sensibilidad a la insulina en sujetos obesos, no hipertensos y sin diabetes tipo 2. Con respecto a esto, el estudio de Chi-Chang *et al.* en 2005, evidencia que el tratamiento con Ang II conduce a mayor captación de glucosa estimulada por la insulina en adipocitos aislados de rata, mediado por aumento de autofosforilación del IR y la señalización intracelular posterior; además, la administración de Ang II aumentó la sensibilidad a la insulina en ratas. Por otra parte, en estudios donde utilizan la rata transgénica hipertensiva TG (mREN-2)²⁷ (Ren-2), que sobre expresa el gen de renina de ratón mRen2, hay hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, disminución de la sensibilidad a insulina y disminución de la captación de glucosa en tejido muscular (Blendea M *et al.*, 2005).

En el laboratorio se ha estudiado el efecto de Ang II sobre la señal de insulina en células 3T3-L1, línea celular diferenciada de fibroblastos a adipocitos maduros, para dilucidar el mecanismo de Ang II (Arellano-Plancarte, 2011; Gutiérrez-Rodelo, 2018). Así, se verificó que las células respondieran a estímulos de insulina, observando que insulina promovía fosforilación en residuos de tirosina del IR, lo que lleva a la fosforilación y activación de diferentes proteínas río abajo de la vía de señalización, tales como IRS1/2, PI3K y Akt. Una vez que las células respondieron insulina por fosforilación en residuos de tirosina del IR, se evaluó el efecto de Ang II sobre la captación de glucosa inducida por insulina a diferentes tiempos sin y con pre-estímulos de 5 y 60 minutos de Ang II. Los resultados mostraron que los pre-estímulos de Ang II disminuyeron la captación de glucosa estimulada por insulina en las células 3T3-L1 (Fig. 9).

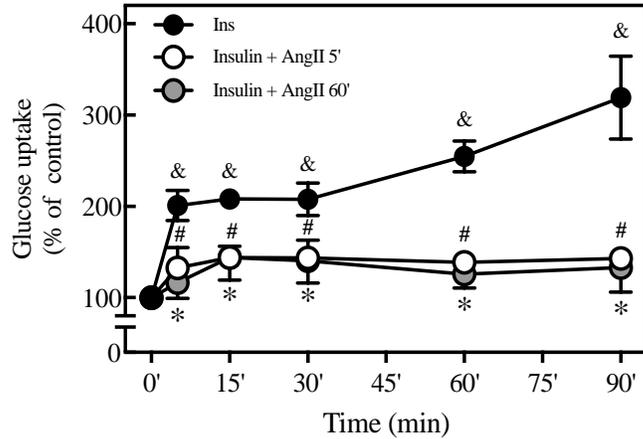


Figura 9. Efecto de Ang II en la captación de glucosa estimulada por insulina en células 3T3-L1. A partir de 5 y 60 min se observa como Ang II reduce la captación de glucosa inducida por insulina. (Gutiérrez-Rodelo, 2018).

La fosforilación en residuos de serina en IR e IRS, elementos iniciales de la señalización de insulina, provoca disfunción concomitante de su actividad. Es conocido que la vía de insulina se regula negativamente de manera homóloga fosforilando residuos de serina del IR; en las células 3T3-L1 los estímulos con Ang II a tiempos largos también promovieron la fosforilación en residuos de serina del IR (Fig. 10).

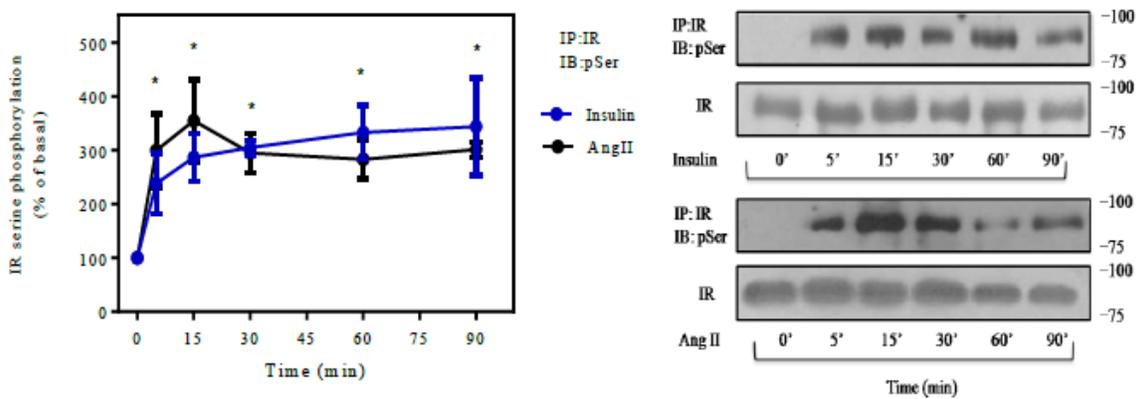


Figura 10. Fosforilación del IR en residuos de serina estimulada por insulina y Ang II en células 3T3-L1. Se muestra fosforilación negativa del IR tanto por estímulos de insulina (atribuida a desensibilización homóloga) como por estímulos de Ang II. (Gutiérrez-Rodelo, 2018).

Estos resultados llamaron la atención pues en cardiomiocitos o células endoteliales, el efecto de Ang II sobre la vía de insulina se da sobre IRS por ROS, y fue novedoso observar los efectos de regulación negativa de la vía de insulina por acción de Ang II directamente sobre IR. Esta situación fue congruente con datos en células 3T3-L1 ya que Ang II disminuyó la fosforilación en residuos de Tyr a 5 y a 60 min (Arellano-Plancarte, 2011).

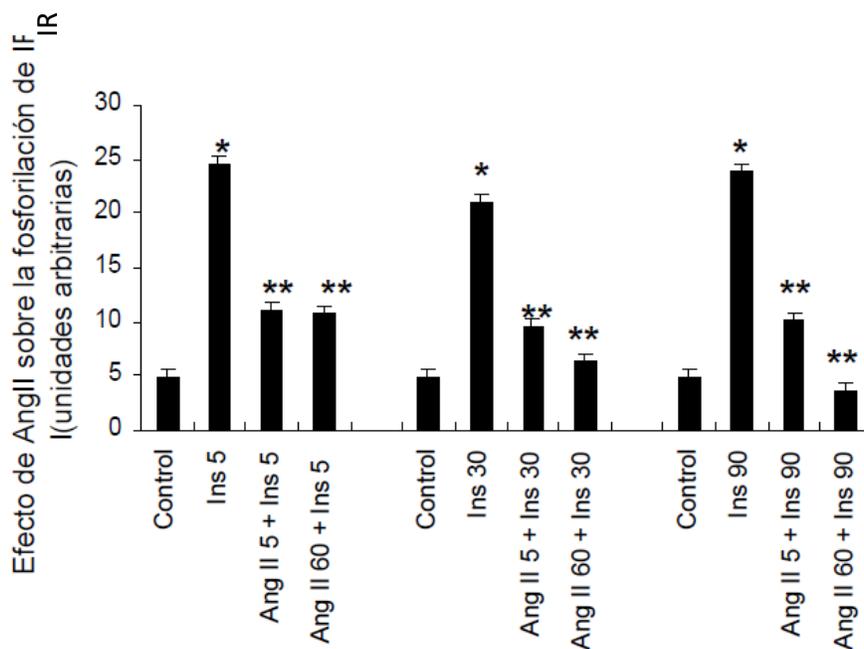


Figura 11. Fosforilación de IR Tyr 1158. Se muestra el estímulo de insulina a 5, 30 y 90 min fosforilando al receptor y posteriormente se realizaron preestímulos de Ang II de 5 y 60 min en células 3T3-L1. (Arellano-Plancarte, 2011).

Los resultados evidenciaron que el mecanismo de acción de Ang II en la señal de insulina es sobre IR AT₁R, en células 3T3-L1 (Gutierrez-Rodelo, 2018), y que IR era fosforilado en residuos de serina inducido por los estímulos con Ang II (Fig. 10), se propuso la participación de PKC's, proteínas cinasas clásicas, activadas por los segundos mensajeros: diacilglicerol y calcio, generados por activación del AT₁R (Fig. 7). Para confirmarlo se inhibieron las PKCs clásicas y nuevas con BIM y se observó que insulina recuperaba la fosforilación en tirosina del IR y la fosforilación de serina de Akt, lo que promovió la captación de glucosa (Fig. 12).

