



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

“Efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II”

Tesis que presenta:

Lic. Wendy Rodríguez Vera

Para Obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de:

Bioquímica

Director de Tesis:

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

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. 589966). Este trabajo fue apoyado por el donativo 167673 SEP/CONACYT

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes por aceptarme en el laboratorio e incluirme en este interesante proyecto, además, por su comprensión y excelente calidad humana.

A mis asesores la Dra. Guadalupe Reyes y el Dr. Agustín Guerrero Hernández, por sus valiosas sugerencias y aportes al trabajo.

A todos los profesores del departamento de Bioquímica por su contribución a mi formación como maestra.

A mis compañeras Huguet, Mónica, Kari, Citlaly, Adri, Pao y Fer, por hacer del laboratorio un gran lugar para trabajar y estar siempre dispuestas a ayudar y transmitir sus experiencias.

A Judith Hernández y Esperanza Jiménez por su apoyo técnico durante todo el trabajo.

A Priscila, Angie y Rocío por estar siempre listas para ayudar con la mejor disposición.

A mis compañeros de generación: Mónica, Sandra, Eddy, Víctor y Noe, por haber formado tan lindo grupo. Es un placer haberlos conocido y compartir estos dos años de estudio.

A mi familia por el apoyo incondicional que siempre me ha dado.

A mi esposo, porque sin él no creo haberlo logrado.

Y a México, un país mágico que me ha llenado de hermosas experiencias, y a Conacyt por el apoyo económico que me permitió estar aquí y hacerme maestra.

A todos, ¡muchas gracias!

Índice

Listado de Figuras	1
Abreviaturas	3
Resumen	5
Summary	6
1. Introducción	7
1.1 Mecanismos de señalización de la insulina	7
1.2 Mecanismos de señalización de Ang II	9
1.3 MAP cinasas	11
1.3.1 Mecanismos de activación de ERK1/2	13
1.3.1.a Efectos de la activación de ERK1/2 por Ang II.....	14
1.4 β -arrestinas: moléculas multifuncionales	15
1.4.1 Papel en la desensibilización, internalización y degradación de los GPCRs	16
1.4.2 β -arrestinas como moléculas de señalización	18
2. Antecedentes.....	20
2.1 Mecanismos de activación de ERK1/2 en HEK mediados por Ang II.....	20
2.2 Comunicación entre el AT ₁ R y el IR.....	23
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos.....	28
5.1 General	28
5.2 Objetivos específicos	28
7. Materiales y Métodos.....	29
7.1 HEK-19	29
7.2 Procedimiento experimental.....	30
7.3 Western-Blot	31

7.4 Análisis estadístico de los resultados.....	33
8. Resultados.....	34
8.1 El pretratamiento con insulina inhibe la activación de ERK1/2 inducida por Ang II	34
8.2 La ausencia de selección no afecta la respuesta a Ang II	36
8.3 Insulina no afecta la fosforilación basal ni el nivel de expresión de ERK1/2	37
8.4 Insulina no afecta los niveles de expresión de PKC δ	38
8.5 Efecto de la insulina en la expresión de las β -arrestinas	39
8.5.1 Insulina no afecta los niveles de expresión de β -arrestina 2	40
8.5.2 Insulina disminuye los niveles de expresión de β -arrestina 1	40
5. Discusión	42
6. Conclusiones	50
7. Perspectivas	51
8. Referencias Bibliográficas	52

Listado de Figuras

1. Vías de señalización de la insulina.....	8
2. Vías de señalización de Ang II a través del AT ₁ R.....	11
3. Diagrama de las principales vías de señalización de las MAPK.....	12
4. Papel de las β -arrestinas en la desensibilización, internalización, reciclamiento y degradación de los GPCR.....	16
5. Papel de β -arrestinas en la activación de MAPK.....	19
6. Ausencia de transactivación del EGFR bajo estímulo de Ang II en células HEK-293.....	20
7. Efecto de la inhibición de PKC en la activación de ERK1/2 por Ang II o PMA en células HEK-293.....	21
8. Efecto del inhibidor específico de PKC δ en la activación de ERK1/2 por Ang II.....	21
9. Efecto de Ang II en la distribución celular de AT ₁ R, β -arrestina 2 y ERK2.....	22
10. Efecto de insulina en los niveles de ARNm de AT ₁ R.....	24
11. Efecto de insulina en la expresión de AT ₁ R en la membrana.....	24
12. Efecto de insulina en la corriente de Ca ²⁺ generada por Ang II.....	25
13. Efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II en células HEK-19.....	25
14. Caracterización funcional del AT ₁ R-GFP expresado en células HEK-293.....	30
15. Efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II.....	35
16. Curvas de concentración-respuesta de la activación de ERK1/2 bajo estímulos de Ang II 5 minutos.....	36
17. Efecto en la activación de ERK1/2 de la ausencia del antibiótico de selección G418.....	37
18. Comparación de los niveles basales de pERK1/2 y ERK2 entre la condición control y la incubada con insulina.....	38

19. Niveles de expresión de PKC δ a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM.....	39
20. Niveles de expresión de β -arrestina 2 a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM.....	40
21. Niveles de expresión de β -arrestina 1 a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM.....	41
22. Mecanismo propuesto de inhibición de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II.....	49

Abreviaturas

AMPc	Adenosín-5'-Monofosfato cíclico
Ang II	Angiotensina II
AT ₁ R	Receptor tipo 1 de angiotensina II
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EC ₅₀	Concentración requerida para alcanzar el 50% del efecto máximo del estímulo
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
FBS	Suero fetal bovino
GEF	Factor intercambiador de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
Grb2	Proteína de unión 2 al receptor para el factor de crecimiento
GRKs	cinases de receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
HEK-19	HEK-293 transfectadas establemente con el AT ₁ R acoplado a la GFP
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-trifosfato
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Cinasa del extremo amino de c-Jun
MAPK	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Cinasa de 3-fosfatidilinositol
PIP ₃	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKC	Proteína cinasa C

PLC	Fosfolipasa C
RAS	Sistema renina-angiotensina
RTKs	Receptores con actividad de cinasa de tirosina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen

Ang II es la principal hormona efectora del sistema renina-angiotensina (RAS). Esta hormona es reconocida fundamentalmente por el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) tipo 1 para angiotensina II (AT₁R), el cual señala a través de la vía G_{q/11}/fosfolipasa C-β, generándose así segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ moviliza calcio (Ca²⁺) desde el retículo endoplásmico; este Ca²⁺ junto con el DAG activa PKCs clásicas y nuevas. Además, el AT₁R puede activar la vía de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) a través de varios mecanismos que involucran la participación de PKCs y β-arrestinas. Por otro lado, ha sido reportado que la insulina puede regular la actividad del AT₁R. En el presente trabajo investigamos las posibles interacciones entre los sistemas de señalización de insulina y Ang II. Utilizamos células HEK-293 que expresan establemente el AT₁R para elucidar el efecto de insulina en la activación de ERK1/2 inducida por Ang II. Encontramos que la incubación por 24 horas con 100 nM de insulina produce una disminución en la activación de ERK1/2 inducida por Ang II cuando se compara con las células control. Además, hallamos que este tratamiento no tiene efecto en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la activación de ERK1/2 como PKC δ y β-arrestina 2, ni tampoco en la fosforilación basal de ERK1/2. Interesantemente, descubrimos que el tratamiento con insulina conduce a una reducción de casi el 50% de los niveles de β-arrestina 1. Este resultado pudiera explicar el decremento en la activación de ERK1/2 debido a que β-arrestina 1 puede servir como una proteína de andamiaje para la cascada de ERK1/2 y conducir a su activación.

Summary

Angiotensin II (Ang II) is the major effector hormone of the renin-angiotensin system (RAS). This hormone is mainly recognized by the GPCR AT₁R, which signals via G_{q/11} to activate phospholipase C-β, which generates second messengers such as diacylglycerol (DAG) and inositol trisphosphate (IP₃). The IP₃ mobilize Ca²⁺ from endoplasmic reticulum, this Ca²⁺ with DAG activate classical and novel PKCs. Besides, AT₁R can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through several mechanisms involving the participation of PKCs and β-arrestins. On the other hand, it has been reported that insulin can regulate the activity of AT₁R. In the present work, we investigate the potential interactions between Ang II and insulin signaling systems. We used HEK-293 cells that stably express the AT₁R to elucidate the effect of insulin on the activation of ERK1/2 induced by Ang II. We found that a 24-hour incubation with insulin (100 nM) produced a decrease in the activation of ERK1/2 comparing with the control cells. Also, we found that this treatment has no effect on the levels of expression of related proteins with the activation of ERK1/2 like PKC δ and β-arrestin 2, neither the basal phosphorylation of ERK1/2. Interestingly, we found that insulin treatment leads to a reduction of almost 50 % of β-arrestin 1 levels. This finding could explain the decrease in the activation of ERK1/2 because β-arrestin 1 can serve as a scaffold to the ERK cascade and to lead its activation.

1. Introducción

Aun cuando las células están rodeadas por una membrana plasmática que actúa como barrera que separa el medio externo e interno, las células son capaces de responder a una gran variedad de estímulos extracelulares de origen tanto físico como químico, por ejemplo, hormonas, mitógenos, luz y convierten estas señales en procesos subcelulares. Esta conversión es iniciada usualmente por receptores de membrana, los cuales son subsecuentemente activados por el estímulo y transmiten la señal a diferentes blancos moleculares dentro de la célula, regulando así diferentes procesos intracelulares como la transcripción, traducción, metabolismo anabólico y catabólico, proliferación, motilidad, diferenciación e incluso apoptosis.

1.1 Mecanismos de señalización de la insulina

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos secretada por las células β pancreáticas en respuesta a elevadas concentraciones de nutrientes en sangre, que regula funciones importantes de la célula como el metabolismo de proteínas, lípidos y el de la glucosa (Rorsman, 2005). Esta hormona es reconocida por el receptor de insulina (IR), el cual pertenece a la familia de los receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs, por sus siglas en inglés) que incluye más de 50 miembros, entre los que destacan además del receptor para EGF (factor de crecimiento epidérmico), los receptores para VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), entre otros (Schlessinger, 2000). El IR constituye un heterotetrámero formado por dos subunidades α y dos β , unidas entre sí por puentes disulfuros. Las subunidades β son transmembranales y presentan la actividad catalítica, mientras que las α forman la región extracelular del receptor y el sitio de unión al ligando (Lee y Pilch, 1994; Taniguchi y col., 2006).

La unión de insulina a su receptor resulta en la activación de dos vías principales de señalización: la de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y la de la cinasa de 3-fosfatidilinositol (PI3K) /Akt (Olivares-Reyes y col., 2009) (Figura 1).

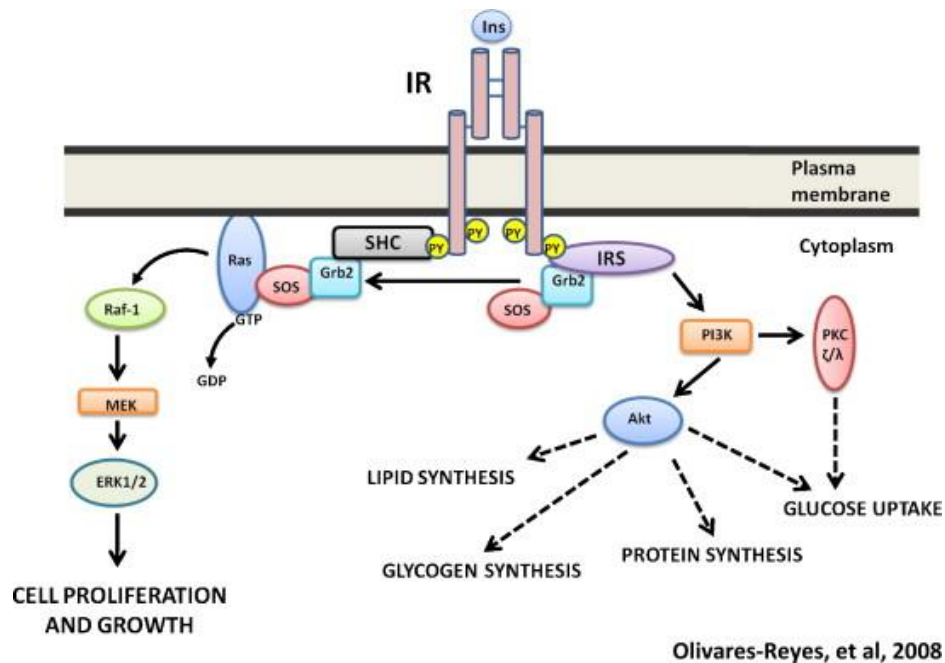


Figura 1. Vías de señalización de la insulina. La unión de la insulina a su receptor conduce a la autofosforilación del mismo en residuos de tirosina dentro de las subunidades β . Estos residuos funcionan como sitios de anclaje para distintas proteínas. La fosforilación de IRS conduce a la unión de otras proteínas como Grb2 y PI3K. La unión de PI3K conlleva a otros eventos de la cascada como son la activación de Akt y PKCs atípicas. La activación de estos efectores parecen ser claves en la regulación de la síntesis lipídica, de glucógeno, de proteínas y en la captación de glucosa. Por otro lado, la unión de Grb2 conduce a la activación de las MAPK relacionadas con procesos de crecimiento y proliferación celular. (Tomado de Olivares y col. 2009).

Cuando la insulina es reconocida por su receptor este se autofosforila en residuos de tirosina y fosforila otras proteínas como el sustrato del receptor de insulina (IRS). La proteína PI3K está formada por dos dominios, uno regulador p85 y otro catalítico p110; la subunidad p85 presenta dominios de homología a Src-2 (SH2) que reconocen las tirosinas fosforiladas de IRS. La unión entre PI3K e IRS promueve la actividad catalítica de p110, provocando incrementos en la formación de PIP_3 ; favoreciendo así la activación de la cinasa de Ser/ Thr Akt, proteína central en los efectos metabólicos de la insulina. Por otro lado, el IR fosforilado también es reconocido por la proteína SHC, y esta a su vez, por la proteína adaptadora Grb2, la cual une SOS, un factor intercambiador de guanina (GEF) que conduce a la activación de la proteína G pequeña Ras, iniciándose así la cascada de activación de las MAPK.

Esta vía está relacionada con las funciones proliferativas y de regulación génica de la insulina.

Es conocido que la insulina puede provocar cambios en los niveles de expresión de ciertas proteínas, alterando la síntesis, estabilidad o la traducción de ARNm específicos o induciendo modificaciones postraduccionales a proteínas existentes previamente que alteran su actividad o localización (O'Brien y Granner, 1996; O'Brien y col., 2001; Sutherland y col., 2007). Estos efectos sobre la expresión y actividad pueden ser tanto inhibitorios como estimulantes, y existen secuencias consenso descritas en los genes de dichas proteínas que median los efectos de la insulina en la transcripción (O'Brien y col., 2001). Los principales ejemplos de estas acciones de la insulina lo constituyen enzimas metabólicas como la glucosa 6-fosfatasa, la piruvato cinasa, la sintasa de ácidos grasos, entre otras, aunque se han descrito también sus efectos en hormonas y proteínas de secreción, factores de transcripción y en proteínas integrales de membrana (Sutherland y col., 2007).

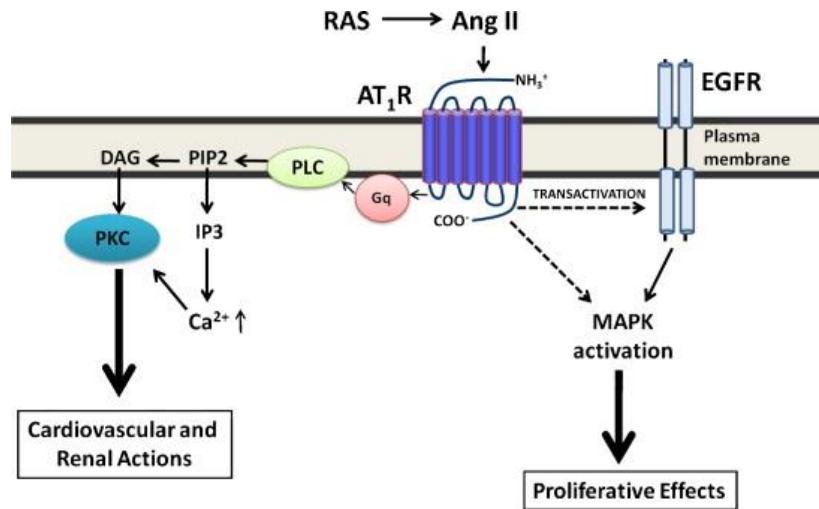
1.2 Mecanismos de señalización de Ang II

La angiotensina II (Ang II) es una hormona octapeptídica que media la mayoría de las acciones biológicas conocidas del sistema renina-angiotensina (RAS). Esta hormona regula la presión sanguínea, el volumen plasmático, así como la actividad del sistema nervioso simpático (Touyz y Berry, 2002); también está involucrada en varias enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis (Higuchi y col., 2007). La Ang II se forma a partir del corte enzimático del angiotensinógeno a Ang I por la proteasa aspártica renina, y la subsecuente hidrólisis de Ang I a Ang II por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Las acciones de la Ang II son iniciadas cuando interactúa con los receptores de angiotensina II de tipo 1 y 2 (AT₁R y AT₂R, respectivamente), ambos receptores pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs).

