



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Efecto de Antioxidantes en la Señalización de Insulina y Angiotensina II en Células  
Hepáticas C9**

**Tesis que presenta**

**L. Q. Mónica Andrea Vinchira Lamprea**

**Para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en la especialidad de Bioquímica**

**Director de la tesis:**

**Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes**

Ciudad de México

Febrero del 2017

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 de CONACYT (No. 336799). Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (donativo No. 167673).

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios, todo poderoso que me fortalece con su amor, bondad y misericordia. Y a ti Santísima Madre, por tu poderosa intercesión.*

*A mis papás María y Luis Javier, quienes desde antes de tenerme en sus brazos me han amado, cuidado y apoyado, y a mis hermanas Janeth y Camila, quienes han sido mi compañía de grandes travesías. Ustedes han estado dispuestos desde la distancia a brindarme una sonrisa cuando la desesperación me agobiaba. Hoy este triunfo no es sólo mío, es el de ustedes como mi motor de vida. A mis abuelos, Cristóbal, Antonia, Isidro y María del Carmen, tíos y tías, primos y primas, maternos y paternos, por hacer de mis triunfos, alegrías y también tristezas, parte de sus vidas, infinitas gracias por sus oraciones, hoy no estaría aquí sin ello.*

*A ti Freddy, por tu comprensión, amor, paciencia, y todo el apoyo que me diste en cada momento, sin ti esto no hubiera sido posible.*

*Al Dr. Jesús Alberto Olivares por su paciencia y brindarme parte de su sabiduría, y a Judith Hernández por su fraternidad, apoyo y compañía durante la estancia en el laboratorio. Gracias a los dos por ser esos segundos padres y familia que necesitaba en este hermoso país, gracias por su preocupación en momentos de altibajos, por confiar en mí, e integrarme en el laboratorio.*

*Al Dr. Víctor Calderón por su apoyo y brindarme su energía y entusiasmo para sacar adelante este título de maestría, desde la entrevista. Y al Dr. Rafael Villalobos, por su carisma y sencillez; les agradezco a ambos por aceptar la asesoría y brindar grandes aportes para el proyecto.*

*A los Profesores del Departamento por compartir parte de sus conocimientos con nosotros como aprendices en el campo de la investigación. Es un orgullo el ser asistente de sus clases, y tener la oportunidad de discutir avances en la investigación en ciencias con ustedes.*

*A mis amigas de laboratorio Adriana, Paola, Huguet, Karina, Fernanda, Citlaly, Mónica y Wendy, realmente las admiro, y les agradezco por su apoyo tan incondicional, las quiero mucho. A mis compañeros de generación, Naty, Roger, Diego, Carlos, Ricardo, Pancho, Lorena, Diana, Mirell, Adriana, Ericka, Carla V., Carla P., Yuri, y Azucena. También a Alfredo y Lucho, por su preocupación, y apoyo durante el primer curso de Bioquímica General.*

*A todos los técnicos y auxiliares de laboratorio del Departamento, que estuvieron allí cuando uno lo necesitaba, y con su serenidad estuvieron ahí para colaborarnos. A Priscila, Angélica, Rocío, Leti, Oscar, Norma, infinitas gracias por su apoyo en la parte administrativa.*

*A mis amigos Santiago y Mauricio, por ser esos hermanos que me han brindado su apoyo incondicional desde la distancia. Y sin duda, gracias a ti Marisol, por estar ahí en el momento justo, y gracias a la familia Herrera Olguín por involucrarme como parte de su familia.*

*A CONACYT, por su apoyo económico con el fin de motivarnos a impulsar y fortalecer el desarrollo científico y la modernización tecnológica.*