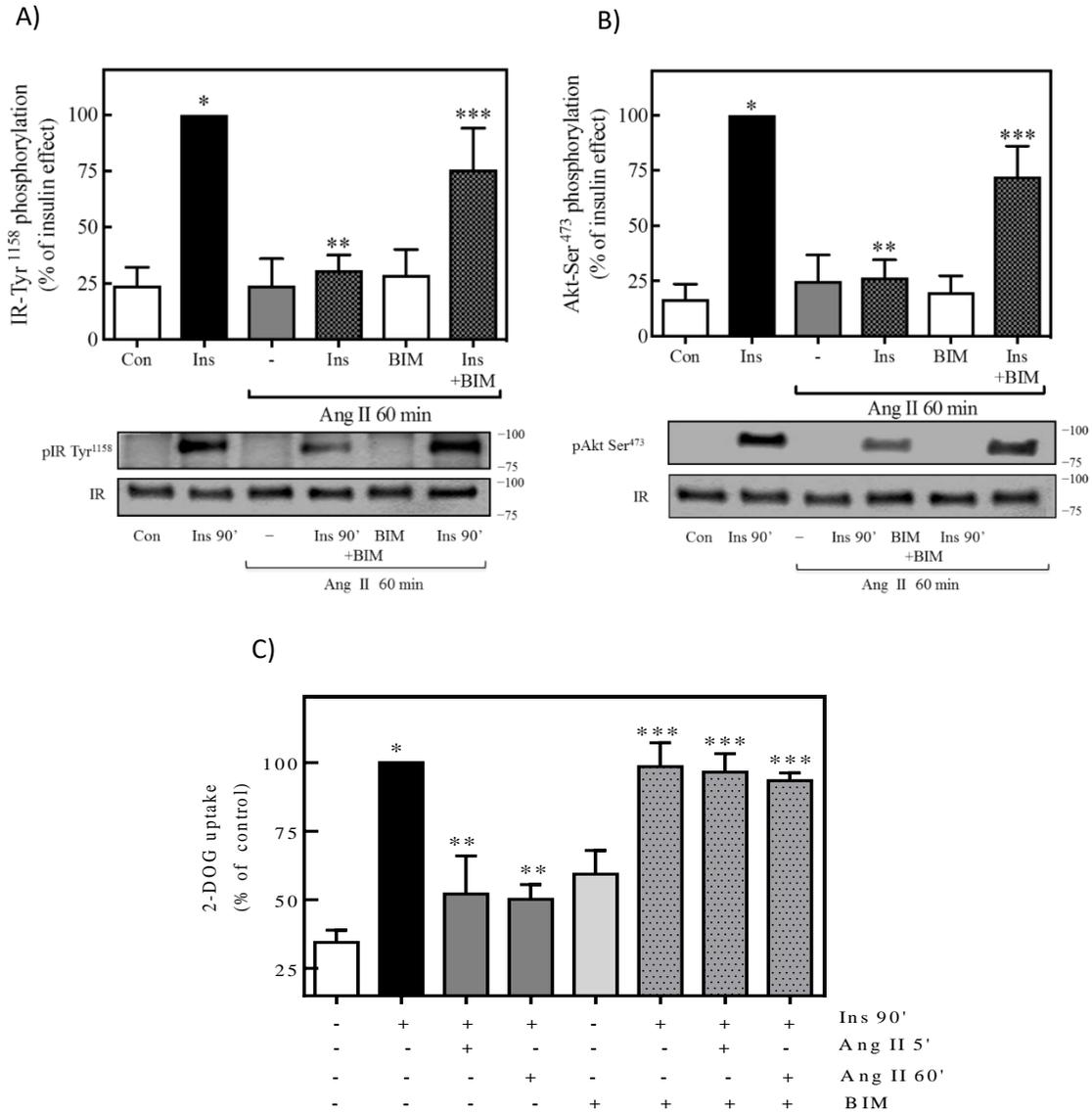


Figura 12. Uso de inhibidor BIM en células 3T3-L1 con pre-estímulos de Ang II. El uso del inhibidor BIM recupera la fosforilación en el IR (A), en Akt (B) y la captación de glucosa (C) inducida por insulina del efecto de Ang II (Gutierrez-Rodelo, 2018).

3.- JUSTIFICACION

En estudios previos Ang II promueve resistencia en la vía de insulina a nivel de IRS en diferentes modelos celulares; sin embargo, los resultados en células adiposas son aún controversiales. Antecedentes en nuestro laboratorio sobre células 3T3-L1 disminuye la señal de insulina inducida por Ang II a nivel del IR; no obstante, la evidencia difiere tanto en línea celular como en cultivo primario, por lo que nuestro estudio se enfoca en evaluar Ang II en adipocitos maduros aislados de tejido epididimal de ratón y observar si las PKC están implicadas en los efectos de Ang II.

4.- HIPÓTESIS

La Ang II promueve la regulación negativa de la vía de insulina afectando la fosforilación de Akt, por acción de PKC en adipocitos del epidídimo de ratón.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de Ang II en la vía de señalización de insulina y analizar la participación de PKC participan en este proceso, en adipocitos aislados de epidídimo de ratón.

5.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar el aislamiento de adipocitos de epidídimo de ratón y las condiciones experimentales para los estímulos con Ang II e insulina
2. Evaluar la respuesta de las células a los estímulos de insulina.
3. Evaluar el efecto de Ang II en la fosforilación de IR y Akt.
4. Estudiar la acción de PKC dependiente de Ang II en la regulación de la vía de insulina (con los inhibidores BIM y Gö6983).

6.- MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención de adipocitos aislados

Se utilizaron ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad para extraer el tejido adiposo epididimal: se dislocó cervicalmente al ratón, se abrió cavidad abdominal y se extrajo el tejido adiposo, pesándolo y colocándolo en una caja Petri de vidrio con solución PBS 1X con glucosa 5 mM. Para digerir el tejido seguimos el protocolo de Landa-Galván (2014), donde se cortó el tejido en trozos pequeños y se colocó en solución de digestión (ver lista de soluciones) en baño Stuart a 37°C por 60 min con agitación de 40 rpm. Para detener la digestión y separar los adipocitos del tejido no digerido, se filtró en una malla tipo tul colocada sobre embudo de vidrio en tubo falcon. Para lavar los residuos de la malla se adicionó 10 ml de medio DEMEM/F12 frío. Finalmente, el digerido se centrifugó a 180 g 10 min; para separar los adipocitos flotantes se cortó un trozo de la punta de la pipeta (para evitar el daño a los adipocitos) y se tomaron los adipocitos extrayendo la capa superior con cuidado de no llevar medio, colocándolos en otro tubo falcon con 10 ml de medio DEMEM/F12 frío. Nuevamente se centrifugó a 180 g 5 min y con la punta de la pipeta cortada se extrajeron los adipocitos flotantes, colocándolos en un tubo con el volumen final de medio a utilizar, para distribuirlos en tubos falcon de 50 ml y comenzar los estímulos. En la figura 13 se esquematiza el protocolo mencionado.

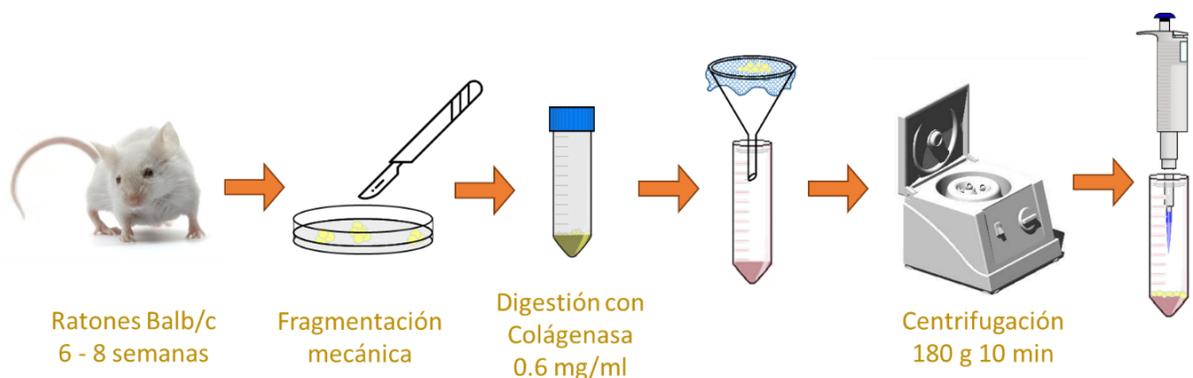


Figura 13. Esquema del aislamiento de células adiposas. Se muestra cómo es extraído el tejido adiposo de los ratones Balb/c y posteriormente reducido por fragmentación mecánica y digestión por colagenasa a células aisladas en suspensión en tubos falcon de 50 ml.