Los GPCRs son proteínas de membrana con siete dominios transmembranales, con su terminal amino en el lado extracelular y el carboxilo hacia el citoplasma. Estos receptores constituyen la familia más numerosa (>1,000 miembros en humanos) de

receptores de la superficie celular y responden a una gran variedad de estímulos como luz, neurotransmisores y hormonas (Pierce y Lefkowitz, 2001); así mismo constituyen aproximadamente el 40% de los blancos de las drogas terapéuticas existentes en la actualidad (Whalen y col., 2011). La unión del agonista a estos receptores conduce al intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de proteínas G heterotriméricas acopladas a la tercera asa intracelular o al extremo carboxilo de estas proteínas, provocando así su activación. Las subunidades α y $\beta\gamma$ se disocian una vez activada la proteína G, actuando sobre varios efectores celulares, como adenilatos ciclasas, fosfolipasas y canales iónicos.

Los principales efectos conocidos de Ang II son mediados por el AT₁R, el cual está distribuido ampliamente en órganos como el hígado, los riñones, el corazón, el cerebro y los pulmones (Mehta y Griendling, 2007). Este receptor se acopla principalmente a la proteína G_{q/11}, la cual activa a efectores río abajo como fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A₂ (PLA₂) y fosfolipasa D. La activación de PLC produce inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a partir del fosfolípido de membrana PIP₂ (Mehta y Griendling, 2007). El IP₃ se une a su receptor en el retículo endoplásmico, abriendo canales que permiten la liberación de calcio hacia el citoplasma, el cual, entre otras funciones, junto con el DAG formado, puede activar varias isoformas de PKCs las cuales se han relacionado con los efectos a nivel renal y cardiovascular de Ang II (Figura 2). Además, PKC también puede estar participando en la activación de las MAPKs (Shah y col., 2004). Por otro lado, muchos de los efectos proliferativos relacionados con Ang II están mediados por la transactivación de algunos RTK, incluyendo el receptor para EGF y PDGF (Olivares-Reyes y col., 2005), los cuales pueden conducir también a la activación de las vías de MAPK (Figura 2).



Olivares-Reyes, et al, 2008

Figura 2. Vías de señalización de Ang II a través del AT₁R. La unión de Ang II al receptor AT₁R acoplado a proteína G_{q/11} conduce a la activación de PLC que produce DAG e IP₃ los cuales median los efectos río abajo de Ang II tales como la activación de isoformas de PKC. Los efectos proliferativos de Ang II mediados por la activación de MAPK ocurren a través de un mecanismo dependiente de la transactivación de RTKs, como el EGFR y otro independiente de este proceso. (Tomado de Olivares y col. 2009).

1.3 MAP cinasas

Las MAPK es una familia de proteínas intracelulares con actividad cinasa de treonina y serina. Estas proteínas son activadas por un amplio espectro de estímulos extracelulares, a través de la fosforilación dual en residuos conservados de treonina y tirosina. La activación de MAPK está regulada por una cascada de proteínas cinasas, la cual incluye a MAPK cinasa (MAPKK) y MAPK cinasa cinasa (MAPKKK); estas proteínas fosforilan y activan sucesivamente al componente de la cascada que se ubica río abajo. En las células de mamíferos existen al menos 3 tipos de cascada de MAPK: JNK (cinasa del N-terminal de c-Jun), p38/HOG1 y ERK (cinasa regulada por señales extracelulares) (Luttrell y Lefkowitz, 2002) (Figura 3).

La vía de JNK es activada cuando las células se exponen a citocinas y estrés ambiental (Weston y Davis, 2007). JNK contribuye al control de un gran número de procesos celulares como proliferación, apoptosis y desarrollo embrionario. La vía de JNK ha sido implicada en hipertrofia cardíaca (Berridge, 2014).

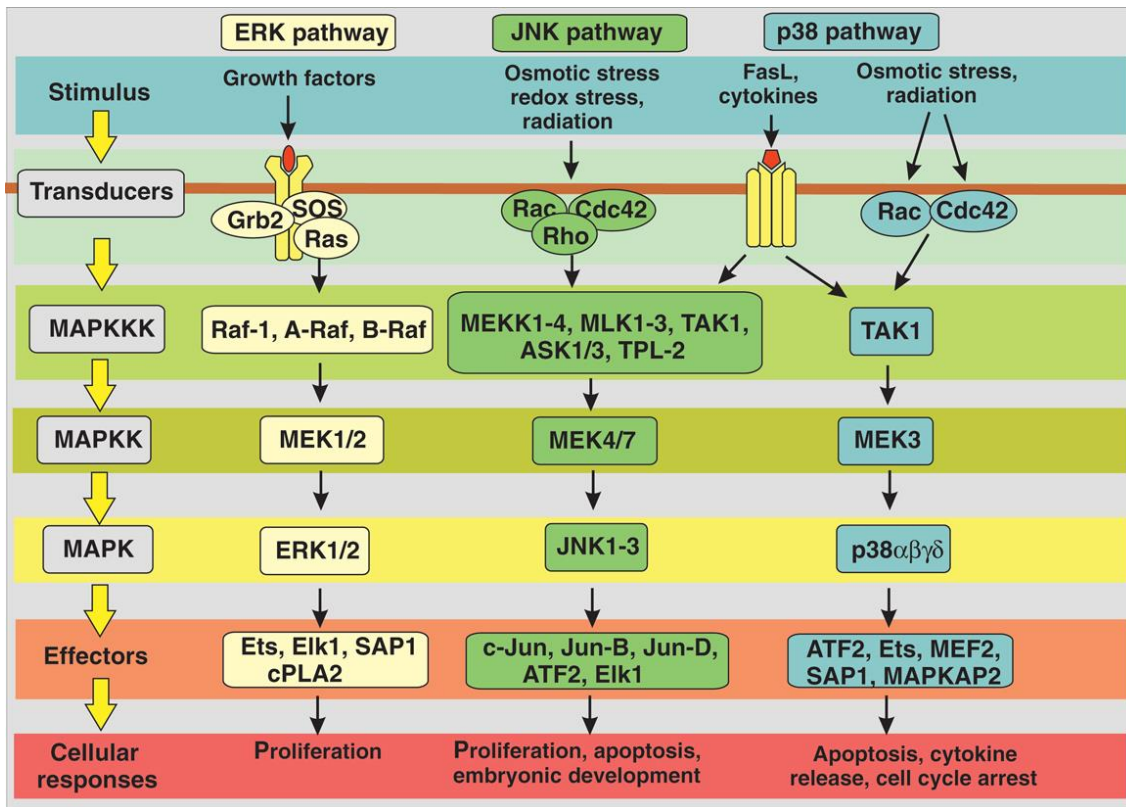


Figura 3. Diagrama de las principales vías de señalización de las MAPK. A la izquierda se resume la vía genérica y secuencial de activación de las MAPKs; un estímulo externo puede actuar sobre una gran variedad de receptores que estimulan al primer elemento de la vía, constituido por más de 14 diferentes MAPKKKs, luego estas fosforilan al siguiente elemento, representado por más de 7 MAPKKs. Finalmente, estas MAPKKs fosforila a una de las 7 MAPKs conocidas, cuyo nombre define las diferentes vías de señalización. A la derecha se muestra las tres vías principales de MAPKs, con los nombres de las moléculas específicas que conforman la cascada correspondiente. Las tres vías principales son: la vía de ERK, la vía de JNK y la vía de p38. (Tomado de Berridge, M.J. (2014) Cell Signalling Biology)

La vía de p38/HOG1 está involucrada en la detención del crecimiento, el control de la apoptosis y en la liberación de citoquinas por macrófagos y neutrófilos (Pearson y col., 2001; Zarubin y Han, 2005; Sui y col., 2014). La vía de p38 puede ser activada por diferentes estímulos que incluyen estrés ambiental como el osmótico, redox y de radiación.

1.3.1 Mecanismos de activación de ERK1/2

La vía de la MAPK ERK1/2 fue la primera en ser identificada (Ahn y col., 1991; Boulton y col., 1991), su cascada está conformada por las cinasas Raf-1 y B-Raf (MAPKKK) que actúan sobre MEK1 y MEK2 (MAPKK). MEK1 y MEK2 tienen la propiedad de fosforilar en treonina/tirosina, y llevan a cabo la fosforilación y activación de ERK1/2.

Muchos receptores de membrana conducen a la activación de esta cascada una vez estimulados, entre ellos y uno de los más caracterizados se encuentran los RTKs. La unión del ligando a estos receptores provoca un aumento en su actividad de cinasa de tirosina, conduciendo a la autofosforilación; estas fosforilaciones pueden ser reconocidas por una gran variedad de proteínas con dominios SH2 incluyendo las proteínas adaptadoras Shc y Grb2. El dominio SH3 de la proteína SOS interactúa con regiones ricas en prolina en las proteínas adaptadoras unidas al receptor, completando así la formación del complejo activador de Ras. SOS estimula el intercambio de GDP por GTP en Ras, la cual con GTP unido interactúa con varias moléculas río abajo como Raf (Fabian y col., 1993; Vojtek y col., 1993). La interacción directa entre Ras y Raf hace que se localicen en la proximidad de la membrana, lo que puede servir para la interacción con otras proteínas como miembros de la familia de Src, e isoformas de PKC. Estas cinasas pueden fosforilar al complejo Ras-Raf incrementando su actividad hacia otros sustratos o la interacción con otras proteínas (Kolch y col., 1993). La activación de Raf conduce a la activación de la vía MEK1/2-ERK1/2 como ya se mencionó.

Por otro lado, los GPCR también pueden conducir a la activación de ERK1/2. Los receptores acoplados a proteína $G_{\alpha s}$ activan a la enzima adenilato ciclasa, la cual aumenta las concentraciones intracelulares de AMPc, este incremento puede aumentar, disminuir o no tener efecto sobre la actividad de ERK1/2. Al parecer el efecto es dependiente del tipo celular y posiblemente de otros factores que no están bien establecidos (Raman y col., 2007). Evidencias *in vivo* indican que los receptores acoplados a $G_{\alpha i}$ emplean las subunidades $\beta\gamma$ para la activación de ERK1/2, así la expresión exógena de $\beta\gamma$ es suficiente para activar ERK1/2 (Lopez-Illasaca y col.,

1997). La activación de ERK1/2 por los receptores acoplados a $G_{\alpha q}$ pueden requerir tanto a Ras como PKCs (Alessi y col., 1995; Daub y col., 1996). Estos receptores provocan la activación de PKCs por el mecanismo que ya se mencionó en el epígrafe 1.2; para el AT₁R se ha descrito que PKC puede fosforilar a Raf y así conducir a la activación de la vía de ERK1/2 (Shah y col., 2004).

Otro modo de activación de ERK1/2 que emplean los GPCRs es a través de la transactivación de los RTKs, y también mediante proteínas de andamiaje durante su endocitosis y tráfico intracelular, como son las β -arrestinas.

Una vez activadas ERK1/2 tienen diversas dianas moleculares con múltiples funciones en casi todos los compartimentos celulares como Golgi, mitocondria y núcleo (Wortzel y Seger, 2011); este último constituye el principal destino de las moléculas de ERK1/2 activadas. Luego de 10 a 20 minutos del estímulo pueden encontrarse alrededor del 50 al 70 % de las moléculas en esta localización (Chen y col., 1992). Los efectos nucleares de ERK1/2 se llevan a cabo a través de una gran cantidad de sustratos, proteínas e interacciones directas con el ADN. Estos efectos incluyen la activación de factores transcripcionales (p. ej. activación de Elk1 (Gille y col., 1992), la modulación de la supresión de la transcripción (p. ej. Supresión de Erf-1 (Sgouras y col., 1995)) e incluso el remodelado de la cromatina (p. ej. la regulación de PARP-1 (Cohen-Armon y col., 2007)). Los efectos de ERK1/2 finalmente conducen a la regulación de procesos tan disímiles como proliferación, diferenciación y transformación oncogénica de las células.

1.3.1.a Efectos de la activación de ERK1/2 por Ang II

Como ya se mencionó una de las vías activadas por Ang II es la de ERK1/2. La estimulación de esta vía por Ang II está asociada con un aumento en la expresión de genes de respuesta temprana como *c-fos*, *c-myc* y *c-jun*. (Robinson y Cobb, 1997; Touyz y Berry, 2002), relacionados con un incremento a su vez de la expresión y producción de factores de crecimiento como PDGF, EGF, IGF-1 y factor activador de plaquetas, agentes vasoconstrictores, como ET-1, moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 e integrinas, así como de factores quimiotácticos (Hsueh y col., 1995).

Estos agentes contribuyen a los efectos de Ang II en el crecimiento, remodelado y la diferenciación celular.

Aunque la activación de ERK está típicamente relacionada con los efectos mitogénicos de Ang II, existen datos que indican que esta vía puede tener un papel en la contracción vascular (Touyz y Schiffrin, 1996; Epstein y col., 1997); por ejemplo, inhibidores de MEK atenúan la contracción causada por Ang II. Además, MEK/ERK puede incrementar la disponibilidad de Ca^{2+} dentro de las células, el cual está directamente relacionado con la contracción (Touyz y col., 1999b). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de ERK en respuesta a Ang II es mayor en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), sugiriendo que alteraciones en esta vía puede explicar la contractilidad aumentada en SHR y por tanto tener relación con la aparición de hipertensión (Touyz y col., 1999a).

1.4 β -arrestinas: moléculas multifuncionales

Las β -arrestinas fueron inicialmente identificadas a mediados de la década de los 80 durante estudios iniciales sobre el papel de la cinasa de los receptores acoplados a proteína G (GRKs) en la desensibilización de los receptores β_2 adrenérgicos en sistemas purificados y reconstituidos (Benovic y col., 1987). En estos trabajos encontraron que a medida que aumentaban la pureza de la cinasa, la capacidad de inactivar el receptor disminuía; además, observaron que esta propiedad era restaurada adicionando al sistema arrestina retinal, una proteína caracterizada previamente como importante en el desacople de rodopsina de la proteína G heterotrimérica retinal (Benovic y col., 1987), por lo que estos autores concluyeron la posible existencia de proteínas análogas a la arrestina retinal en otros tejidos. En la actualidad se han clonado en vertebrados 4 tipos de arrestinas (arrestinas 1-4) (Freedman y Lefkowitz, 1996; Ferguson, 2001); la 1 y la 4 son las arrestinas visuales expresadas únicamente en los conos y bastones retinales (Shinohara y col., 1987; Yamaki y col., 1987; Murakami y col., 1993; Craft y col., 1994); mientras que la 2 y 3, también conocidas como β -arrestina 1 y 2, respectivamente, se expresan ubicuamente en todos los tejidos de mamíferos (Barki-Harrington y Rockman, 2008). Existen dos mecanismos principales que promueven el reclutamiento de las β -arrestinas al receptor: 1) el

cambio conformacional en el GPCR inducido por la unión del agonista y 2) la fosforilación en el carboxilo terminal del mismo mediada por las GRKs (Gurevich y Benovic, 1993; Reiter y col., 2012).

1.4.1 Papel en la desensibilización, internalización y degradación de los GPCRs

Las β -arrestinas participan en el proceso conocido como desensibilización homóloga. Este proceso se inicia unos segundos después del estímulo cuando el receptor es fosforilado en el carboxilo terminal por las GRKs; los grupos fosforilados constituyen sitios de anclaje para β -arrestinas. Esta unión, entre receptor y β -arrestinas, impide el acople sucesivo del receptor con proteínas G y por tanto la terminación de la señal dependiente de proteína G (Figura 4).