6.2 Estímulos con insulina

Se estimularon los adipocitos con insulina para los experimentos de cursos temporales. Los tiempos de estímulo fueron 2, 10, 15, 30, 60 y 90 min. Una vez adicionado el estímulo, las células eran suspendidas con agitación suave. Para detener los estímulos se retiró con pipeta Pasteur el medio de cultivo, evitando tomar células y los adipocitos fueron lisados con amortiguadores de lisis descritos en el apartado 6.5.

6.3 Estímulos con Ang II

Los cursos temporales realizados con Ang II fueron de 2, 10, 15, 30, 60 y 90 min con y sin insulina 10 min. Durante los tiempos de estímulos las células eran suspendidas con agitación suave y para detener el estímulo se retiró el medio de suspensión y las células se lisaron con amortiguador de lisis.

6.4 Uso de Inhibidores

Como inhibidores de PKC se usaron bisindolylmaleimide (BIM 1) (1 μ M) que inhibe PKC's clásicas y nuevas (α , β 1, β 2, γ , δ y ϵ), y Gö 6976 (100 nM) que inhibe PKC's clásicas (α y β 1). Los inhibidores se adicionaron 30 min antes de estimular con Ang II (100 nM) 90 min y al término (120 min), se adicionó insulina (100 nM) por 10 min. Finalizada la incubación (130 min en total) se retiró el medio de suspensión y las células se lisaron con amortiguador de lisis.

6.5 Lisado de los adipocitos para detener los estímulos

Para detener los estímulos en los adipocitos y debido a que estos flotan, se retiró el medio DEMEM/F12 (una vez que los estímulos habían finalizado) con una pipeta Pasteur, procurando no tomar las células y se adicionaron 100 μ l de amortiguador de lisis. Para los experimentos se usaron dos tipos de amortiguador de lisis para estandarizar una técnica para delipidar las muestras, los amortiguadores utilizados fueron:

- Amortiguador de lisis Laemmli 1X: que contiene SDS 0.1% *protein gel loading solution* 2X Quality Biological, tris base 25 mM, Glicina 192 mM, β -mercaptoetanol 5% y agua 45% se adicionó una vez que se retiró el medio, después se raspó con la

punta de pipeta el tubo falcon donde se encontraba la muestra y se colocó lo extraído en tubos nuevos eppendorf de 1.5 ml.

- Amortiguador de lisis Ripa: El amortiguador de extracción contiene detergentes iónicos para la lisis celular como DSD 0.1%, Desoxicolato de Na 1% y Nonidet P-40 entre otras sales (ver tabla de soluciones); debido a su mayor contenido de detergentes que el amortiguador Laemmli, se utilizó para mayor facilidad al delipidar las muestras. Se adicionó este amortiguador en frío, incubando las muestras 15 min en hielo, después se sonicó el lisado tres veces por 5 segundos a 40 KHz y se incubó nuevamente 15 min en hielo. Finalizado este proceso las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 min a 14 000 rpm; una vez listas las muestras, se eliminó la parte lipídica que se encontraba en la superficie.

Finalmente, el Amortiguador de lisis Ripa fue más eficiente para delipidar las muestras, pero la cuantificación de proteína con este Amortiguador fue inespecífica, debido a que las células están en suspensión por lo que lisamos las células con amortiguador Ripa y cuantificamos el contenido proteico de las muestras adicionando Laemmli, con el kit Rc Dc como se describe a continuación.

6.6 Cuantificación de proteínas

Debido al uso de dos amortiguadores de lisis se realizaron dos técnicas de cuantificación de proteína, con el kit de Rc Dc de BIORAD basado en la técnica de Lowry que permite cuantificar en amortiguadores complejos como Laemmli. La segunda técnica fue por el Kit de Ensayo de proteína por BCA (Ácido Bicinconónico) de Pierce, compatible con diferentes detergentes iónicos y no iónicos, sin embargo, es muy sensible a colorantes.

6.7 Western Blot

Una vez con los adipocitos lisados y las muestras delipidadas, se corrieron por electroforesis en gel de SDS-PAGE a diferentes porcentajes (6, 8, 10 y 12%), dependiendo de las proteínas a identificar, a voltaje constante de 120 V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas adsorbentes de polivinilideno difluoruro (PVDF) con un poro de 0.2 μ M (Poly Screen, Perkin ElmerTM) en una cámara de transferencia semiseca (trans-blot SD, Transfer

cell, BIO RAD) a 15 V durante 1:45 hrs con amortiguador de transferencia semiseca (ver tabla de soluciones).

Las membranas fueron bloqueadas con BSA 5% en TBST 0.1 y leche 5% en TBST 0.1 y se utilizaron los siguientes anticuerpos.

p-AKT α -rabbit policlonal Cat: sc-7985-R Santa Cruz Biotechnology diluido en leche al 5% en TBST 0.1% [1:10000]. Anticuerpo secundario diluido en leche al 5% en TBST 0.1% [1:20000]

AKT 1/2/3 α -mousse monoclonal Cat: sc-81434 Lote 11417 Santa Cruz diluido en leche al 5% en TBST 0.1% [1:5000]. Anticuerpo secundario diluido en leche al 5% en TBST 0.1% [1:15000]

P-IR/IGF1R (Tyr1158) α -rabbit policlonal Cat: #44-802G Invitrogen diluido en BSA al 5% en TBST 0.1 [1:7000]. Anticuerpo secundario diluido en BSA al 5% en TBST 0.1% [1:20000]

IR β /IGF (C-20) α -rabbit policlonal Cat: Sc-713 Lote G2006 Santa Cruz diluido en BSA al 5% en TBST 0.1 [1:7000]

6.8 Obtención de imágenes en el microscopio digital

Para la obtención de imágenes se utilizó el microscopio AxiosKop 2 mot Plus y las células se observaron sin tinción, con tinción de rojo oleoso y DAPI. Ambas tinciones se realizaron con las células en suspensión en tubos Falcon de 50 ml.

Para la tinción con rojo oleoso se utilizaron 5 ml de solución de rojo oleoso (mostrada en tabla de solución) en un tubo Falcon con células en suspensión durante 5 min. Después con pipeta Pasteur se retiró la solución de rojo oleoso, evitando tomar las células flotantes y se adicionó PBS con glucosa para eliminar exceso de colorante, este último paso de lavado se repitió al menos 5 veces hasta que el PBS estuviera translúcido.

La tinción con DAPI se realizó con 1 μ l de DAPI 1:1000 por ml de suspensión de células; las células se colocaron en 2 ml de PBS suplementado con glucosa 5 mM por 40 min, después

se retiró el PBS con pipeta Pasteur evitando tomar células, los lavados con PBS se realizaron al menos 3 veces.

6.9 Análisis de resultados

Los resultados fueron cuantificados por el programa Image J y los datos analizados son reportados como unidades arbitrarias del número de píxeles \pm error estándar, calculados del promedio para cada condición. Para determinar las diferencias estadísticas se utilizó el programa GradPadPrism 5.0 con pruebas de ANOVA y *post-hoc* de Dunnett. Además, para algunas gráficas se utilizó el *test* de Bonferroni para comparaciones múltiples. En todos los casos se consideró una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa y todos los resultados fueron normalizados con respecto al total de Akt.

7.- RESULTADOS

7.1 Caracterización de los adipocitos aislados

La obtención de adipocitos se realizó como se describe en materiales y métodos. En la Figura 13 se esquematiza el procedimiento de aislamiento. Para verificar que las células se aislaron correctamente, se observaron bajo microscopio en contraste de fases (Figura 14, A y B) y con diferentes tinciones: rojo oleoso (Figura 14, C) y DAPI (Figura 14, D). En la figura 14 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía donde se observa que efectivamente las células se encuentran aisladas.