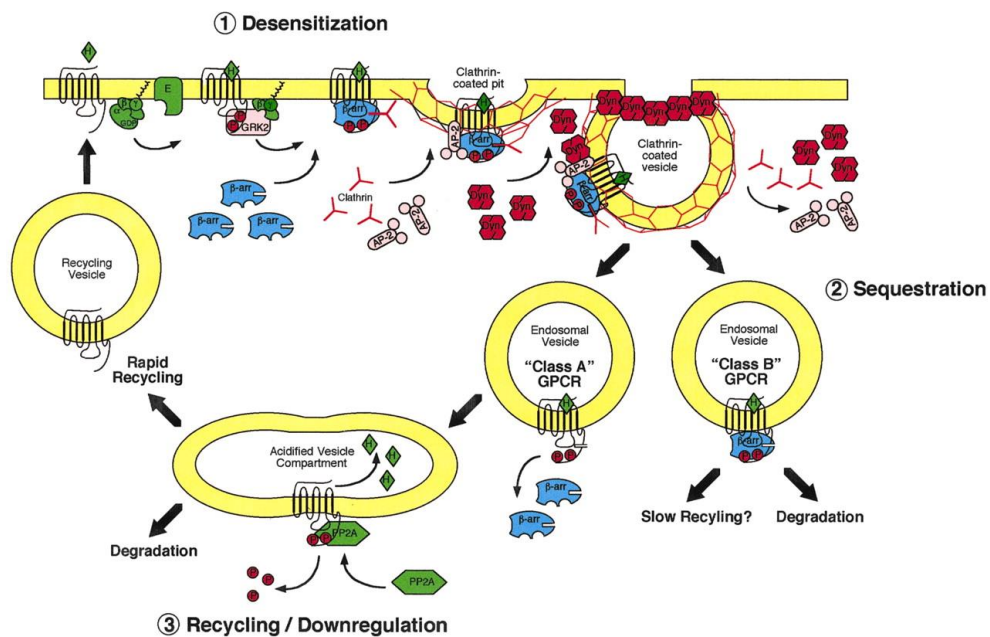


Figura 4. Papel de las β -arrestinas en la desensibilización, internalización, reciclamiento y degradación de los GPCRs. (1) Una vez estimulado el receptor este es fosforilado por acción de las GRKs, lo cual permite la unión de β -arrestina, conduciendo a la terminación de la señal dependiente de proteína G. (2) β -arrestina unida al receptor también funciona como proteína adaptadora que permite la unión de varias proteínas de la maquinaria endocítica de la célula; una vez internalizado los GPCRs, muestran dos patrones de interacción con β -arrestina, que permite clasificarlos en clase A y B, según la estabilidad de la interacción. (3) Los receptores en las vesículas pueden ser reciclados hacia la membrana o dirigidos a degradación (Tomado de Luttrell y col. 2002).

Otro proceso importante en el cual están implicadas las β -arrestinas es el de la internalización del receptor (Figura 4). Se conoce que la fosforilación mediada por las GRKs de los GPCRs y la posterior unión de β -arrestinas al receptor promueve la endocitosis de muchos GPCRs, como el β_2 adrenérgico, el AT₁R, el m2-m5 muscarínico colinérgico, entre otros. Las β -arrestinas contienen motivos dentro de su carboxilo terminal que le permite funcionar como sitio de anclaje para múltiples proteínas que direccionan a los GPCRs a la maquinaria endocítica de la célula. Por ejemplo, presentan un motivo LIEF de unión a la subunidad pesada de clatrina y el motivo RXR de unión a la subunidad β_2 -adaptina del complejo AP2, el cual participa en la unión de clatrina, dinamina y EPS-15, y está involucrado en la iniciación de la formación de las vesículas cubiertas de clatrina (Kirchhausen, 1999). Sin embargo, el grado de participación de β -arrestina en este proceso depende del receptor, agonista y tipo celular, reflejando probablemente una variación en los patrones endógenos de expresión de GRK y β -arrestina, en los efectos específicos del agonista sobre la conformación del receptor y la disponibilidad de vías alternativas para la endocitosis del receptor (Luttrell y Lefkowitz, 2002).

El papel de la β -arrestina luego de la endocitosis de los receptores se ha ido conociendo a través del uso de proteínas quimeras de β -arrestinas fusionadas con GFP, lo que permite la visualización del tráfico intracelular de β -arrestina y el receptor en células vivas. Por medio de estos estudios los GPCRs han sido clasificados en dos clases (Oakley y col., 2000), los receptores de clase A, representado por el β_2 adrenérgico, que se unen a β -arrestina 1 con menor afinidad que a β -arrestina 2 y se disocian de β -arrestina una vez internalizados, mientras que los receptores de clase B, representados por el AT₁R, vasopresina 2, neurotensina 1, entre otros, presentan igual afinidad para ambas β -arrestinas. Estos receptores forman complejos estables con las β -arrestinas, los cuales se internalizan como una unidad. La estabilidad de la interacción entre receptor y β -arrestina puede determinar los siguientes acontecimientos del tráfico del receptor. El receptor β_2 adrenérgico es rápidamente desfosforilado y reciclado a la membrana, mientras que el de vasopresina 2, perteneciente a la clase B, se recicla lentamente (Oakley y col., 1999). Al cambiar el carboxilo terminal de estos dos receptores, se observa que el β_2 adrenérgico se

comporta como de clase B y el vasopresina 2 como clase A, por lo que el carboxilo terminal parece determinar la afinidad y estabilidad en la interacción con las β -arrestinas; en específico un conjunto de residuos de serina y treonina que se encuentran en esta región (Oakley y col., 2001).

1.4.2 β -arrestinas como moléculas de señalización

Además de las proteínas G, las β -arrestinas también son consideradas como moléculas efectoras de los GPCRs. Una vez unidas las β -arrestinas al receptor pueden funcionar como moléculas de anclaje que permiten la señalización a diferentes efectores intracelulares. Una de las vías más reconocidas activada por β -arrestinas es la de las MAPK. La activación de ERK1/2 a través de la vía clásica dependiente de proteína G es rápida y transiente, mientras que la vía dependiente de β -arrestinas produce una activación más lenta y sostenida (Kovacs y col., 2009). Las β -arrestinas actúan como proteínas de andamiaje que facilitan la interacción proteína-proteína y mantienen una distribución subcelular correcta de los componentes de las cascadas, lo que asegura la fidelidad de la respuesta a una señal en particular. Las β -arrestinas presentan en su estructura, además de los motivos ya mencionados, otros sitios descritos que le permiten la interacción con las cascadas de MAPK. Por ejemplo, JNK3 y posiblemente otras MAPK interactúan con la β -arrestina 2 a través de una secuencia consenso RRSLHL de reconocimiento a MAPK, localizada en su carboxilo terminal (Luttrell y Lefkowitz, 2002) (Figura 5).

Una gran parte de moléculas de ERK1/2 se dirigen al núcleo luego de su activación (Chen y col., 1992); sin embargo, se ha sugerido que la formación de los complejos entre los componentes de la cascada de ERK y β -arrestina conduce a la retención de ERK1/2 en el citosol; fosforilando de este modo sustratos citosólicos, involucrados probablemente en la regulación de la señalización de los GPCRs y del tráfico intracelular (Luttrell y Lefkowitz, 2002), como por ejemplo β -arrestina 1 cuya fosforilación se considera como una regulación negativa propia de la vía (Lin y col., 1999); GRK2 (Pitcher y col., 1999; Elorza y col., 2000), componentes del citoesqueleto, entre otros. Además, β -arrestina unida a ERK1/2 puede fosforilar

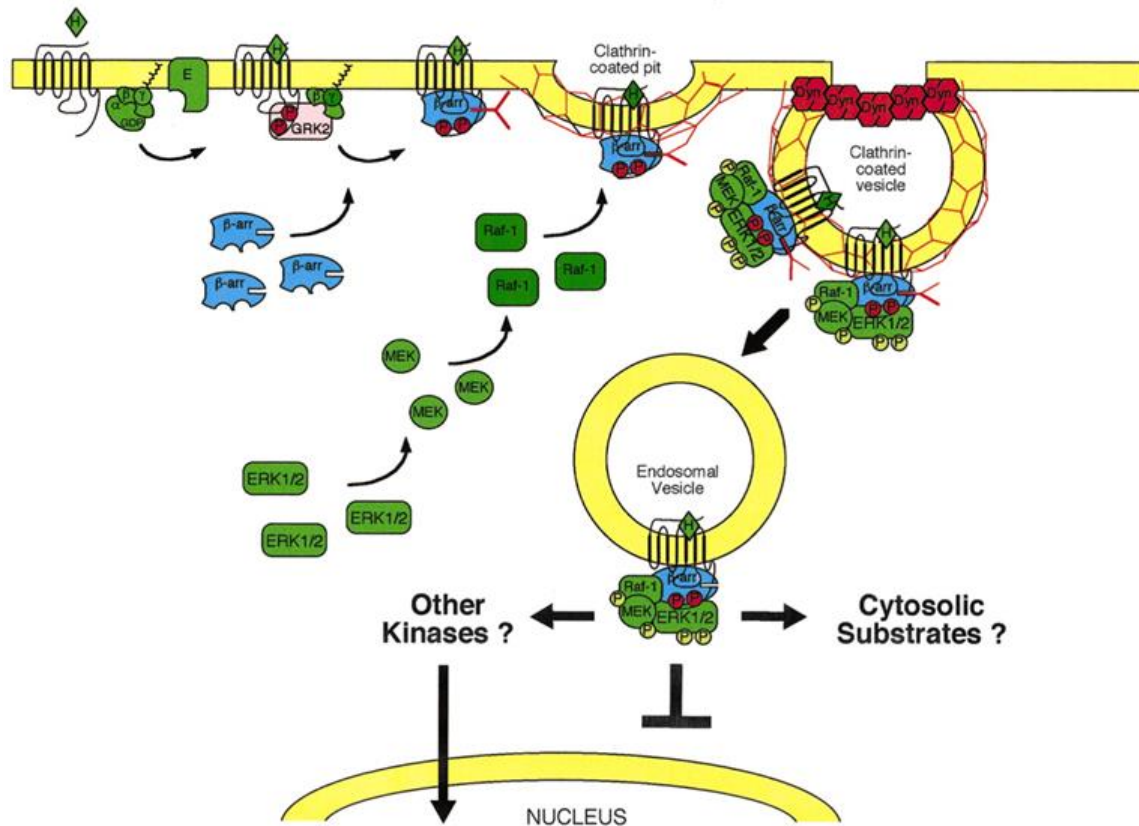


Figura 5. Papel de β -arrestinas en la activación de MAPK. La unión de β -arrestina al receptor conduce a la formación del complejo de activación de MAPK, funcionando β -arrestina como una proteína de andamiaje. La activación de ERK1/2 por β -arrestinas puede favorecer la fosforilación de sustratos citosólicos y de membrana. (Tomado de Luttrell y col. 2002).

proteínas citosólicas involucradas en la regulación transcripcional como p90RSK, que a su vez puede transmitir las señales al núcleo. La activación de ERK1/2 asociada a β -arrestina ha sido descrito para muchos GPCRs incluyendo los receptores β -adrenérgicos, V_2R , el AT_1R , entre otros (DeWire y col., 2007).

2. Antecedentes

2.1 Mecanismos de activación de ERK1/2 en HEK mediados por Ang II

En la actualidad se han descrito múltiples vías de activación para ERK 1/2. Los mecanismos implicados en esta activación dependen, entre otros elementos, del estímulo y del tipo celular y pueden ser dependientes o no de la participación de PKC, β -arrestinas o de mecanismos como la transactivación de otros receptores como el EGFR. Se ha descrito que entre un tipo celular y otro estimulando con el mismo factor la dependencia a ciertas proteínas para la activación de ERK1/2 puede ser muy diferente (Shah y col., 2004). En células HEK-293 se ha observado que la activación de ERK1/2 (medida como la fosforilación de esta proteína en los residuos Thr 202 y Tyr 204) por Ang II es independiente de la transactivación del EGFR, debido a la evidencia de que cuando se estimula con esta hormona no se observa una fosforilación de este receptor y al inhibirlo con el inhibidor específico AG-1478, a distintas concentraciones, tampoco se aprecia una disminución significativa en la activación de ERK1/2 inducida por Ang II (Figura 6).

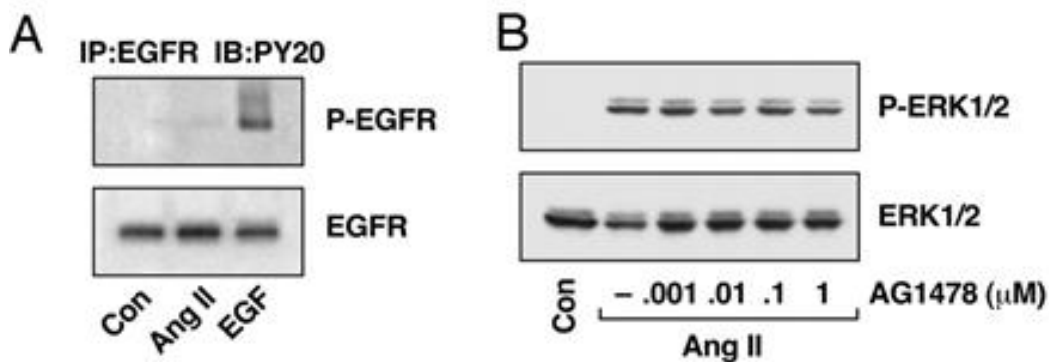


Figura 6. Ausencia de transactivación del EGFR bajo estímulo de Ang II en células HEK-293. (A) El estímulo con EGF, pero no con Ang II promueve la fosforilación del EGFR (B) Se observa que la inhibición de la actividad cinasa de tirosina del EGFR con AG-1478 a diferentes concentraciones no afecta la activación de ERK1/2 por Ang II (Modificado de Shah y col, 2004).

Por otro lado, en el mismo estudio se observó la dependencia a PKC a través del empleo del inhibidor Gö6983 (Figura 7).

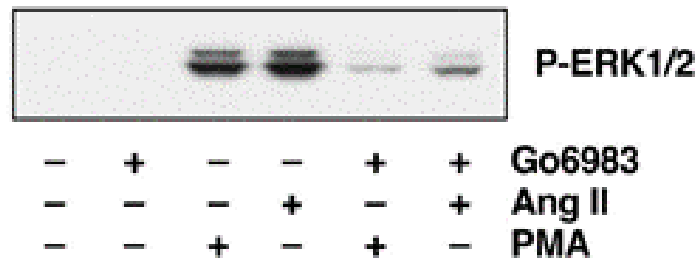


Figura 7. Efecto de la inhibición de PKC en la activación de ERK1/2 por Ang II o PMA en células HEK-293. Se observa como al inhibir las células con Gö6983 disminuye la activación de ERK1/2 mediada tanto por Ang II como por PMA (Modificado de Shah y col, 2004).

La participación de las PKCs en la vía de activación de ERK1/2 ha sido descrita también para otros tipos celulares, por ejemplo en células C9 el estímulo con Ang II causa la activación de la isoforma δ de PKC (García-Caballero y col., 2001; Shah y Catt, 2002), y su efecto en la activación de ERK1/2 queda abolido cuando se reducen los niveles de esta isoforma en las células o por la inhibición selectiva con rottlerin (Figura 8) (Shah y Catt, 2002). Resultados similares también ha sido obtenidos para fibroblastos cardiacos de ratas (Olson y col., 2008).

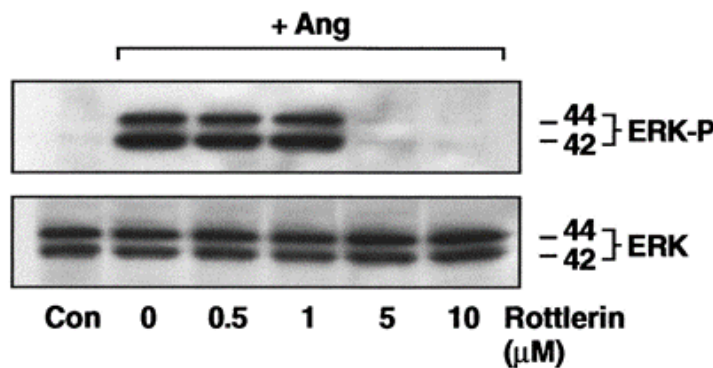


Figura 8. Efecto del inhibidor específico de PKC δ en la activación de ERK1/2 por Ang II. Se muestra la inhibición dependiente de la concentración de rottlerin en la activación de ERK1/2 por Ang II (Modificado de Shah y Catt, 2002).

En las células HEK esta isoforma de PKC se expresa endógenamente (Thomas y Smart, 2005), por lo que podría participar en la activación de ERK1/2.