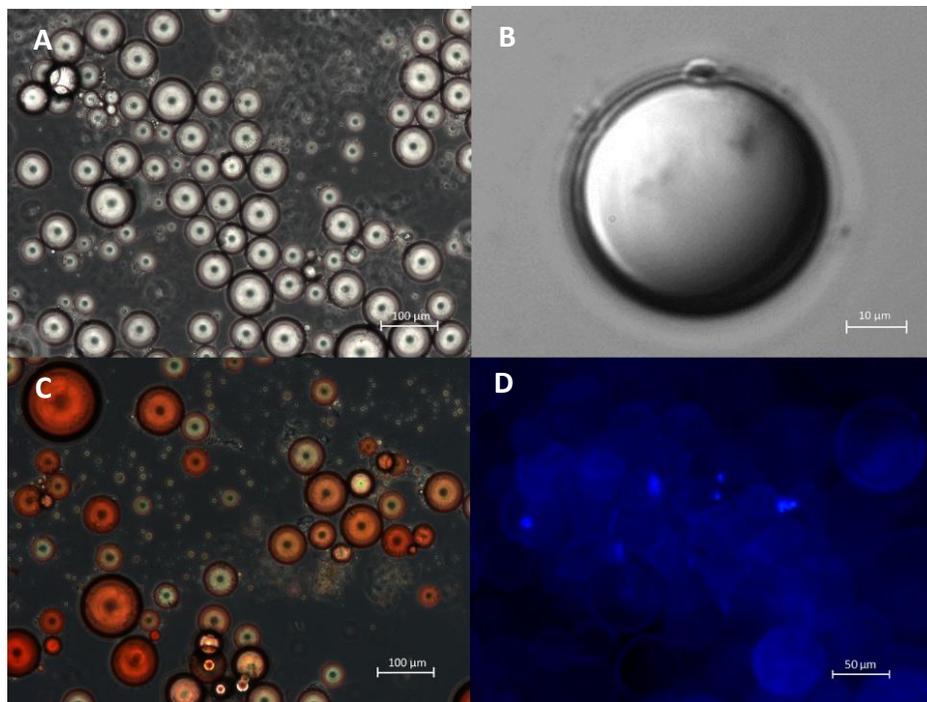


Figura 14. Adipocitos aislados. En los paneles A y B se muestran micrografías representativas de las células sin tinción con diferentes magnificaciones. En el panel C se muestran las células teñidas con rojo oleoso y en el panel D se muestran las células teñidas con DAPI.

7.2 Estandarización de condiciones experimentales

Como el modelo fue nuevo estandarizamos las condiciones, desde la cantidad de células a tomar hasta el delipidado de las muestras.

Con las células en suspensión estandarizamos la cantidad de células a tomar por volumen, para lo cual se tomaron 250, 500 y 1000 μl de medio con células, en dos condiciones: control y estímulo de insulina 100 nM por 10 min. Posteriormente, las células se lisaron con amortiguador Laemmli, y se cuantificó proteína con el Kit Rc Dc, para cargar 25 μg de proteína y las muestras se corrieron por Western Blot (materiales y métodos), determinando la proteína Akt fosforilada (figura 15). Finalmente, se observó que con el menor volumen de células en suspensión (250 μl), hubo mayor señal de fosforilación en Akt (figura 15, A), por lo que los experimentos posteriores fueron con 250 μl .

Posteriormente establecimos la cantidad de proteína para Western utilizando desde 1 μg hasta 25 μg de proteína en gel de poliacrilamida (Figura 15, B). La muestra utilizada fue 250 μl con estímulo de insulina y observamos que incluso con 1 μg de proteína había señal por lo que se decidió cargar 15 μg de proteína.

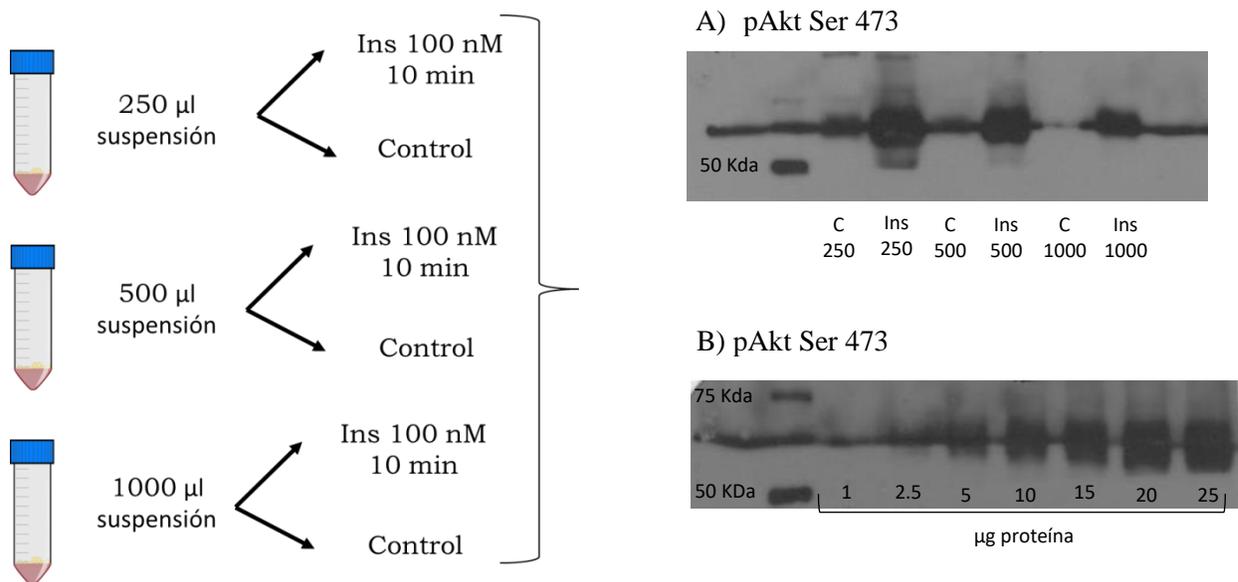


Figura 15. Estandarización de volumen a tomar con células en suspensión.

En la imagen de la izquierda se muestran las cantidades de células en suspensión con sus diferentes condiciones establecidas, en el panel A se observa la señal de fosforilación de Akt de las muestras obtenidas con los diferentes volúmenes y para estandarizar la cantidad de proteína a tomar se observa la titulación de proteína en el panel B realizada desde 1 hasta 25 μg y las de la muestra Ins 250.

Listas las condiciones para cargar las muestras en el gel de electroforesis, se hicieron experimentos de curso temporal con estímulos de insulina y Ang II; sin embargo, la detección de proteínas totales se dificultó por la cantidad de grasa en las muestras. Tras el Western blot, el gel tenía asentamientos grasos en los pozos, por lo que cambiamos el amortiguador de lisis Laemmli por RIPA, que contiene más detergentes y delipidaba las muestras de manera eficaz. En la figura 16 el tubo vial del lado derecho contiene amortiguador de lisis Laemmli con separación de fases menos definida que el tubo vial del lado izquierdo, con amortiguador de lisis RIPA. El método de cuantificación de cada amortiguador es distinto y se describió en materiales y métodos.

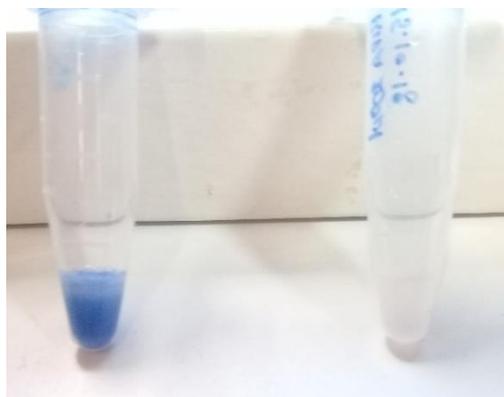


Figura 16. Diferentes amortiguadores de lisis. Las muestras con amortiguador de lisis Laemmli (izquierda) se observan con una capa de grasa en la superficie mientras que las muestras lisadas con amortiguador RIPA (derecha) se encontraban más translúcidas.

Cuando se estandarizó el protocolo para la obtención y carga de las muestras para las corridas de electroforesis y posterior Western blot, realizamos los estímulos.

7.3 El efecto de insulina

Para observar el efecto de insulina sobre las células adiposas aisladas, se estimuló con insulina 100 nM a 2, 10, 15, 30, 60 y 90 min. Como consecuencia de activar IR se fosforilan y activan proteínas río abajo como Akt, por lo que evaluamos su fosforilación tras el estímulo con insulina y observamos cómo respondían las células y cuál era su respuesta respecto al tiempo. En la Figura 17 se observa en un curso temporal la fosforilación en el residuo de serina 473 (fosforilación de activación) de la proteína Akt, la cual aumenta desde los 2 min,

lo que indicó que las células respondían a insulina y el curso temporal dio pauta para elegir el tiempo de estímulo de insulina (10 min, pues a ese tiempo se obtenía respuesta significativa ($P<0.001$)) para los experimentos posteriores.