Otras de las proteínas que han sido involucradas en las vías de activación de ERK 1/2 bajo el estímulo de Ang II en células HEK-293 son las β -arrestinas. En estas células se ha observado la formación de complejos entre el receptor, β -arrestina 2 y ERK una vez estimuladas con Ang II (Luttrell y col., 2001). Usando microscopía confocal inmunofluorescente se puede observar la redistribución subcelular de la β -arrestina y el AT₁R luego del estímulo, localizándose ambas proteínas en vesículas endosomales (Figura 9a). Mediante la misma técnica Luttrell y col., mostraron, además, la colocalización subcelular de ERK y β -arrestina 2 también en vesículas endosomales (Figura 9b), sugiriendo estos resultados que el receptor internalizado unido a β -arrestina 2, puede existir también en complejo con ERK.

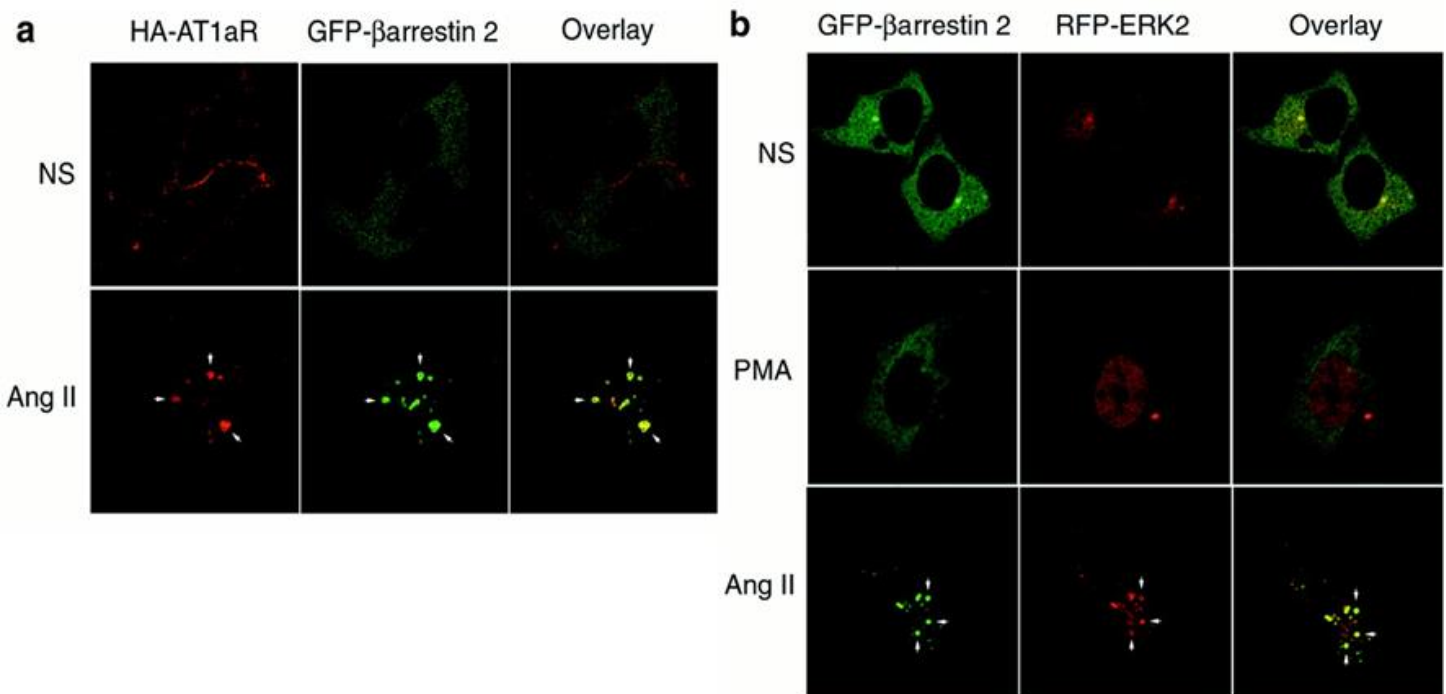


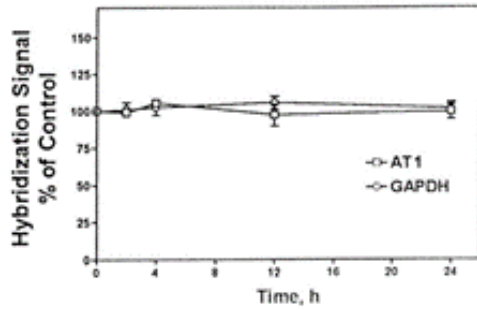
Figura 9. Efecto de Ang II en la distribución celular de AT₁R, β -arrestina 2 y ERK2. (A) Se observa la colocalización del AT₁R y β -arrestina 2 en vesículas luego del estímulo con Ang II (1 μ M, 15 min). (B) Se muestra la colocalización de β -arrestina 2 y ERK en vesículas cuando se estimula con Ang II (1 μ M, 15 min), mientras que cuando se estimula con PMA no se observa este fenómeno. La proteína marcada, así como la colocalización se señala con flechas en los cuadros con estímulo (Modificado de Luttrell y col, 2001).

2.2 Comunicación entre el AT₁R y el IR

La resistencia a la insulina es una condición médica prevalente que acompaña a padecimientos como obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión y otros (Kahn y Flier, 2000; Olefsky y Saltiel, 2000; Pessin y Saltiel, 2000; Reaven, 2004). El mecanismo molecular que vincula la resistencia a la insulina con la hipertensión es todavía desconocido, aunque existen algunos estudios que han hecho avances en este sentido (Natali y Ferrannini, 2004; Wang y col., 2004; Zhou y col., 2014; Soleimani, 2015). En la mayoría de las situaciones de sensibilidad reducida a la insulina, se desencadena una respuesta compensatoria del organismo de hiperinsulinemia, por lo que es posible que, en paralelo a la reducción de las acciones de insulina en las vías metabólicas, la hiperinsulinemia pueda actuar sobre otros blancos en diferentes células y tejidos. Hwang y col. en un estudio con ratas Sprague-Dawley, las cuales no presentan propensión al desarrollo de hipertensión, mostraron que al ser alimentadas con una dieta alta en fructosa durante 3 semanas las ratas desarrollan hipertensión asociada con la aparición también en estas ratas de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Hwang y col., 1987).

Por otro lado, pocos son los estudios que abarcan la posible intercomunicación (*cross-talk*) desde el IR hacia el AT₁R, que sería la capacidad de insulina de modular la actividad de Ang II. Uno de estos estudios es el de Nickenig y col. (Nickenig y col., 1998) en células de músculo liso vascular, en el que muestran que un tratamiento de insulina a 100 nM por 24 horas provoca un aumento en los niveles de ARNm de AT₁R (Figura 10), reflejándose en un incremento en la expresión de receptores en la membrana (Figura 11). Además, encontraron que el aumento de calcio citoplasmático generado por Ang II era de mayor proporción en las células tratadas con insulina (Figura 12).

mRNA levels in Vehicle-treated Cells



mRNA levels in Insulin-treated Cells

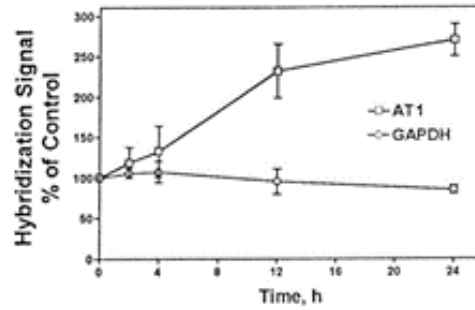


Figura 10. Efecto de insulina en los niveles de ARNm de AT₁R. Curso temporal del ARNm del receptor y de GAPDH (control) en células pre-incubadas o no con 100 nM de insulina donde se muestra que en aquellas células tratadas existe mayor expresión de ARNm específico del AT₁R (Modificado de Nickenig y col, 1998).

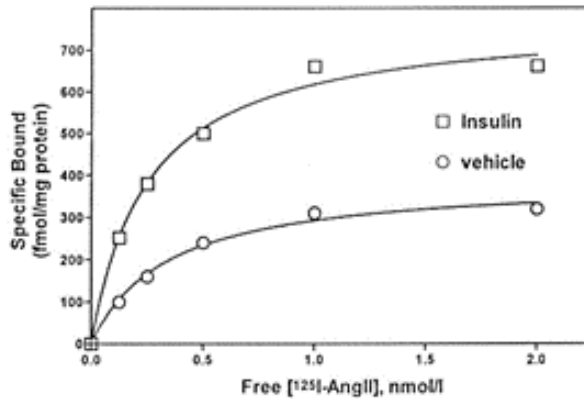


Figura 11. Efecto de insulina en la expresión de AT₁R en la membrana. Ensayo de unión de radioligando específico que muestra un aumento en la cantidad de receptores AT₁ en la membrana en aquellas células pre-incubadas con insulina 100 nM (Modificado de Nickenig y col, 1998).

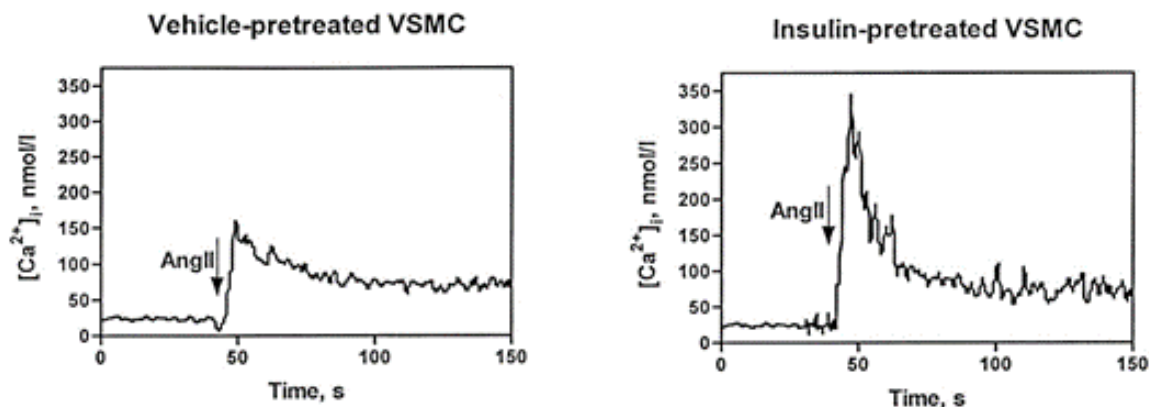


Figura 12. Efecto de insulina en la elevación de la [Ca²⁺]_i citosólico generada por Ang II. Curso temporal donde se observa una mayor elevación de la [Ca²⁺]_i en citoplasma en respuesta a Ang II en aquellas células incubadas con insulina 100 nM por 24 horas (Modificado de Nickenig y col, 1998).

Uno de los antecedentes más cercano a este proyecto son los resultados obtenidos por la MSc. Luisa Jiménez (Figura 13) en células HEK-19. Los datos muestran que en aquellas células que fueron pre-incubadas con insulina 100 nM existe una disminución en la activación de ERK1/2 mediada por Ang II.

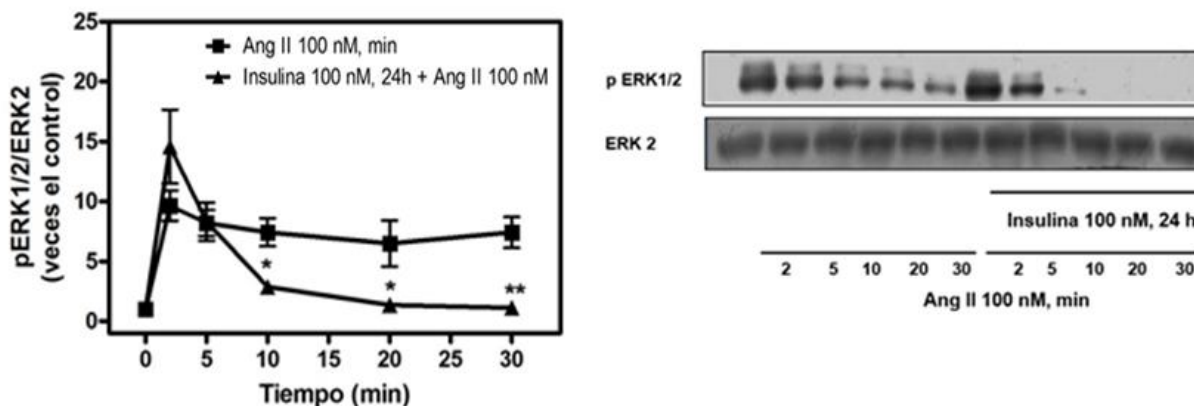


Figura 13. Efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II en células HEK-19. Curso temporal de la fosforilación de ERK1/2 por Ang II 100 nM en células pre-incubadas o no con 100 nM de insulina por 24 horas, donde se muestra que en las células incubadas la activación de ERK1/2 por Ang II es menor (Datos obtenidos por MSc. Luisa Jiménez).

3. Justificación

El sistema renina-angiotensina participa en la regulación de la presión arterial; a su vez, la resistencia a la insulina, así como la respuesta compensatoria del organismo de hiperinsulinemia se ha asociado al desarrollo de hipertensión, por lo que insulina podría regular vías asociadas a Ang II, hormona efectora de este sistema.

Estudios en células HEK-19 muestran que el estímulo con insulina promueve una disminución en la activación de ERK1/2 inducida por Ang II. La activación de esta vía por Ang II parece ser dependiente de la participación de PKCs y β -arrestinas. Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos moleculares por los que la insulina regula la activación de ERK1/2 inducida por Ang II.

4. Hipótesis

Insulina inhibe la activación de ERK1/2 en respuesta a Ang II en células HEK-19, a través de mecanismos que implican la modulación de la expresión de proteínas como PKCs y β -arrestinas.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar el efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II y en las proteínas relacionadas con este evento en células HEK-19.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la insulina en la activación de ERK1/2 (fosforilación de ERK1/2 en Thr202/Tyr204) por Ang II mediante Western Blot, a través de la realización de experimentos de concentración respuesta y cursos temporales.
2. Evaluar la expresión de PKC δ durante un curso temporal de insulina 100 nM mediante Western Blot.
3. Evaluar la expresión de las isoformas 1 y 2 de β -arrestina durante cursos temporales de insulina 100 nM mediante Western Blot.

7. Materiales y Métodos

7.1 HEK-19

Se utilizaron células HEK-293 establemente transfectadas con el AT₁R acoplado a la proteína verde fluorescente (GFP). Estas células se llamarán a lo largo del trabajo como HEK-19 y fueron descritas en el 2002 en el trabajo de Hunyady y colaboradores: *Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor* (Hunyady y col., 2002). En este estudio demuestran la funcionalidad de este receptor fusionado con la GFP, a partir de la obtención de una señal de Ca²⁺ citoplasmático característica del estímulo con Ang II en células cargadas con Fura-2 y la medición de la formación de inosítoles fosforilados, ambas respuestas similares a las obtenidas con el AT₁R nativo (Figura 14a y b). También muestran que el AT₁R-GFP se fosforila con el mismo patrón que el AT₁R nativo (Figura 14c); además la internalización y el tráfico intracelular del receptor no se ve afectado por el acople a la proteína GFP. En este trabajo los autores concluyen que el AT₁R-GFP conserva las mismas propiedades funcionales del AT₁R nativo por lo que puede usarse para el estudio de sus vías y mecanismos de señalización.

Las células HEK-19 se cultivaron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) a 37 °C y 5% de CO₂ hasta alcanzar un 80% de confluencia. La selección de las células que expresan el receptor se mantuvo con geneticina (G418) (*Santa Cruz Biotechnology No. Cat. sc-29065*) a una concentración de 250 µg/mL durante todo el cultivo y la realización de los experimentos.

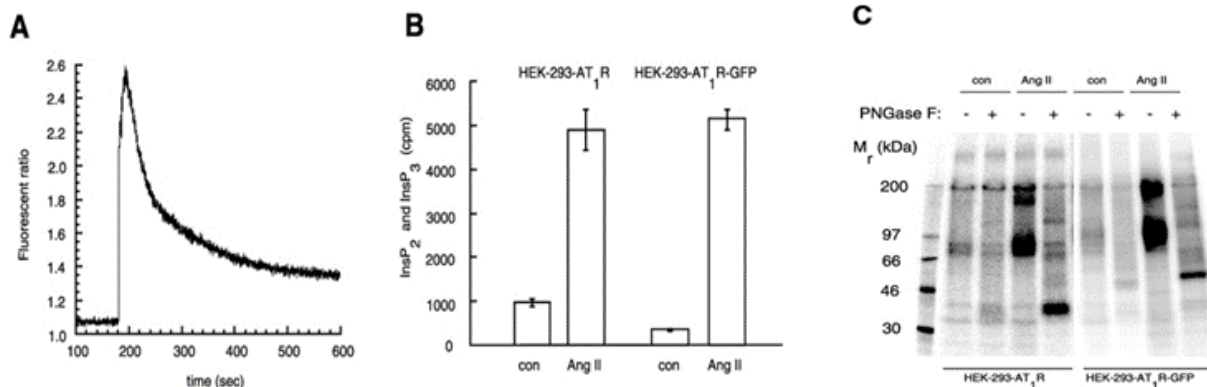


Figura 14. Caracterización funcional del AT₁R-GFP expresado en células HEK-293. (A) Se observa la señal de Ca²⁺ citosólico característico del estímulo con Ang II 100 nM. (B) Se muestra la producción similar de fosfato de inosítoles en células HEK-293 transfectadas con AT₁R o con AT₁R-GFP en respuesta a Ang II 100 nM. (C) Presencia de fosforilación en el AT₁R inducida por Ang II 100 nM y cambio en su patrón de bandas luego de la desglucosilación por glicosidasa F migrando hacia el peso característico del AT₁R o AT₁R-GFP. (Tomado de Hunyday y col, 2002).

7.2 Procedimiento experimental

Las células HEK-19 fueron sembradas en cajas de 6 y 12 pozos a una confluencia de 70-80%. Las cajas fueron tratadas previamente con poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich No. Cat. 25988-63-0*) al 0.001% (v/v). Al siguiente día se les retiró el suero a las células 6 horas antes del tratamiento con los agentes seleccionados. Luego de finalizado los estímulos el medio se retiró y las células se lavaron con 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) frío para detener la reacción y se lisaron con 80 ó 100 µL de buffer Laemmli (*SDS-protein gel loading solution 2X Quality Biological, INC β-mercaptoetanol y agua*).

Experimentos de concentración-respuesta:

- En cajas de 6 pozos se evaluó la respuesta a Ang II (*human bachem No. Cat. H-1705*) por 5 minutos a 0, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸ y 10⁻⁷ M tratados o no previamente con 100 nM de insulina por 24 horas. En estos experimentos se detectó la fosforilación de ERK1/2 en Thr202 y Tyr 204.

Experimentos de cursos temporales:

- Las células fueron tratadas con Ang II 100 nM por diferentes tiempos (0, 2, 5, 10, 20 y 30 min) en cajas de 12 pozos, donde 6 pozos fueron tratados previamente con insulina 100 nM por 24 horas y el resto no. En estos experimentos se detectó la fosforilación ERK1/2 en Thr202 y Tyr 204.
- Las células fueron tratadas con Ang II 100 nM por diferentes tiempos (0, 2, 5, 10, 20 y 30 min), en cajas de 12 pozos, donde 6 pozos fueron mantenidos bajo selección con G418 250 µg/mL y el resto no. En estos experimentos se detectó la fosforilación ERK1/2 en Thr202 y Tyr 204.
- Las células fueron tratadas con insulina 100 nM por diferentes tiempos (0, 2, 4, 8, 12, y 24 horas) en cajas de 6 pozos, para detectar los niveles de expresión de proteínas como β-arrestina 1, β-arrestina 2, ERK y PKC δ.

7.3 Western-Blot

Una vez finalizado el experimento las muestras se sonicaron dando pulsos de 40 kHz durante 20 segundos (*Sonios Vibra Cell, Ultrasonic Processor*) y calentadas durante 5 min a 99 °C en agitación de 950 rpm (*Thermomixer Comfort Eppendorf*); después se centrifugaron a 14500 rpm por 5 minutos (*MiniSpinPLUS Eppendorf*). El sobrenadante resultante se cargó en geles SDS-PAGE al 10% para separar las proteínas por electroforesis; junto a las muestras se cargó 0.45 µL de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, No. Cat. 161-0374*) para corroborar que la proteína detectada se encontrara en el peso correspondiente. Entre los electrodos se aplicó un voltaje inicial de 80V, mientras las muestras se apilaban en el gel concentrador durante 20 minutos, y de 120V durante la migración de la muestra por la zona de separación-resolución. Cuando el frente de corrida de la electroforesis (marcado por el compuesto azul de bromofenol) quedó al borde inferior del gel, se dio por finalizada la electroforesis. Posteriormente se realizó una transferencia semi-seca (*Trans Blot SD, Transfer Cell, BIORAD*) a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) durante 1 hora a 15V en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3), luego estas membranas fueron

bloqueadas con leche (*Santa Cruz Biotechnology blotto, non-fat dry milk, No. Cat. sc-2325*) al 5% en TBST (Tris base 20 mM, NaCl 137mM y Tween 20 al 0.1%, pH 7.5) durante 1 hora para prevenir las uniones inespecíficas. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios (Tabla 1) y al siguiente día lavadas tres veces con TBST al 0.1% durante 10 minutos cada uno antes de incubarla a temperatura ambiente por 1 hora con los anticuerpos secundarios (Tabla 1) conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP). Luego de esta incubación, las membranas se lavaron del mismo modo anterior para eliminar en ambos casos el exceso de anticuerpo. Las membranas fueron reveladas con un kit de quimioluminiscencia ECL (*Enhanced Chemiluminescence Reagent, Asmesham Biosciences*) y las bandas de las proteínas quedan grabadas en placas radiográficas.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el proyecto.

Anticuerpo 1 ^{rio} *	Concen-tración	Compañía	No. Cat.	Anticuerpo 2 ^{rio} **	Concen-tración	Compañía	No. Cat.
pERK (Thr202/Tyr204)	1: 15000	Cell Signaling	910155	rabbit	1: 7000	Santa Cruz Biotechnology	sc-2003
ERK2	1: 15000	Santa Cruz Biotechnology	sc-154		1: 18000		
PKC δ	1: 6000	Santa Cruz Biotechnology	sc-937		1: 6000		
β -arrestina 2	1:6000	Novus Biologicals	NB300-587		1:6000		
β -tubulina	1: 8000	Invitrogen	322600	mouse	1: 8000		sc-2004
β -arrestina 1	1: 3000	BD Biosciences Pharmigen	610550		1: 5000		
actina	1: 6000	Donado***			1: 6000		

* Todos los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C.

** La incubación del anticuerpo secundario se realizó por 1 hora a temperatura ambiente.

*** El anticuerpo actina fue proporcionado por el Dr. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

7.4 Análisis estadístico de los resultados

Los autoradiogramas fueron escaneados y cuantificados usando el programa ImageJ 1.50i (*National Institute of Health Imaging Software*). Los valores obtenidos de la integración de las curvas fueron utilizados para hacer las gráficas en el programa GraphPad Prism versión 6.0.

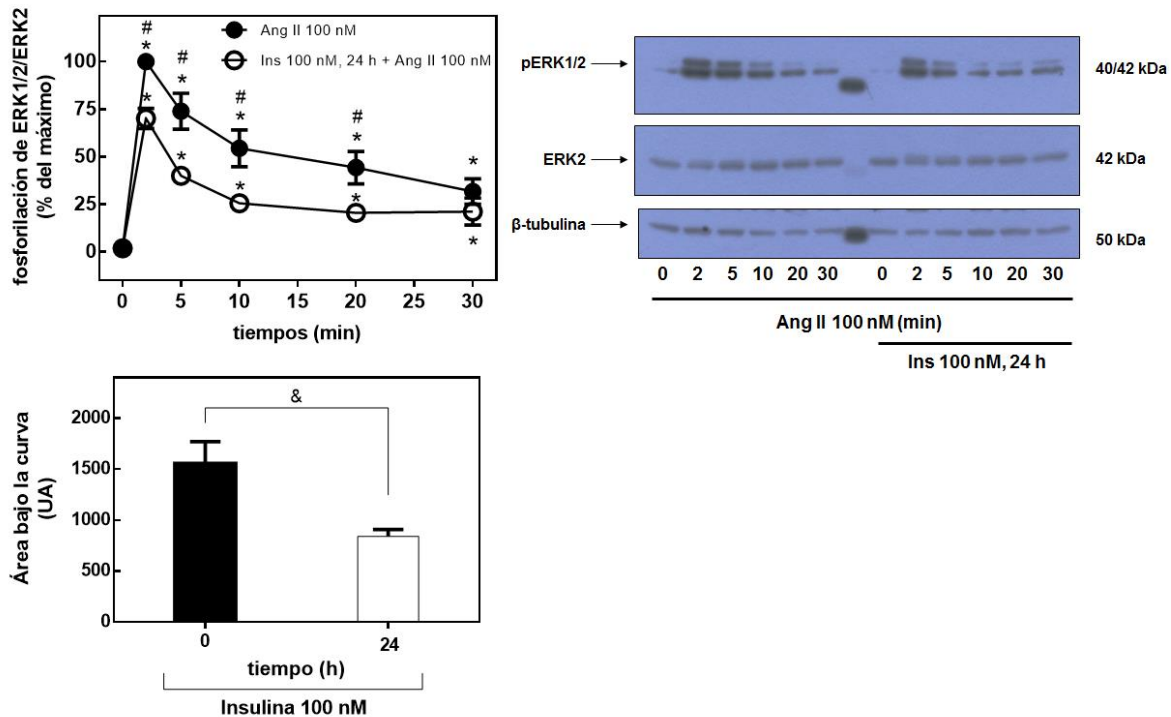
Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para los cursos temporales y concentración-respuesta, seguido de un post-análisis de Dunnet; para detectar diferencias entre distintos grupos de tratamiento (células con/sin insulina 100 nM o G418 250 μ g/mL por 24 horas) se realizó un ANOVA de dos vías seguido por un test de Bonferroni. En otros resultados se utilizó el t de Student cuando solo se comparaba dos grupos de resultados.

Para todos los análisis el nivel de significancia estadística escogido fue de $p < 0.05$.

8. Resultados

8.1 El pretratamiento con insulina inhibe la activación de ERK1/2 inducida por Ang II

El AT₁R así como la gran mayoría de los GPCRs pueden activar vías mitogénicas, y en particular la vía de ERK1/2, una de las MAPK más conocidas con efectos proliferativos y de diferenciación. En la actualidad existen varios mecanismos descritos que conducen a dicha activación, como por ejemplo aquellos que vinculan a Src, a las β-arrestinas, Pyk2 y PKC. Con el objetivo de evaluar el efecto de insulina en la señalización mediada por Ang II hacia la activación de ERK1/2 se realizaron experimentos de curso-temporal donde se evaluó la fosforilación de ERK1/2 bajo estímulos de Ang II 100 nM a diferentes tiempos y en paralelo, se realizó el mismo procedimiento, pero con células previamente incubadas con insulina 100 nM por 24 horas. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos. En ambos grupos de células hubo una activación significativa de ERK1/2 (medida como la fosforilación en los residuos Thr 202 y Tyr 204) en todos los tiempos de estímulo. Sin embargo, la activación de esta vía en aquellas células tratadas con insulina fue significativamente menor en los tiempos de 2, 5, 10 y 20 minutos, como puede observarse en la gráfica del curso temporal y el blot representativo mostrados en la figura. Por ejemplo, a los 5 min de estímulo las células controles tuvieron una activación de ERK1/2 del 73.94 ± 9.44 % con respecto al máximo de activación definido como la activación en ERK1/2 obtenida a los 2 min de Ang II; mientras que aquellas células incubadas por 24 horas con insulina presentaron solo una activación del 40.05 ± 1.05 % en comparación también con el máximo. En la gráfica del área bajo la curva se observa como existe una disminución del área de un 47 % en aquella curva correspondiente a las células incubadas con insulina, mostrando de manera global la disminución en la activación de ERK1/2 a lo largo de todo el curso temporal evaluado.



Otra manera en que se estudió el efecto de insulina en esta vía mediada por Ang II, fue a través de la realización de experimentos de concentración-respuesta. Se utilizó estímulos de 5 minutos de Ang II y se evaluaron concentraciones de Ang II de 0, 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M en células tratadas o no previamente con insulina 100 nM por 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16. Para las células no tratadas se observa que desde concentraciones de 1 nM de Ang II hubo una activación significativa de ERK1/2 correspondiente a un 62.24 ± 6.58 % del máximo de activación, mientras que para aquellas tratadas solo se activó bajo la concentración de 100 nM un 63.70 ± 5.91 %, concentración donde las células no tratadas alcanzaron el

máximo de activación (descrito como el 100 %). El EC_{50} para las curvas de ajuste obtenidas fue de 0.61 nM y 11.9 nM para las células controles e incubadas con insulina, respectivamente, mostrándose también diferencias en este parámetro que reflejan que para aquellas células incubadas con insulina es necesario una mayor cantidad de ligando para alcanzar la máxima respuesta.

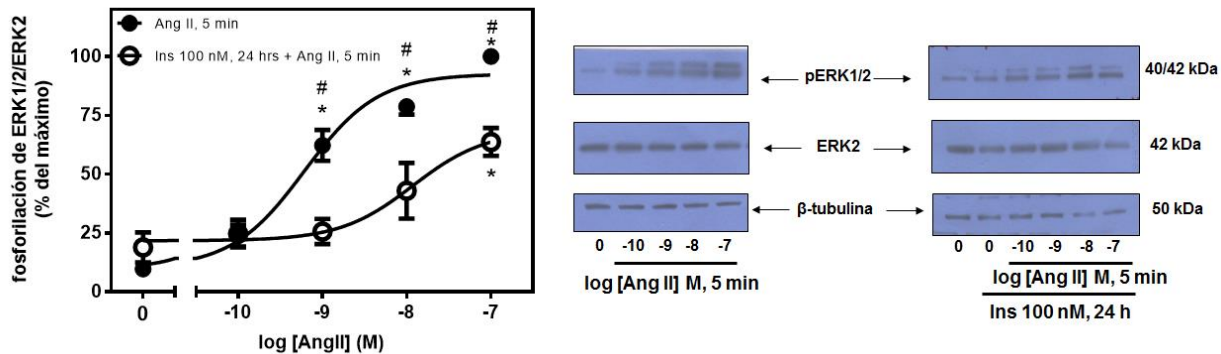


Figura 16 Curvas de concentración-respuesta de la activación de ERK1/2 bajo estímulos de Ang II 5 minutos. Se estimularon células HEK-19 incubadas o no previamente con insulina 100 nM por 24 horas con distintas concentraciones de Ang II por 5 minutos y se evaluó la activación de ERK1/2 (fosforilación en los residuos Thr202 y Tyr 204). Las gráficas muestran los resultados de 3 experimentos independientes como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. 0 M de Ang II (ANOVA de una vía); # $p < 0.05$ vs. cada concentración del grupo control (ANOVA de dos vías). Círculos rellenos: células controles; círculos vacíos: células tratadas con insulina 100 nM por 24 horas.

8.2 La ausencia de selección no afecta la respuesta a Ang II

Como caracterización de nuestro modelo experimental decidimos evaluar el efecto de mantener las células HEK-19 sin selección de antibiótico durante un curso temporal de Ang II 100 nM, donde un grupo de células estarían durante 30 horas en ausencia del antibiótico G418 el cual garantiza la selección de aquellas células que expresan el receptor AT_1 puesto que el vector de expresión le brinda resistencia a este antibiótico. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17, donde se aprecia que este tratamiento no afecta la activación de ERK1/2 por el estímulo de Ang II 100 nM, obteniéndose en ambas curvas una activación significativa de ERK1/2 a tiempos de 2, 5 y 10 minutos.

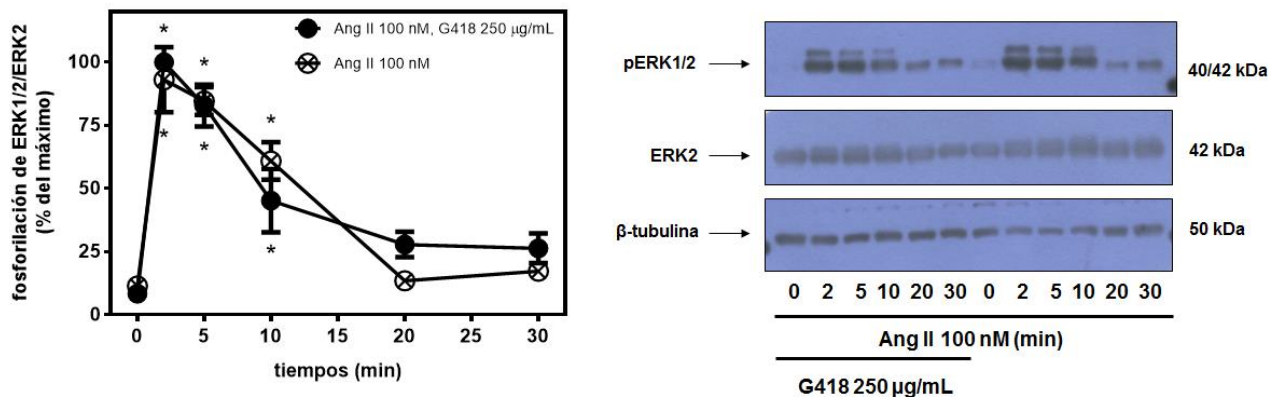


Figura 17. Efecto en la activación de ERK1/2 de la ausencia del antibiótico de selección G418. Se estimularon células HEK-19 cultivadas o no en presencia de 250 µg/mL de G418 con Ang II 100 nM por distintos tiempos y se evaluó la activación de ERK1/2 (fosforilación en los residuos Thr202 y Tyr 204). Las gráficas muestran los resultados de 3 experimentos independientes como la media ± SEM. * p < 0.05 vs. 0 M de Ang II (ANOVA de una vía). Círculos rellenos: células controles; círculos con cruz: células en ausencia de G418.