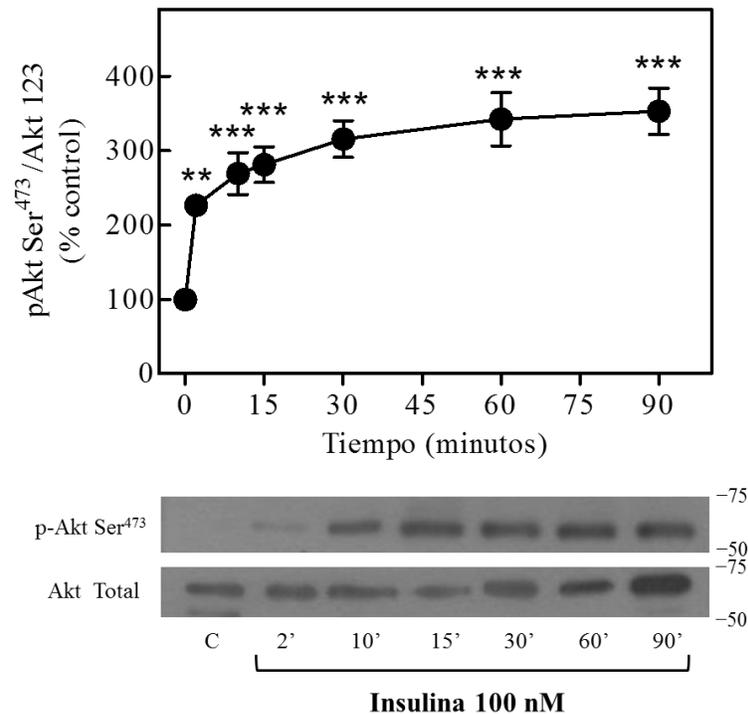


Figura 17. Efecto de la insulina en la fosforilación de Akt. Los adipocitos aislados en suspensión fueron estimulados a diferentes tiempos con insulina 100 nM. Para cada figura el análisis estadístico fue con $n=3$ y se muestra un blot representativo. Los resultados son evaluados como se describe en materiales y métodos. En la gráfica superior los resultados se muestran normalizados (en porcentaje) respecto al control donde ** $P<0.01$ *** $P<0.001$.

7.4 Efecto de angiotensina II

Una vez que las células se aislaron correctamente y respondían a insulina, decidimos observar la respuesta a Ang II, es decir, la fosforilación de Akt pues esta proteína no es activada por la señal del receptor AT₁. El estímulo de Ang II en un curso temporal de 0 a 90 min a 100 nM. La respuesta muestra que Ang II en adipocitos promovió fosforilación de Akt en residuos de serina 473 (Figura 18), aumentando conforme al tiempo; sin embargo, a los 90 min la fosforilación disminuyó.

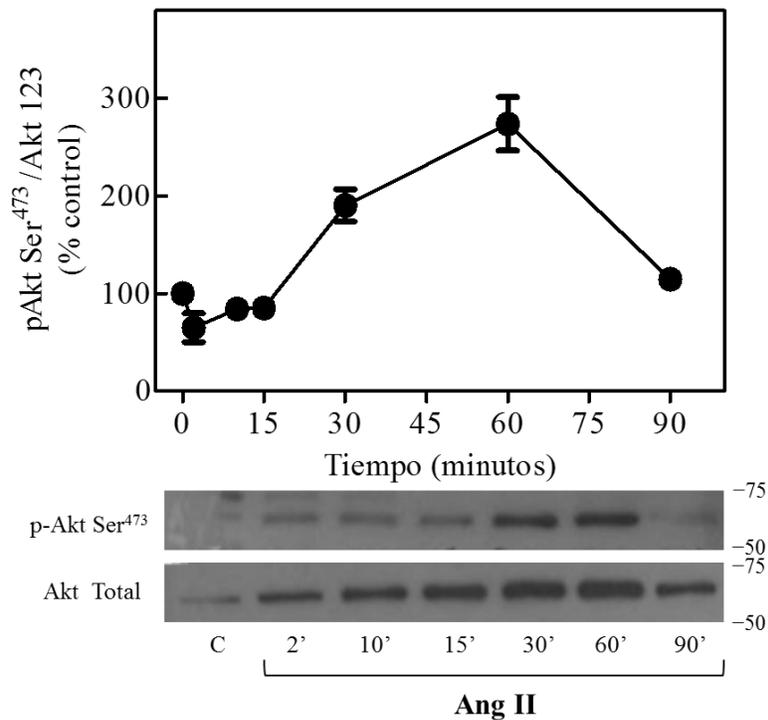


Figura 18. Efecto de Ang II en la fosforilación de Akt. Los adipocitos aislados en suspensión fueron estimulados a diferentes tiempos con Ang II 100 nM. Para esta figura no hubo análisis estadístico (n=2) y se muestra un blot representativo, los resultados se presentan en porcentaje respecto al control.

7.5 Efecto de angiotensina con insulina

En nuestros antecedentes directos con células 3T3-L1 hubo inhibición de la señal de insulina, inducida por Ang II. En nuestros resultados, tras los pre-estímulos de Ang II 100 nM a diferentes tiempos y después insulina 100 nM durante 10 min (Figura 19), hubo respuesta similar a los adipocitos 3T3-L1: Ang II disminuyó la fosforilación de Akt a partir de los 15 min ($P=0.05$), sin embargo, hasta los 90 min de pre-estímulo con Ang II ($P=0.0001$) disminuyó la fosforilación al basal con respecto a insulina. Este resultado concuerda con la fosforilación en IR (Figura 20), donde a los 90 min de pre-estímulos con Ang II el resultado es significativo. En los resultados se colocaron 3 controles, las células no estimuladas, células estimuladas con insulina 100 nM y células estimuladas con Ang 100 nM.

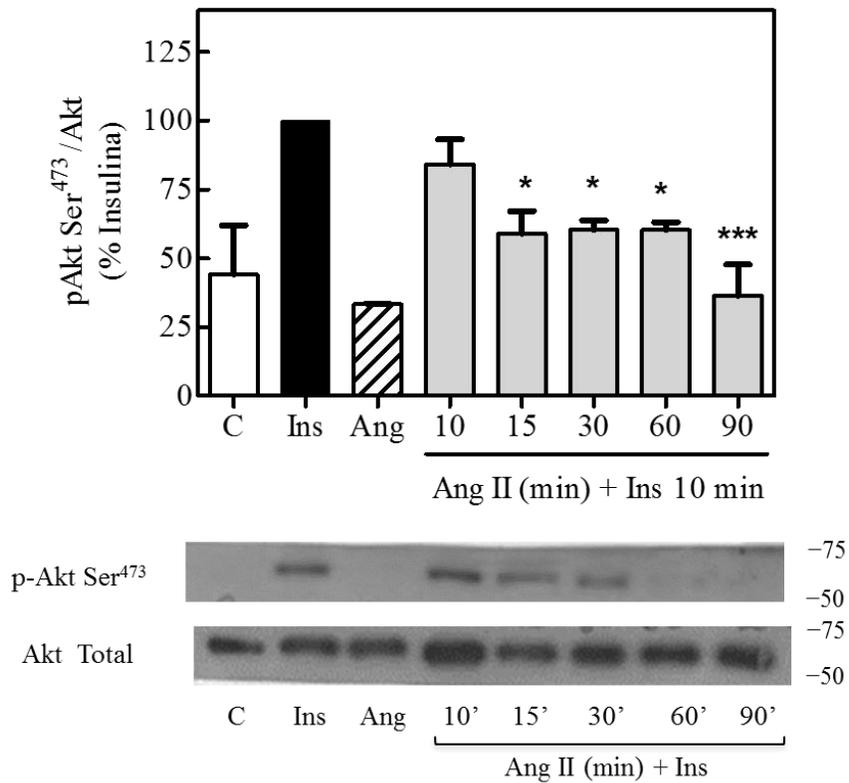


Figura 19. Efecto de Ang II en la fosforilación de Akt estimulada por insulina. Los adipocitos aislados en suspensión fueron pre estimulados a 10, 15, 30, 60 y 90 min con Ang II 100 nM, y después estimulados con insulina 100 nM por 10 min. Para esta figura el análisis estadístico se realizó con una n=3 y se muestra un blot representativo. Los resultados son normalizados con respecto al total de Akt. La gráfica se muestra en porcentaje respecto al porcentaje de insulina donde * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$.