8.3 Insulina no afecta la fosforilación basal ni el nivel de expresión de ERK1/2

A partir de las diferencias obtenidas en la activación de ERK1/2 entre ambos grupos de células, decidimos evaluar si estas diferencias se debían a cambios en el estado de fosforilación basal de esta proteína o a que existiera distintos niveles de expresión de ERK1/2 entre la condición control y la de insulina 100 nM por 24 horas. En la figura 18 se observan los resultados obtenidos luego de la cuantificación de ERK1/2 fosforilada y ERK2 en ambas condiciones. Como puede apreciarse los estados basales de estas proteínas no se afectan bajo la incubación con insulina 100 nM por 24 horas, por lo que no podemos indicar que sea este factor el que determine las diferencias en la activación de ERK1/2 mostradas en las figuras 15 y 16.

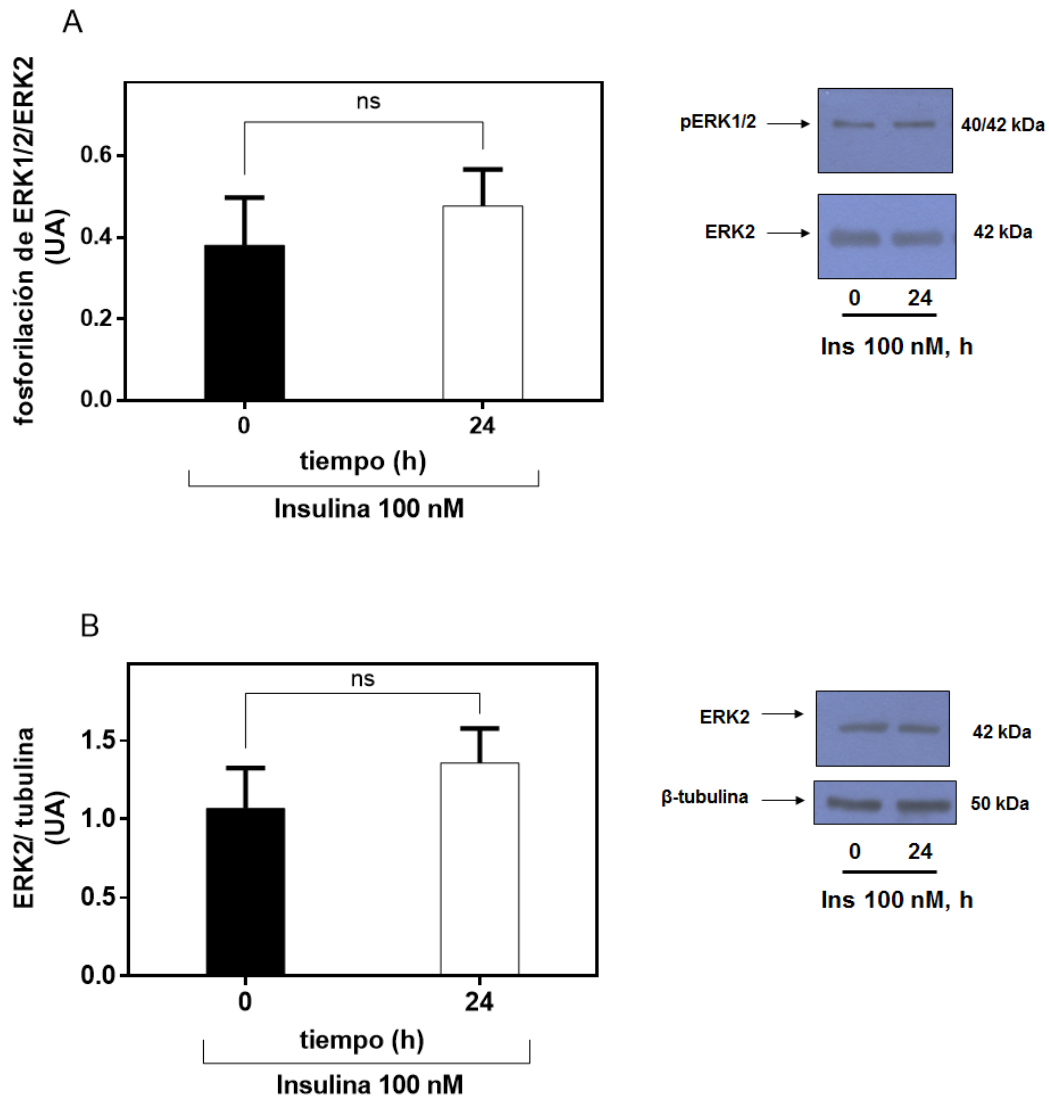


Figura 18. Comparación de los niveles basales de pERK1/2 y ERK2 entre la condición control y la incubada con insulina 100 nM por 24 horas. (A) Niveles basales de pERK1/2. (B) Niveles basales de ERK2. Las gráficas muestran los resultados de 6 experimentos independientes como la media \pm SEM. ns, no significativo vs. 0 h de insulina 100 nM (t-Student).

8.4 Insulina no afecta los niveles de expresión de PKC δ

Las PKCs han sido descritas como proteínas importantes en el mecanismo de activación de ERK1/2 a partir del estímulo del AT₁R (Shah y col., 2004; Hunyady y Catt, 2006; Goldsmith y Dhanasekaran, 2007) participando de manera directa en la activación de c-Raf. Por esta razón quisimos evaluar si insulina podría conducir a

cambios en los niveles de expresión de esta proteína, en particular de la isoforma δ , una PKC nueva que se expresa en nuestro modelo endógenamente y que para otros tipos celulares se ha descrito que participa en la activación de ERK1/2 (Shah y Catt, 2002; Olson y col., 2008), por lo que decidimos que era un buen candidato a analizar en primer lugar. Para esto realizamos cursos temporales de insulina 100 nM a tiempos de 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas y evaluamos por Western Blot la expresión de la PKC δ . En la figura 19 se muestran los resultados, donde se observa que ningún tiempo de estímulo con insulina provocó cambios significativos en la expresión de esta PKC.

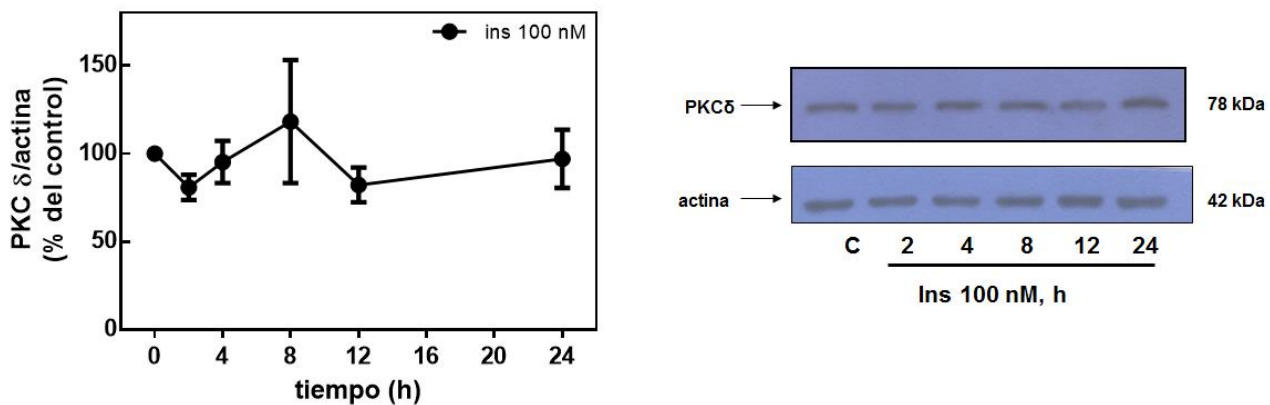


Figura 19 Niveles de expresión de PKC δ a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM. Se realizó un curso temporal de insulina 100 nM en células HEK-19 y se evaluó la proteína PKC δ normalizada en función de la proteína actina, utilizada frecuentemente como control de carga. Se muestra la gráfica de 3 experimentos independientes como la media \pm SEM y un blot representativo.

8.5 Efecto de la insulina en la expresión de las β -arrestinas

Otro de los mecanismos descritos en la activación de ERK1/2 a través del receptor AT₁ es el que involucra la participación de β -arrestinas como proteínas de andamiaje que permiten el reclutamiento de varias proteínas de la cascada de ERK1/2 y consecuentemente la activación de esta MAPK (Luttrell y col., 2001; DeWire y col., 2008), por esta razón decidimos evaluar el efecto de insulina en la expresión de las β -arrestinas.

8.5.1 Insulina no afecta los niveles de expresión de β -arrestina 2

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos para la proteína β -arrestina 2 en un curso temporal de insulina 100 nM a tiempos de 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Como puede observarse la incubación con insulina 100 nM a los tiempos evaluados no afectó la expresión de β -arrestina 2 evaluada a través de Western Blot.

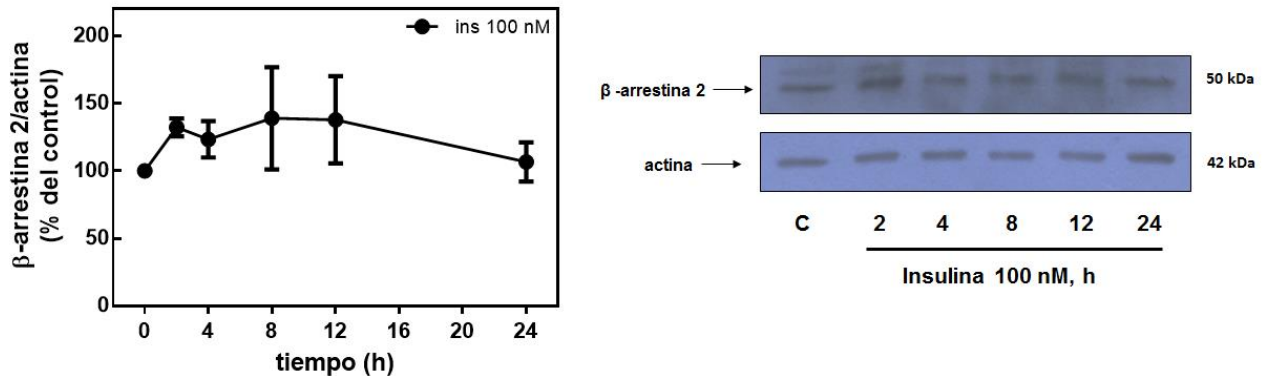


Figura 20. Niveles de expresión de β -arrestina 2 a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM. Se realizó un curso temporal de insulina 100 nM en células HEK-19 y se evaluó la proteína β -arrestina 2 normalizada en función de la proteína actina, utilizada frecuentemente como control de carga. Se muestra el curso temporal de 3 experimentos independientes como la media \pm SEM y un blot representativo.

8.5.2 Insulina disminuye los niveles de expresión de β -arrestina 1

Al evaluar bajo las mismas condiciones experimentales mencionadas anteriormente para β -arrestina 2 los niveles de la isoforma 1 se obtuvieron resultados totalmente distintos, los cuales se muestran en la figura 21. Se puede observar una disminución de la cantidad proteica dependiente del tiempo de incubación con insulina, haciéndose significativa a las 24 horas, donde existe una disminución del 56.19 ± 12.88 % en los niveles de β -arrestina 1 comparados con el control (0 h de insulina, 100 %). Es importante destacar que este corresponde al tiempo de insulina 100 nM utilizado en los experimentos donde se obtuvo una disminución en la activación de ERK1/2 por Ang II. Por otro lado, como se puede observar a las 12 horas de incubación con insulina ya se muestra gran reducción de la expresión de β -arrestina 1, sin embargo, no es significativo en este análisis. Por lo que decidimos analizar por

separado solo los datos de 0, 12 y 24 horas de insulina, obteniendo la gráfica que se muestra en la figura 19b, donde en este caso se muestra que la reducción de β -arrestina 1 a las 12 horas ya es estadísticamente significativa. Esta reducción es de aproximadamente un 24.64 ± 4.77 % en comparación con el control.

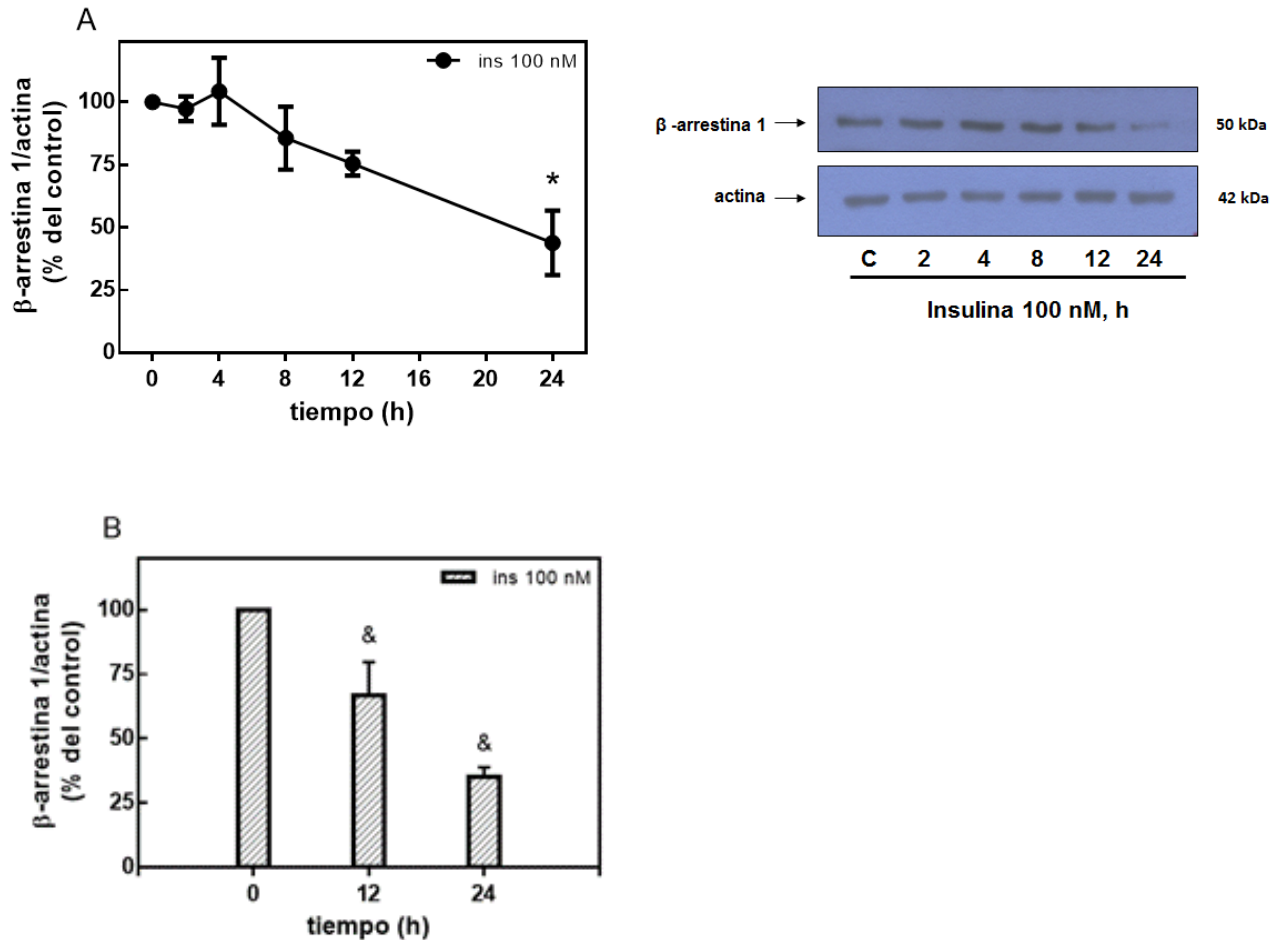


Figura 21. Niveles de expresión de β -arrestina 1 a distintos tiempos de incubación con insulina 100 nM. Se realizó un curso temporal de insulina 100 nM en células HEK-19 y se evaluó la proteína β -arrestina 1 normalizada en función de la proteína actina, utilizada frecuentemente como control de carga. (A) Se muestra el curso temporal y un blot representativo. (B) Datos de β -arrestina 1 de 0, 12 y 24 horas de insulina 100 nM. Las gráficas muestran los resultados de 3 experimentos independientes como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs 0 h de insulina 100 nM (ANOVA de una vía); & $p < 0.05$ vs 0 h de insulina 100 nM (t-Student).

5. Discusión

La transmisión de las señales externas desde la superficie celular al medio interno ocurre mediante complejas vías de señalización que implican la participación de receptores de membranas y proteínas río abajo. Estas vías están altamente reguladas a través de diversos mecanismos que pueden incluir modificaciones químicas, cambios en la localización subcelular de los componentes de la cascada e interacción de los mismos con otras proteínas. Alteraciones en estas vías, así como en sus mecanismos regulatorios pueden conducir a la aparición de varias enfermedades; por lo que el estudio de los mecanismos de señalización y su regulación tiene importantes implicaciones clínicas y terapéuticas en el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de patologías relacionadas.

Los GPCRs y RTKs son receptores transmembranales que inician sus vías principales de señalización en respuesta a un diverso grupo de ligandos. Estudios recientes muestran varios tipos de intercomunicación entre las vías de los GPCRs y los RTKs. Algunos GPCRs que han sido reportados que pueden ser regulados por los RTKs son los receptores de endotelina (Cazaubon y col., 1994), trombina (Chen y col., 1996), α_1 (Medina y col., 2000), β_2 -adrenérgico (Baltensperger y col., 1996; Karoor y Malbon, 1996) y angiotensina (Yin y col., 2003). La Ang II constituye el principal péptido bioactivo del RAS y sus principales efectos son mediados por el receptor AT_1 . Además del papel fisiológico de esta hormona en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular a través de la regulación del tono vascular, el balance de electrolitos y el sistema nervioso simpático (Hunyady y Catt, 2006), también ha sido implicada en varias enfermedades cardiovasculares, como hipertensión, aterosclerosis, restenosis después de una angioplastia e insuficiencia cardíaca (Carey y Siragy, 2003; Higuchi y col., 2007).

En la actualidad existen diversos estudios que apuntan hacia la asociación entre algunos de estos padecimientos y la resistencia a la insulina (Lind y col., 1995; Reaven y col., 1996; Olivares-Reyes y col., 2009), por ejemplo se ha demostrado que individuos hipertensos son más propensos a desarrollar diabetes (Gress y col., 2000).

Por esta razón varias investigaciones han intentado elucidar el mecanismo molecular que vincula estas dos enfermedades, a través del estudio de las vías de señalización entre el IR y el AT₁R, receptores responsables de los principales efectos fisiológicos de estas dos hormonas. Sin embargo, la mayoría han sido dirigidos a evaluar la regulación en dirección AT₁R-IR. En estos estudios se ha demostrado que la Ang II ejerce un efecto inhibitorio en las vías de señalización de insulina provocando una desensibilización del sistema. Por ejemplo, Ang II impide la fosforilación en tirosina de IR y la asociación entre IRS y la proteína PI3K a través de mecanismos que favorecen la fosforilación en residuos de Ser de IR, IRS y la subunidad p85 de PI3K (Folli y col., 1997), además favorece la degradación proteosomal de IRS (Taniyama y col., 2005), otras cinasas como PKC parecen también interferir con la señalización de insulina a través de Ang II (Motley y col., 2003). Debido a esto, los agentes que inhiben las acciones de Ang II son ampliamente empleados en la actualidad no solo para reducir la presión arterial sino para mejorar la sensibilidad a insulina en pacientes hipertensos y con resistencia a insulina (Jandeleit-Dahm y col., 2005; Ando y Fujita, 2006; Boucek, 2006).

En el presente trabajo, basados en antecedentes del laboratorio se evaluó los efectos de insulina en la señalización de Ang II en células HEK-19, un sistema de expresión exógena del receptor AT₁, específicamente a nivel de la activación de ERK1/2. Como se ha descrito la activación del AT₁R por Ang II conduce a la formación, a través de la acción de la PLC, de segundos mensajeros tales como IP₃ y DAG. El IP₃ al unirse a su receptor en el retículo endoplásmico promueve la liberación de Ca²⁺ hacia el citoplasma. Este aumento en Ca²⁺ citosólico y la formación de DAG conduce a la activación de PKCs clásicas y nuevas, que pueden fosforilar directamente a componentes de la cascada de activación de ERK1/2, tal como la proteína Raf (Shah y Catt, 2002), conduciendo a la activación de esta MAPK. Otro mecanismo descrito para este receptor de activación de ERK1/2 es aquel dependiente de β-arrestinas como proteínas de andamiaje (Luttrell y col., 2001).

Los resultados obtenidos muestran que la incubación previa de estas células con insulina 100 nM por 24 horas desencadenan una activación significativamente menor

de ERK1/2 en respuesta a Ang II 100 nM cuando se compara con células controles que no fueron expuestas a esta incubación (Figura 15). Estos datos confirman aquellos obtenidos por la MsC. Luisa Jiménez, donde también observa una disminución en la activación de ERK1/2 (Figura 13). Además, este mismo efecto también se ha evidenciado para otros GPCRs como el β 2-adrenérgico y el receptor para LPA, así como para el IGFR, un receptor de tipo RTK (Dalle y col., 2002).

Por otro lado, antecedentes de este trabajo donde analizan otras respuestas a Ang II muestran un efecto estimulante de insulina en la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico generada por el estímulo con Ang II (Nickenig y col., 1998). Por lo que interesantemente insulina pudiese tener un efecto dual en las vías de señalización de Ang II, es decir, tanto inhibidor como activador según sea la vía que se analice.

En nuestros resultados se observa en la curva control una activación rápida de ERK1/2 característica de la respuesta dependiente de proteína G del AT₁R, y además se observa que esta activación se mantiene con un nivel del 50 % aproximadamente hasta los 20 minutos de estimulación con Ang II, correspondiente a eventos de activación más tardíos como la señalización mediada por β -arrestinas (Ahn y col., 2004). Es importante mencionar que las características temporales de la activación de ERK1/2 en nuestro modelo de estudio son similares a las obtenidas en otras células con expresión endógena del receptor (Kim y col., 2009).

Sin embargo, en las células tratadas se observa para todos los tiempos una activación menor, además la fase sostenida de activación de ERK1/2 es de prácticamente solo un 25 %. Por lo que al obtener esta afectación durante todo el curso temporal se decidió evaluar algunas proteínas descritas en la activación de ERK1/2 que pudiesen estar afectadas por el tratamiento con insulina 100 nM por 24 horas, tomando en cuenta que se ha descrito que la insulina puede regular distintas vías de señalización alterando la síntesis, estabilidad o traducción de ARN mensajeros específicos de proteínas o provocando modificaciones a proteínas preexistentes (Suwanichkul y col., 1994; O'Brien y Granner, 1996; Kim y col., 1998; O'Brien y col., 2001).

Los análisis posteriores a los resultados obtenidos muestran que esta disminución no se debe a que insulina esté provocando cambios en los estados basales de fosforilación de esta proteína o a cambios en la expresión de ERK1/2 (Figura 18).

También evaluamos si la incubación con insulina 100 nM por 24 horas afectaba la expresión de la PKC δ , una PKC nueva descrita en otros modelos como crucial en la activación de esta vía (Shah y Catt, 2002; Olson y col., 2008). Los resultados obtenidos (Figura 19) muestran que el tratamiento a diferentes tiempos con insulina incluido el de 24 horas no modificó significativamente los niveles basales de PKC δ . Un estudio de Ishizuka y col., señala que el tratamiento con insulina, incluso por tiempos más cortos modula la expresión de varias isoformas de PKCs, aumentando la cantidad de ARNm de las isoformas: α , γ , ϵ y ζ y disminuyendo la β ; en este estudio no evaluaron la isoforma δ , pero contrario a nuestro trabajo sí obtuvieron cambios en la expresión de las PKCs evaluadas (Ishizuka y col., 1996). A partir de nuestro resultado podemos decir que el efecto observado de insulina sobre la activación de ERK1/2 mediada por Ang II no se debe a la modulación de la expresión de PKC δ . Sin embargo, si bien no afecta su expresión sí podría estar modulando el proceso de activación de esta PKC o su translocación a la membrana, por lo que sería interesante evaluar este evento en futuros estudios, además de establecer la dependencia o no en la activación de ERK1/2 por Ang II mediante el empleo de inhibidores o siRNAs específicos para esta isoforma de PKC.

Por otro lado, se ha descrito que algunos receptores durante el proceso de desensibilización homóloga pueden señalizar hacia otras vías a través de la participación de β -arrestinas. En este mecanismo, las β -arrestinas actúan como proteínas de andamiaje que permiten el reclutamiento de ciertas proteínas señalizadoras como las pertenecientes a la cascada de ERK1/2, conduciendo a su activación (Luttrell y col., 2001; DeWire y col., 2007). Esta activación suele ser más tardía y sostenida que la provocada por proteína G. Como en los cursos temporales (Figura 15) se observan diferencias significativas en la activación de ERK1/2 en tiempos de 10 y 20 minutos, donde según la dinámica del receptor a estos tiempos ya

el proceso de internalización ha comenzado (Hunyady y col., 2002), hipotetizamos que tal vez existía algún efecto de insulina en la expresión de las β -arrestinas.

β -arrestina 2 ha sido nombrada en varios estudios como importante en la señalización hacia ERK1/2 para el receptor AT₁. Luttrell y col., muestran por ensayos de microscopía confocal la colocalización de esta proteína con ERK2 en vesículas endosomales, así como detectados mediante ensayos de inmunoprecipitación complejos moleculares entre β -arrestina 2 y componentes de la cascada de señalización de ERK1/2 (Luttrell y col., 2001). Otros trabajos muestran un decremento en la activación de ERK1/2 por Ang II cuando son disminuidos los niveles de esta proteína en las células (Kim y col., 2009).

Basados en estos antecedentes quisimos evaluar si insulina tenía algún efecto en la expresión de β -arrestina 2. Los resultados presentados en la figura 20 mostraron que el tratamiento con insulina no provocó cambios en los niveles de esta proteína. Por lo que este resultado tampoco nos acerca a explicar el mecanismo por el cual insulina disminuye la activación de ERK1/2 en respuesta al estímulo con Ang II. No obstante, es necesario realizar procedimientos diferentes para evaluar otros efectos que pudiese tener insulina en β -arrestina 2, por ejemplo, que impida la movilización de β -arrestina 2 hacia la membrana en presencia de estímulo.

Por otro lado, β -arrestina 1 cumple múltiples funciones en la regulación de la señalización celular. Por ejemplo, β -arrestina 1 es uno de los factores iniciales en la desensibilización homóloga del receptor ocupado por ligando (Parruti y col., 1993; Ferguson y col., 1996; Lefkowitz, 1998; Irannejad y von Zastrow, 2014; Rajagopal y Shenoy, 2017). Cuando el receptor ocupado es fosforilado por GRKs, esto permite la unión de β -arrestina 1 al GPCR. La unión de β -arrestina 1 impide estéricamente la asociación de la proteína G heterotrimérica, inhibiendo así la posterior señalización dependiente de proteína G. β -arrestina 1 también participa en el proceso de endocitosis del receptor (Lefkowitz, 1998; Lin y col., 1998; Kang y col., 2014). Además de la asociación con el receptor fosforilado, β -arrestina 1 presenta motivos de unión en su estructura que le permiten funcionar como una proteína de anclaje, que permite la cercanía e interacción adecuada para la activación de ciertas proteínas como la vía de

las MAPK/ERK1/2 (Luttrell y col., 2001), por lo que mientras que por un lado la internalización y por consiguiente la unión de β -arrestina 1 al receptor media la desensibilización de la señal clásica dependiente de proteína G, es también un paso necesario para la completa y más sostenida activación de ERK1/2.

De manera interesante en este trabajo encontramos que el tratamiento con insulina promueve una disminución dependiente del tiempo de los niveles basales de β -arrestina 1, haciéndose significativa a tiempos de incubación de 12 y 24 horas. Por lo que es posible que al existir menos moléculas de β -arrestina 1, la cantidad de complejos que pueden formarse entre β -arrestina 1 y los componentes de la cascada de ERK1/2 también estén disminuidos conduciendo a lo observado: una menor activación de ERK1/2 una vez estimuladas las células con Ang II.

Conclusiones similares se muestran en el trabajo de Dalle y col., (Dalle y col., 2002), donde en células fibroblásticas de ratas obtuvieron que el tratamiento con insulina desde las 8 y hasta las 24 horas promueve una disminución en la expresión de β -arrestina 1 de aproximadamente el 50 %, disminución similar a la obtenida en nuestro modelo de estudio. En este trabajo también muestran, al igual que en nuestro caso, que en las células donde la expresión de β -arrestina 1 está disminuida existe una disminución en la activación de MAPK inducida por el ligando IGF-1, LPA e isoproterenol. Estos autores a través de otros experimentos concluyen que el mecanismo por el cual insulina promueve una disminución de los niveles de β -arrestina 1 es a través de la regulación positiva de su degradación, favoreciendo mecanismos de ubiquitinación de la β -arrestina 1.

Es importante destacar que los mecanismos a través de los cuales insulina pudiera estar provocando la disminución en la activación de ERK1/2 en respuesta a Ang II observada en nuestro estudio pueden ser varios, aunque estos no fueron evaluados en la presente tesis. Por ejemplo, se ha observado en corazones de ratones que el receptor de insulina y el β_2 -adrenérgico pueden formar un complejo en la membrana, pudiendo entonces contactar ambos receptores directamente, formando de este modo una amplia red entre estos sistemas de señalización (Fu y col., 2014). Además, insulina puede llevar a la desensibilización adrenérgica a través de la

fosforilación del receptor mediante las proteínas PKA y GRKs, así como promover su internalización (Fu y col., 2017), conduciendo a una menor sensibilidad del sistema frente al estímulo.

Nuestros resultados indican que el tratamiento de insulina conduce a una desensibilización heteróloga de la vía de señalización de Ang II hacia la activación de ERK1/2, y es probable que este efecto sea la consecuencia de la disminución de los niveles de β -arrestina 1.

Ang II tiene efectos proliferativos y de crecimiento celular, los cuales se han asociado en muchos casos con enfermedades como aterosclerosis, hipertensión e hipertrofia cardíaca, entre los eventos de señalización que son probablemente importantes para estos efectos mediados por Ang II, es la activación de ERK1/2. Por tanto, el tratamiento de insulina al inducir una desensibilización en la acción de Ang II en la activación de ERK1/2 pudiera afectar el papel de esta hormona en el control del crecimiento y la proliferación celular.

Finalmente teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo proponemos que la desensibilización causada por el tratamiento de insulina 100 nM por 24 horas en la activación de ERK 1/2 inducida por Ang II se debe a una disminución de la expresión de β -arrestina 1. Sin embargo, no es posible eliminar la posible participación de otros mecanismos como un secuestro del receptor en el citosol, una desensibilización más rápida mediada por proteínas cinasas estimuladas por la insulina, entre otros (Figura 22).