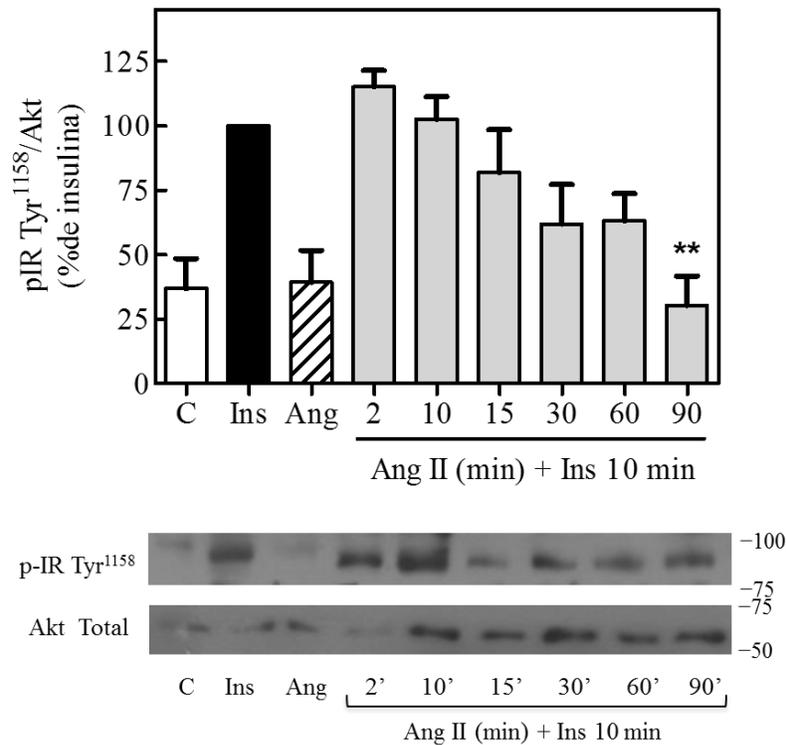


Figura 20. Efecto de Ang II en la fosforilación de IR estimulada por insulina. Los tiempos de estímulo con angiotensina fueron de 2, 10, 15, 30, 60 y 90 min en células en suspensión y se colocaron 3 controles: células no estimuladas, células estimuladas con insulina y células estimuladas con Ang II. El análisis estadístico se realizó con una n=3 y se muestra un blot representativo. La gráfica se muestra en porcentaje respecto al porcentaje de insulina donde ** $P < 0.01$.

7.6 Uso de inhibidores

Como posible mecanismo de desensibilización de la vía de insulina está la actividad de las PKC's que fosforilan en residuos de serina (fosforilación de regulación negativa) a diferentes sitios de la vía; estas PKC's son activadas por los estímulos de Ang II-AT₁R. Así, postulamos que las PKC's podrían regular de la vía de insulina. Para evidenciar esta hipótesis incubamos adipocitos con dos inhibidores de PKC's, clásicas y nuevas: BIM y Gö 6976. En la figura 21 se observa que el efecto inhibitorio de Ang II sobre la respuesta de insulina es revertido, de manera significativa, cuando se utilizan ambos inhibidores, lo que sugiere que PKC's tienen un papel importante en el efecto de Ang II en la señal de insulina.

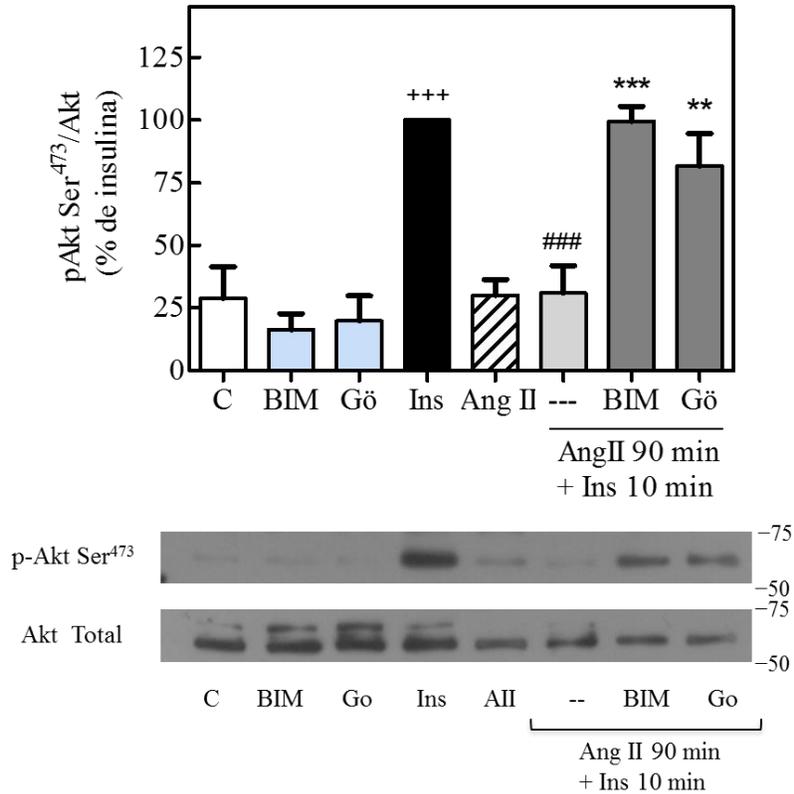


Figura 21. Uso de inhibidores con estímulos de Ang II más insulina. Para este experimento, se colocaron como controles células no estimuladas, el uso de los inhibidores sin ningún otro estímulo, estímulos de Insulina y Ang II. El efecto de Ang II sobre la señal de insulina y el efecto con el uso de inhibidores se obtuvo con el tiempo de estímulo de Ang II a los 90 min. El análisis estadístico se realizó con una $n=3$ y se muestra un blot representativo. Las comparaciones estadísticas se realizan con respecto al control ($+++P<0.001$), con respecto al estímulo de insulina ($### P<0.001$) y con respecto al estímulo de Ang II 90 min más insulina 10 min ($** P<0.001$ y $*** P<0.01$).

8.- DISCUSIÓN

La Ang II es la principal hormona peptídica del RAS y tiene una función clave en la regulación de la presión arterial y el volumen de sangre circulante. El mecanismo de acción de la hormona se da por la unión a su receptor AT₁, un GPCR. Actualmente se conoce que los GPCR's además de tener efecto en sus vías canónicas, pueden regular, de forma positiva o negativa, receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's), permitiendo regular procesos fisiológicos de manera sinérgica. Este mecanismo es la comunicación cruzada en dos sistemas de señalización que puede funcionar de manera bidireccional. Dicho mecanismo molecular fue descrito en fibroblastos de rata estimulados con endotelina-1, ácido lisofosfatídico y trombina, agonistas de GPCR's, que indujeron la rápida fosforilación del EGFR. Por otra parte, muestran que la inhibición específica de la función del EGFR con tirfostina AG1478 y el uso de un mutante negativo suprimió la activación de la quinasa MAP e inhibió fuertemente la fosforilación de tirosina de SHC tras la estimulación del GPCR. Esto indicó un papel para los RTK's como mediadores en la señalización mitogénica de los GPCR's, sugiriendo un mecanismo nuevo e independiente de regulación intracelular (Daub H *et al.*, 1996).

La evidencia actual sobre la regulación AT₁R en la señalización de insulina concuerda entre modelos, con diversos mecanismos dependientes del modelo celular. Sin embargo, los estudios en adipocitos son discrepantes a pesar de tener un RAS local considerado como fuente importante de componentes del RAS sistémico. Un aspecto importante de la producción de péptidos de angiotensinógeno y / o angiotensina, derivados de la grasa, es su contribución relativa a la hipertensión relacionada con la obesidad y resistencia a insulina. (Kalupahana y Moustaid-Moussa, 2012)

La insulina estimula múltiples vías de señalización para regular la homeostasis de la glucosa, el crecimiento y desarrollo celular. La desregulación de los procesos posteriores a la insulina-IR puede provocar enfermedades como diabetes, hipertensión y cáncer (Saltiel A y Kahn C, 2001). Akt (o proteína cinasa B) es una enzima importante en la vía de señalización de la insulina. Akt se activa vía PI3K y promueve la captación de glucosa al traslocar GLUT-4 a

la membrana celular. La resistencia a la insulina es la disminución en la respuesta a insulina-IR.