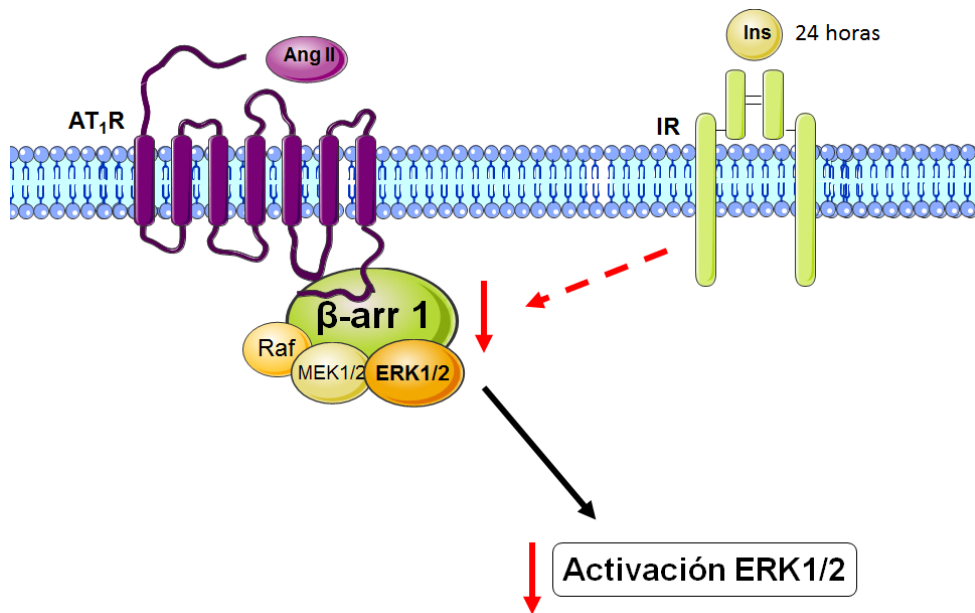


Figura 22. Mecanismo propuesto de inhibición de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II. El estímulo de Ang II en células HEK-19 induce la activación de ERK1/2 a través de vías de señalización mediados por el AT₁R. Entre los mecanismos de activación se encuentra la formación de complejos moleculares entre las β-arrestinas y los componentes de la cascada de ERK1/2. La incubación de las células con insulina 100 nM por 24 horas conduce a una disminución de los niveles de β-arrestina 1, lo cual provoca una menor formación de los complejos y por tanto una inhibición de la activación de ERK1/2 en respuesta al estímulo de Ang II. Las líneas rojas representan un efecto regulatorio negativo de insulina. La línea discontinua significa que el mecanismo por el cual insulina disminuye la cantidad de β-arrestina 1 no se conoce. La línea sólida negra representa el efecto de activación que tiene Ang II sobre la vía de ERK1/2.

6. Conclusiones

En la presente tesis se investigó el efecto de insulina en la activación de ERK1/2 mediada por Ang II, en células de expresión estable del receptor AT₁ y de expresión endógena del IR. A partir de los resultados podemos concluir que la incubación con insulina de las células tiene un efecto inhibitorio en la activación de ERK1/2 en respuesta a Ang II y que esta disminución no ocurre por cambios en la expresión basal de ERK1/2 ni de PKC δ y β -arrestina 2, proteínas que han sido implicadas en la activación de esta vía. Sin embargo, los niveles proteicos de β -arrestina 1 disminuyen drásticamente en aquellas células incubadas con insulina, por lo que proponemos que:

- Insulina constituye un regulador negativo de la activación de ERK1/2 por Ang II, mediante un mecanismo que pudiese implicar la disminución de la expresión de β -arrestina 1.

7. Perspectivas

Este trabajo constituye uno de los pocos de la literatura sobre la regulación que puede tener las vías de señalización de insulina en aquellas mediadas por Ang II. Por lo que a partir de nuestros hallazgos consideramos que quedan varios elementos a considerar para poder establecer un mecanismo de acción a nivel molecular. Por lo que proponemos las siguientes tareas a desarrollar en continuidad a este proyecto:

- Evaluar si el efecto de insulina en la activación de ERK1/2 por Ang II es solo dependiente del efecto en β -arrestina 1 inhibiendo la señal a través de PKC.
- Evaluar si se recupera la activación de ERK1/2 por Ang II en células transfectadas con β -arrestina 1 luego del tratamiento con insulina 100 nM por 24 horas.
- Determinar el mecanismo por el cual insulina promueve una disminución de los niveles de β -arrestina 1.
- Determinar las proteínas de la vía de insulina implicadas en el efecto de esta en la activación de ERK1/2 por Ang II.
- Determinar si existe una afectación de la internalización o el tráfico intracelular del AT₁R mediado por insulina, así como de la movilización de las β -arrestinas.
- Evaluar el efecto de insulina en otras vías activadas por Ang II, como la formación de IP₃ y las corrientes citoplasmáticas de Ca²⁺.

8. Referencias Bibliográficas

Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K., y Krebs, E.G. (1991). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4220-4227.

Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., y Lefkowitz, R.J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of β -arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 35518-35525.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., y Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27489-27494.

Ando, K., y Fujita, T. (2006). Anti-diabetic effect of blockade of the renin-angiotensin system. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 8, 396-403.

Baltensperger, K., Karoor, V., Paul, H., Ruoho, A., Czech, M.P., y Malbon, C.C. (1996). The β -adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1061-1064.

Barki-Harrington, L., y Rockman, H.A. (2008). β -Arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology* 23, 17-22.

Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., y Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 8879-8882

Berridge, M.J. (2014). Module 7: Cellular Processes. *Cell Signalling Biology* 6, 1749-7787.

Boucek, P. (2006). Prevention of type 2 diabetes mellitus due to antihypertensive treatment affecting renin-angiotensin system. *Vnitřní lékařství* 52, 791-796.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., y Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.

Carey, R.M., y Siragy, H.M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews* 24, 261-271.

Cazaubon, S.M., Ramos-Morales, F., Fischer, S., Schweighoffer, F., Strosberg, A.D., y Couraud, P.-O. (1994). Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 24805-24809.

Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., y Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Molecular cell* 25, 297-308.

Craft, C.M., Whitmore, D.H., y Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *Journal of Biological Chemistry* 269, 4613-4619.

Chen, R.H., Sarnecki, C., y Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk-and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology* 12, 915-927.

Chen, Y.-h., Grall, D., Salcini, A.E., Pelicci, P.G., Pouyssegur, J., y Van Obberghen-Schilling, E. (1996). Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *The EMBO Journal* 15, 1037.

Dalle, S., Imamura, T., Rose, D.W., Worrall, D.S., Ugi, S., Hupfeld, C.J., y Olefsky, J.M. (2002). Insulin induces heterologous desensitization of G protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating β -arrestin-1. *Molecular and cellular biology* 22, 6272-6285.

Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., y Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., y Shenoy, S.K. (2007). β -arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 69, 483-510.

DeWire, S.M., Kim, J., Whalen, E.J., Ahn, S., Chen, M., y Lefkowitz, R.J. (2008). β -arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 10611-10620.

Elorza, A., Sarnago, S., y Mayor, F. (2000). Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Molecular Pharmacology* 57, 778-783.

Epstein, A.M., Throckmorton, D., y Brophy, C.M. (1997). Mitogen-activated protein kinase activation: an alternate signaling pathway for sustained vascular smooth muscle contraction. *Journal of vascular surgery* 26, 327-332.

Fabian, J.R., Daar, I.O., y Morrison, D.K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Molecular and cellular biology* 13, 7170-7179.

Ferguson, S.S.G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 53, 1-24.

Ferguson, S.S.G., Downey Iii, W.E., Colapietro, A.-M., Barak, L.S., Ménard, L., y Caron, M.G. (1996). Role of β -Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor. *Science* 271, 363.

Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L., y Feener, E.P. (1997). Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *Journal of Clinical Investigation* 100, 2158.

Freedman, N.J., y Lefkowitz, R.J. (1996). Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent progress in hormone research* 51, 319-351.

Fu, Q., Shi, Q., West, T.M., y Xiang, Y.K. (2017). Cross-Talk Between Insulin Signaling and G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 70, 74-86.

Fu, Q., Xu, B., Liu, Y., Parikh, D., Li, J., Li, Y., Zhang, Y., Riehle, C., Zhu, Y., y Rawlings, T. (2014). Insulin inhibits cardiac contractility by inducing a Gi-biased β 2-adrenergic signaling in hearts. *Diabetes* 63, 2676-2689.

García-Caballero, A.n., Olivares-Reyes, J.A., Catt, K.J., y García-Saínz, J.A. (2001). Angiotensin AT1 receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase. *Molecular Pharmacology* 59, 576-585.

Gille, H., Sharrocks, A.D., y Shaw, P.E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358, 414-417.

Goldsmith, Z.G., y Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122.

Gress, T.W., Nieto, F.J., Shahar, E., Wofford, M.R., y Brancati, F.L. (2000). Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 342, 905-912.

Gurevich, V.V., y Benovic, J.L. (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* 268, 11628-11638.

Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G.D., y Eguchi, S. (2007). Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical Science* 112, 417-428.

Hsueh, W.A., Do, Y.S., Anderson, P.W., y Law, R.E. (1995). Angiotensin II in cell growth and matrix production. In *Tissue Renin-Angiotensin Systems* (Springer), pp. 217-223.

Hunyady, L., Baukal, A.J., Gáborik, Z., Olivares-Reyes, J.A., Bor, M., Szaszák, M., Lodge, R., Catt, K.J., y Balla, T. (2002). Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *The Journal of cell biology* 157, 1211-1222.

Hunyady, L.s., y Catt, K.J. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Molecular endocrinology* 20, 953-970.

Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B., y Reaven, G.M. (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10, 512-516.

Irannejad, R., y von Zastrow, M. (2014). GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* 27, 109-116.

Ishizuka, T., Kajita, K., Yamada, K., Miura, A., Kanoh, Y., Ishizawa, M., Wada, H., Itaya, S., Yamamoto, M., y Yasuda, K. (1996). Insulin regulates PKC isoform mRNA in rat adipocytes. *Diabetes research and clinical practice* 33, 159-167.

Jandeleit-Dahm, K.A.M., Tikellis, C., Reid, C.M., Johnston, C.I., y Cooper, M.E. (2005). Why blockade of the renin–angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *Journal of hypertension* 23, 463-473.

Kahn, B.B., y Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *Journal of clinical investigation* 106, 473.

Kang, D.S., Tian, X., y Benovic, J.L. (2014). Role of β -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Current opinion in cell biology* 27, 63-71.

Karoor, V., y Malbon, C.C. (1996). Insulin-like growth factor receptor-1 stimulates phosphorylation of the β 2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. *Journal of Biological Chemistry* 271, 29347-29352.

Kim, J., Ahn, S., Rajagopal, K., y Lefkowitz, R.J. (2009). Independent β -arrestin2 and Gq/protein kinase C ζ pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* 284, 11953-11962.

Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B., y Spiegelman, B.M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *Journal of Clinical Investigation* 101, 1.

Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 705-732.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marmé, D., y Rapp, U.R. (1993). Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.

Kovacs, J.J., Hara, M.R., Davenport, C.L., Kim, J., y Lefkowitz, R.J. (2009). Arrestin development: emerging roles for β -arrestins in developmental signaling pathways. *Developmental cell* 17, 443-458.

Lee, J., y Pilch, P.F. (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 266, C319-C334.

Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptors III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18677-18680.

Lin, F.-T., Daaka, Y., y Lefkowitz, R.J. (1998). β -Arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31640-31643.

Lin, F.-T., Miller, W.E., Luttrell, L.M., y Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback regulation of β -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15971-15974.

Lind, L., Berne, C., y Lithell, H. (1995). Prevalence of insulin resistance in essential hypertension. *Journal of hypertension* 13, 1457-1462.

Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., y Wetzker, R. (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase γ . *Science* 275, 394-397.

Luttrell, L.M., y Lefkowitz, R.J. (2002). The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science* 115, 455-465.

Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., y Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 2449-2454.

Medina, L.D.E.L.C., VÁZquez-Prado, J., y GarcÍA-SÁInz, J.A. (2000). Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and α 1b-adrenoceptors. *Biochemical Journal* 350, 413-419.

Mehta, P.K., y Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292, C82-C97.

Motley, E.D., Eguchi, K., Gardner, C., Hicks, A.L., Reynolds, C.M., Frank, G.D., Mifune, M., Ohba, M., y Eguchi, S. (2003). Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- α . *Hypertension* 41, 775-780.

Murakami, A., Yajima, T., Sakuma, H., McLaren, M.J., y Inana, G. (1993). X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS letters* 334, 203-209.

Natali, A., y Ferrannini, E. (2004). Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics* 33, 417-429.

Nickenig, G., Röling, J., Strehlow, K., Schnabel, P., y Böhm, M. (1998). Insulin induces upregulation of vascular AT 1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 98, 2453-2460

O'Brien, R.M., y Granner, D.K. (1996). Regulation of gene expression by insulin. *Physiological Reviews* 76, 1109-1161.

O'Brien, R.M., Streeper, R.S., Ayala, J.E., Stadelmaier, B.T., y Hornbuckle, L.A. (2001). Insulin-regulated gene expression (Portland Press Limited).

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., y Caron, M.G. (1999). Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *Journal of Biological Chemistry* 274, 32248-32257.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., y Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- β -arrestin complexes after receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19452-19460.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., y Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for GPCRs delineate two major classes of receptors. *Journal of Biological Chemistry*.

Olefsky, J.M., y Saltiel, A.R. (2000). PPAR γ and the treatment of insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11, 362-368.

Olivares-Reyes, J.A., Arellano-Plancarte, A., y Castillo-Hernandez, J.R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* 302, 128-139.

Olivares-Reyes, J.A., Shah, B.H., Hernandez-Aranda, J., Garcia-Caballero, A., Farshori, M.P., García-Sáinz, J.A., y Catt, K.J. (2005). Agonist-induced interactions

between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. *Molecular pharmacology* 68, 356-364.

Olson, E.R., Shamhart, P.E., Naugle, J.E., y Meszaros, J.G. (2008). Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase C δ and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 51, 704-711.

Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D., y De Blasi, A. (1993). Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* 268, 9753-9761.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.-e., Karandikar, M., Berman, K., y Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.

Pessin, J.E., y Saltiel, A.R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 106, 165.

Pierce, K.L., y Lefkowitz, R.J. (2001). Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 727-733.

Pitcher, J.A., Tesmer, J.J.G., Freeman, J.L.R., Capel, W.D., Stone, W.C., y Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 34531-34534.

Rajagopal, S., y Shenoy, S.K. (2017). GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cellular Signalling*.

Raman, M., Chen, W., y Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100.

Reaven, G. (2004). The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 33, 283-303.

Reaven, G.M., Lithell, H., y Landsberg, L. (1996). Hypertension and associated metabolic abnormalities—the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *New England Journal of Medicine* 334, 374-382.

Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., y Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, 179-197.

Robinson, M.J., y Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology* 9, 180-186.

Rorsman, P. (2005). Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *South African Journal of Diabetes and Vascular Disease* 2, 109-113.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.

Sgouras, D.N., Athanasiou, M.A., Beal Jr, G.J., Fisher, R.J., Blair, D.G., y Mavrothalassitis, G.J. (1995). ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *The EMBO journal* 14, 4781.

Shah, B.H., y Catt, K.J. (2002). Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: Roles of protein kinase C δ , Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth factor receptor trans-activation. *Molecular pharmacology* 61, 343-351.

Shah, B.H., Yesilkaya, A., Olivares-Reyes, J.A., Chen, H.-D., Hunyady, L.s., y Catt, K.J. (2004). Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Molecular Endocrinology* 18, 2035-2048.

Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., y Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 6975-6979.

Soleimani, M. (2015). Insulin resistance and hypertension: new insights. *Kidney international* 87, 497-499.

Sui, X., Kong, N., Ye, L., Han, W., Zhou, J., Zhang, Q., He, C., y Pan, H. (2014). p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer letters* 344, 174-179.

Sutherland, C., O'Brien, R.M., y Granner, D.K. (2007). Insulin Action Gene Regulation. In *Mechanisms of Insulin Action* (Springer), pp. 110-132.

Suwanichkul, A., Allander, S.V., Morris, S.L., y Powell, D.R. (1994). Glucocorticoids and insulin regulate expression of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 through proximal promoter elements. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30835-30841.

Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., y Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 85-96.

Taniyama, Y., Hitomi, H., Shah, A., Alexander, R.W., y Griendling, K.K. (2005). Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1142-1147.

Thomas, P., y Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51, 187-200.

Touyz, R.M., y Berry, C. (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 1001-1015.

Touyz, R.M., El Mabrouk, M., He, G., Wu, X.H., y Schiffrin, E.L. (1999a). Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 84, 505-515.

Touyz, R.M., He, G., Deng, L.-Y., y Schiffrin, E.L. (1999b). Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 99, 392-399.

Touyz, R.M., y Schiffrin, E.L. (1996). Tyrosine Kinase Signaling Pathways Modulate Angiotensin II-Induced Calcium ($[Ca^{2+}]_i$) Transients in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 27, 1097-1103.

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., y Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-214.

Wang, C.C.L., Goalstone, M.L., y Draznin, B. (2004). Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 53, 2735-2740.

Weston, C.R., y Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology* 19, 142-149.

Whalen, E.J., Rajagopal, S., y Lefkowitz, R.J. (2011). Therapeutic potential of β -arrestin-and G protein-biased agonists. *Trends in molecular medicine* 17, 126-139.

Wortzel, I., y Seger, R. (2011). The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes & cancer* 2, 195-209.

Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S., y Matsubara, K. (1987). Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochemical and biophysical research communications* 142, 904-910.

Yin, G., Yan, C., y Berk, B.C. (2003). Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 780-783.

Zarubin, T., y Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* 15, 11.

Zhou, M.-S., Wang, A., y Yu, H. (2014). Link between insulin resistance and hypertension: What is the evidence from evolutionary biology? *Diabetology & metabolic syndrome* 6, 12.