En este estudio usamos antecedentes directos en células 3T3-L1 donde el efecto de Ang II sobre la señalización de insulina es disminuir la captación de glucosa (Figura 9), es decir, uno de los pasos finales de la vía. Por otra parte, se demostró que Ang II sobre la vía de insulina tiene efectos a nivel de por aumento en su fosforilación en residuos de serina, fosforilación que regula negativamente, congruente con la disminución de captación de glucosa. Estos antecedentes y la falta de evidencia para sustentar la respuesta y el mecanismo de Ang II sobre la señal de insulina, usamos adipocitos aislados en suspensión, extraídos de ratones Balb-c machos y estandarizamos el método.

Tras la extracción, las células se aislaron conforme al método descrito (Figura 13); para verificar observamos bajo microscopio con imágenes de contraste de fases y epifluorescencia (Figura 14). En las imágenes observamos las células aisladas sin residuos de algún otro tipo celular, la tinción con rojo oleoso (Figura 14 panel C), colorante lipófilo que difunde hacia el material lipídico, permitió asegurar esta situación. El uso de DAPI permitió identificar en las imágenes que fueran células y no micelas de grasa, y aunque la tinción parece ser difusa y que algunas células no absorbieron el colorante (Figura 14 panel D), se observan núcleos definidos en el centro. La inespecificidad mostrada en la imagen pudo deberse a la dificultad de la técnica para hacer los lavados, pues al ser células en suspensión, el medio y los colorantes deben eliminarse para evitar saturación al tomar las imágenes.

Una vez hecho esto, se evaluó la respuesta de las células con estímulos de insulina. Para ello estandarizamos la cantidad de células a tomar por volumen (Figura 15). Se tomaron células estimuladas y no estimuladas con insulina para ver la fosforilación de Akt, en nuestros resultados, la mayor respuesta fue con 250 μ l. Muy probablemente la respuesta varía en función de cuántas células están en contacto con el medio de estímulo y como los adipocitos flotan y se aglomeran en la superficie, entre más células haya menor número tendrían contacto con el medio y con el estímulo.

Para detener los estímulos estandarizamos el amortiguador de lisis usado y una vez listas las condiciones para estimular a las células, hicimos los experimentos.

La respuesta de las células ante los estímulos de insulina fue inmediata. El experimento de curso temporal (Figura 17) mostró la fosforilación de Akt tras dos min de estímulo con insulina, que aumentó significativamente con respecto al tiempo desde 10 hasta 90 min.

Un experimento que llamó la atención fue el curso temporal con estímulos de Ang II pues se fosforiló Akt con respecto al tiempo, siendo 60 min el tiempo con mayor fosforilación (Figura 18); sin embargo, a los 90 min disminuyó hasta el valor basal. Este dato no se ha descrito en células adiposas, aunque hay estudios que relacionan la fosforilación de Akt inducida por angiotensina vía la participación de PI3K, y en células del endotelio vascular como mecanismo antiapoptótico de supervivencia celular (Hirokazu O *et al.*, 2014). Por otra parte, en células mesangiales glomerulares la Ang II también activa Akt por un mecanismo independiente de PI3K (Gorin Y *et al.*, 2001).

Para evaluar el efecto de Ang II en la vía de insulina, analizamos la fosforilación de Akt (figura 19), en donde la fosforilación disminuye similar a las células 3T3-L1; sin embargo, la caída de fosforilación al valor basal ocurrió a los 90 min, en contraste con los 5 min de estímulo con angiotensina en 3T3-L1. Este dato es congruente con la fosforilación en residuos de Tyr del IR inducida por insulina, en donde la fosforilación del IR disminuyó a los 90 min de estímulo con Ang II. Nuestros resultados son interesantes ya que muestran que la regulación tiene efecto sobre IR, a diferencia de otros modelos donde la regulación de Ang II se da río abajo de la cascada de señalización de insulina.

El mecanismo propuesto es Ang II regula la señal de insulina por activación de PKC's tras activación del receptor AT₁. La activación del receptor de Ang II promueve la actividad de diversas PKC's que fosforilan en residuos de serina a diversas proteínas y tienen efecto en la regulación de los RTK's. Para corroborar esto, utilizamos dos inhibidores de PKC's BIM1 inhibe selectivamente las isoformas α , β 1, β 2, γ , δ y ϵ , permeable a las células y reversible; y el inhibidor Gö 6976, indolocarbazol nonglycosidico, competitivo con el sitio de ATP y selectivo para isoformas α y β 1. Cuando las células se incubaron con los inhibidores, estos no tenían efecto sobre la fosforilación de Akt (Figura 21); sin embargo, cuando se incubaron y se adicionó Ang II 90 min, más insulina 10 min la fosforilación de Akt fue recuperada respecto al estímulo de insulina, indicando que inhibir las PKC's tanto clásicas como nuevas no hubo efecto de Ang II sobre la vía de insulina.

9.- CONCLUSIONES

El trabajo permitió obtener los siguientes resultados: se aislaron los adipocitos extraídos del tejido adiposo epididimal de ratones macho Balb-C, con lo que continuamos los experimentos para evaluar el objetivo principal: el efecto de Ang II en la señal de insulina en este modelo celular; también mejoramos las imágenes de microscopia para asegurar la integridad de las células. Por otra parte, los estímulos evidenciaron la respuesta de Ang II en los adipocitos, similar a la obtenida en las células 3T3-L1; sin embargo, el efecto máximo de inhibición de Ang II sobre la vía de insulina ocurrió a los 90 min en Akt y en IR. El mecanismo postulado involucra a las PKC's como mediadoras de la vía de señal de insulina y nuestra hipótesis fue corroborada con los inhibidores, cuando el efecto de Ang II fue revertido.

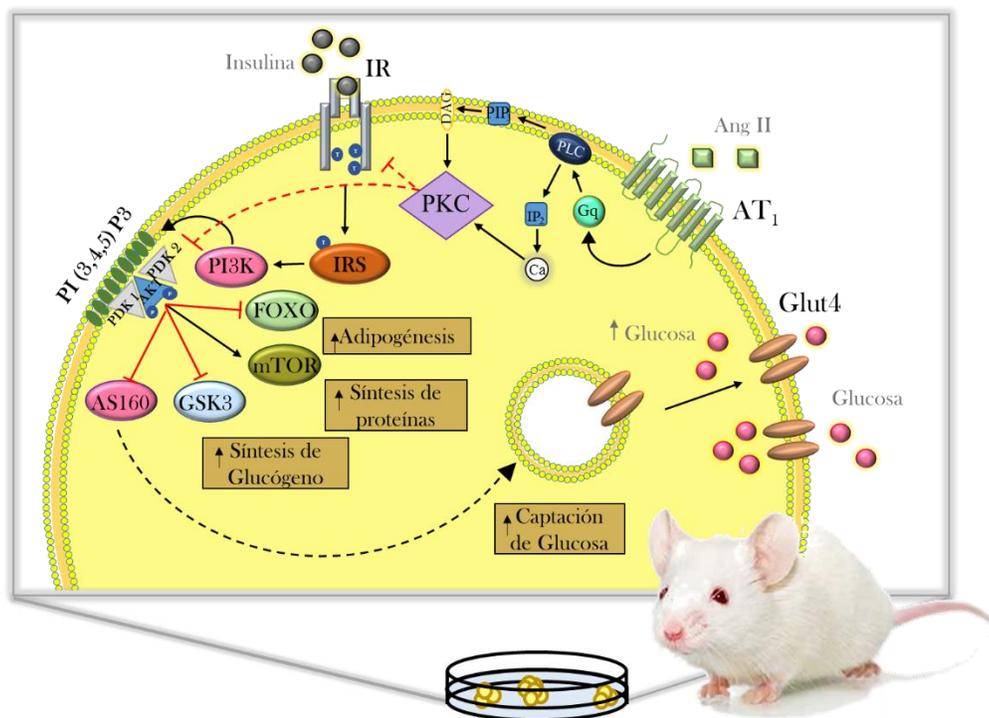


Figura 22. Esquema del modelo propuesto del efecto de Ang II sobre la señal de insulina. Representación de la unión de Ang II a su receptor y la posterior activación de la vía que promueve la activación de PKC's que tienen efecto directo sobre la vía de insulina.

10.- PERSPECTIVAS

Para precisar el mecanismo propuesto: Ang II desensibiliza la señal de insulina, es necesario evaluar la fosforilación en IRS, proteína río abajo del IR y río arriba de Akt; estudiar la fosforilación de AS160 o experimentos de captación de glucosa para conocer si la inhibición por Ang II sobre insulina influye en el transporte de glucosa; evaluar por co-immunoprecipitaciones la asociación entre PKC's y el IR tras estímulos de Ang II, y analizar si existe fosforilación en residuos de serina. Por otra parte, también sería interesante evaluar el efecto que tiene Ang II por si sola en las células adiposas aisladas.

11.- ANEXOS

Solución	Reactivo	Concentración
Amortiguador de transferencia semiseca	Tris-base	25 mM
	glicina	192 mM
	metanol	20%
TBST 0.1 Ph 7.6	Tris base	20 mM
	NaCl	177 mM
	Tween	0.1%
Solución de digestión	PBS suplementado con glucosa 5 mM	5 ml
	CaCl	100 μ M
	BSA	1%
	colagenasa de <i>Clostridium histolyticum</i> tipo I Sigma Cat: C6885	0.6 mg/ml.
Stock de rojo oleoso	Polvo Rojo Oleoso	30 mg
	Isopropanol 99%	10 ml
Solución de rojo oleoso	Stock de rojo oleoso	9 ml
	Agua desionizada	6 ml
Amortiguador LB pH 8	NaCl	100 mM
	NaF	20 mM
	Pirofosfato de Na ⁺	10 mM
	Tris pH 8.0	50 mM

	EDTA	5 mM
Amortiguador Ripa	Amortiguador LB	
	Nonidet P-40	1%
	Desoxicolato de Na ⁺	1%
	SDS	0.1%

12.- BIBLIOGRAFÍA

- Arellano-Plancarte, A. (2011). *Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de las acciones de insulina por angiotensina II en células adiposas*. México, Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioquímica: Tesis de Maestría.
- Bader, M., & Ganten, D. (2008). Update on tissue rennin-angioensin systems. *J. Mol. Med*, 615 - 621.
- Blendea, M., Jacobs, D., Stump, C., McFarlane, S., Ogrin, C., & Bahtyiar, G. (2005). Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 353–359.
- Cappa, D. (2012). Tejido Adiposo: Anatomía y Estructura Básica. *Instituto de Educación Física Dr. Jorge E. Coll, Mendoza, Argentina. Journal PubliCE encontrado en: <https://g-se.com/tejido-adiposo-anatomia-y-estructura-basica-1479-sa-r57cfb2721bbee>, 0.*
- Carvalhoira, J., Calegari, V., Zecchin, H., Nadruz, W., Guimaraes, R., & Ribeiro, E. (2003). The cross-talk between angiotensin and insulin differentially affects phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling in rat heart: implication for insulin resistance. *Endocrinology*, 5604 - 5614.
- Castro, P., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V., & Wagner, C. (2010). Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, 607-673.
- Chi-Chang, J., Yueh, C., Liang-Yi, W., Wei-Ming, Y., Chih-Ling, Ying-Hsiu, L., . . . Low-Tone, H. (2005). Angiotensin II Enhances Insulin Sensitivity in Vitro and in Vivo. *Endocrinology*, 146 (5) 2246–2254.
- Daub, H., Weiss, F., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, (6565) 557–560.

- Dünner, N., Quezada, C., Berndt, F., Cánovas, J., & Rojas, C. (2013). Angiotensin II Signaling in Human Preadipose Cells: Participation of ERK1,2-Dependent Modulation of Akt. *PLoS ONE*, 8 (10) e75440.
- Fu, Q., Wang, Q., & Xiang, K. (2017). Insulin and β -Adrenergic Receptor Signaling: Crosstalk in Heart. *Trends Endocrinol Metab*, 416 – 427.
- Gastaldelli, A., Gaggini, M., & DeFronzo, R. (2017). Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. *Diabetes*, 66 (4): 815-822.
- Gorin, Y., Kim, N., Feliars, D., Basante, B., Goutam, G., Abboud, C., & Hanna, E. (2001). Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. *The Faseb Journal*, 15 (11) 1909-20.
- Gutiérrez-Rodelo, C. (2018). *Mecanismos moleculares involucrados en las acciones de insulina por la Ang II en células adiposas*. México, Centro de investigación y de estudios avanzados de Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioquímica: Tesis de doctorado.
- Gutmann, T., Kim, K., Grzybek, M., Walz, T., & Coskun, Ü. (2018). Visualization of ligand-induced transmembrane signaling in the full-length human insulin receptor. *J Cell Biol*, 217 (5) 1643-1649.
- Guzmán-Silva, A., & García-Sáinz, J. (2018). G protein-coupled receptors and their multiple facets. *Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM Mens. Bioquim.*, 42: 118-129.
- Haeusler, R., McGraw, T., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19 (1) 31–44.
- Haxho, F., Haq, S., & Szewczuk, M. (2018). Biased G protein-coupled receptor agonism mediates Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 crosstalk to induce transactivation of insulin receptor signaling. *Cellular Signalling*, (43) 71-84.
- Henriksen, E. (s.f.). Chapter 1 - Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. En W. R. Ross, & V. Preedy, *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (págs. 3-17). 2019: Academic Press (Second Edition).
- Hirokazu, O., Hitoshi, T., Hideyasu, O., Kiyoshi, S., Izumi, S., Noriko, M., . . . Yoshihito, H. (2014). Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Regulates Angiotensin II-Induced Inhibition of Apoptosis in Microvascular Endothelial Cells by Governing Survivin Expression and Suppression of Caspase-3 Activity. *Circulation Research*, 94 (6) 785–793.

- Jones, B., Standridge, M., & Moustaid, N. (1997). Angiotensin II Increases Lipogenesis in 3T3-L1 and Human Adipose Cells. *Endocrinology*, 138 (4) 1512-1519 .
- Kalupahana, N., & Moustaid-Moussa, N. (2012). The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Reviews*, 13: 136-149.
- Koca, N., Güclü, M., Esen, İ., Emlek, G., Kiyici, S., & Kisakol, G. (2019). Physical Activity and Insulin Sensitivity in Type 1 DM. *Turk J Endocrinol Metab*, 23:8-18.
- Landa-Galván, H. (2014). *Efecto del ácido graso ω 3 DHA en la vía de insulina en cultivo primario. Tesis de maestría.* . México. Centro de investigación y de estudios avanzados de Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioquímica. : Tesis de Maestría.
- Lu, H., Cassis, L., Kooi, C., & Daugherty, A. (2016). Estructura y funciones del angiotensinógeno. Investigación sobre la hipertensión. *revista oficial de la Sociedad Japonesa de Hipertensión* , 39 (7) 492–500.
- Miura, S., Karnik, S., & Saku, K. (2011). Angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. . *Journal of Renin-angiotensin-Aldosterone System*, (12) 1-7.
- Müller-Esterl, W. (2008). Coordinación e integración del metabolismo. En *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida* (págs. 620 - 624). Barcelona, España : Reverté.
- Olivares-Reyes, J., & Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*, 27 (1) 9-18.
- Olivares-Reyes, J., Arellano-Plancarte, A., & Castillo-Hernández, R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Molecular and Cellular. Endocrinology*, 128–139.
- Oliveira, L., Costa-Neto, C., Nakaie, C., Schreier, S., Shimuta, S., & Paiva, A. (2007). . The Angiotensin II AT1 Receptor Structure-Activity Correlations in the Light of Rhodopsin Structure. *Physiol Rev*, (87) 565–592.
- Saltiel, A., & Kahn, C. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, (414) 799–806 .
- Saltiel, R., & Pessin, E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology*, (12) 65-71.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry*, 5463-5467.

- Sanni, S., Lyngs, C., Gammeltoft, S., & Hansen, J. (2018). [Sar1, Ile4, Ile8]-angiotensin II Potentiates Insulin Receptor Signalling and Glycogen Synthesis in Hepatocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, (122) 460-469.
- Shaw, L. (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 10 (11) 1750–1756.
- Vázquez-Jiménez, J., Roura-Guiberna, A., Jiménez-Mena, L., & Olivares-Reyes, J. (2017). El papel de los ácidos grasos libres en la resistencia a la insulina. *Gac Med Mex*, 153:852-863.
- Ward, C., & Lawrence, M. (2011). Landmarks in insulin research. *Front Endocrinol*, (2) 76: 1-11.
- Weiss, M., Steiner, D., & Philipson, L. (2014). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. En K. Feingold, B. Anawalt, & A. Boyce, *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>.
- Whaley-Connell, A., & Sowers, J. (2018). The Role of Insulin Resistance in the Cardiorenal Syndrome. En B. Debasis, & N. Sreejayan, *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome* (págs. 117-124). San Diego, Estados Unidos: Academic Press.
- White, M. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science*, 5651 (302): 1710–1711.