## TABLA DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>4</b>  |
| 1.1 Mecanismos de señalización de la insulina .....                                 | <b>5</b>  |
| 1.2 Síntesis y acciones biológicas de la Angiotensina II.....                       | <b>15</b> |
| 1.3 Función de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) .....                      | <b>17</b> |
| 1.4 Efectos biológicos de los antioxidantes .....                                   | <b>22</b> |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....  | <b>24</b> |
| 2.1 Mecanismos asociados al desarrollo de resistencia a la insulina .....           | <b>24</b> |
| 2.2 Participación de Ang II en el desarrollo de resistencia a la insulina.....      | <b>26</b> |
| 2.3 Papel de la formación de las ERO's por Ang II en resistencia a la insulina..... | <b>28</b> |
| 2.4 Efecto de los antioxidantes.....  | <b>30</b> |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>4. HIPÓTESIS</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>5. OBJETIVOS</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>6. METODOLOGÍA</b> .....   | <b>35</b> |
| 6.1 Cultivo celular.....  | <b>35</b> |
| 6.2 Tratamientos .....  | <b>35</b> |
| 6.3 Fin del experimento.....  | <b>36</b> |
| 6.4 Ensayos inmunoblot .....  | <b>36</b> |
| 6.5 Análisis estadístico.....   | <b>38</b> |
| <b>7. RESULTADOS</b> .....  | <b>39</b> |
| 7.1 Efecto de la insulina en la fosforilación de Akt.....                           | <b>39</b> |
| 7.2 Efecto de la Ang II en la fosforilación de ERK 1/2 .....                        | <b>40</b> |
| 7.3 Efecto de Ang II en la vía de señalización de la insulina .....                 | <b>41</b> |
| 7.4 Efecto del RSV en la señalización de insulina modulada por Ang II .....         | <b>43</b> |
| 7.5 Efecto del RSV en la señalización de la insulina .....                          | <b>45</b> |
| 7.6 Efecto del NAC en la señalización de la insulina .....                          | <b>49</b> |
| 7.7 Efecto del NAC en la señalización de Ang II .....                               | <b>50</b> |
| <b>8. DISCUSIÓN</b> .....   | <b>54</b> |
| 8.1 Participación de la Ang II en las acciones de insulina en C9.....               | <b>55</b> |
| 8.2 Efecto de los antioxidantes en la señalización de insulina y Ang II .....       | <b>56</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>10. PERSPECTIVAS</b> .....   | <b>67</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>68</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de la Insulina humana .....   | 5  |
| Figura 2. Receptor de Insulina .....   | 7  |
| Figura 3. Vía de Señalización de la Insulina.....  | 10 |
| Figura 4. Esquema del desarrollo de resistencia a la insulina .....                                | 14 |
| Figura 5. Esquema del Sistema Renina-Angiotensina .....  | 15 |
| Figura 6. Vía de Señalización de la AngII.....   | 17 |
| Figura 7. Generación de las ERO's a partir de la reducción del oxígeno .....                       | 18 |
| Figura 8. Fuentes endógenas de las ERO's .....   | 18 |
| Figura 9. Complejo activado de la NOX por AngII y su ecuación representativa.....                  | 19 |
| Figura 10. Efecto del estrés oxidativo generado por el incremento de glucosa .....                 | 21 |
| Figura 11. Mecanismo general de los antioxidantes.....   | 22 |
| Figura 12. Estructura molecular del RSV .....  | 23 |
| Figura 13. Estructura molecular del NAC .....  | 23 |
| Figura 14. Fosforilación en Ser/Thr de IRS-1 inducido por distintos factores / AngII .....         | 26 |
| Figura 15. Efecto de la Ang II en la señalización de la insulina en C9.....                        | 27 |
| Figura 16. ERK 1/2 está implicado en la regulación de las acciones de insulina.....                | 28 |
| Figura 17. AngII promueve la formación de ERO's vía NOX.....                                       | 29 |
| Figura 18. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina por AngII en VSMC .....                | 29 |
| Figura 19. Efecto de ERO's generadas por AngII en insulina en L6 .....                             | 30 |
| Figura 20. Efecto divergente del RSV en la señalización de insulina en adipocitos .....            | 31 |
| Figura 21. NAC restaura la inhibición por ERO's en insulina en 3T3-L1 .....                        | 32 |
| Figura 22. Fosforilación de Akt por insulina en función del tiempo de estímulo.....                | 39 |
| Figura 23. Fosforilación de ERK 1/2 por AngII en función del tiempo de estímulo .....              | 40 |
| Figura 24. Efecto de AngII en la fosforilación de Akt inducida por insulina.....                   | 41 |
| Figura 25. Efecto de AngII en la fosforilación de GSK-3 $\alpha/\beta$ inducida por insulina ..... | 42 |
| Figura 26. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt .....   | 43 |
| Figura 27. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inhibida por AngII.....                       | 44 |
| Figura 28. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt por insulina en tiempos cortos .....          | 45 |
| Figura 29. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt por insulina en tiempos largos .....          | 46 |
| Figura 30. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 por insulina .....                        | 46 |
| Figura 31. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 por insulina .....                        | 47 |
| Figura 32. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt en función de la concentración .....          | 48 |
| Figura 33. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 .....                                     | 49 |
| Figura 34. Efecto del NAC en la fosforilación de Akt inducida por insulina.....                    | 49 |
| Figura 35. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 en función del tiempo .....               | 50 |

|  |           |
|--|-----------|
| Figura 36. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 .....                       | <b>51</b> |
| Figura 37. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 por Ang II.....             | <b>52</b> |
| Figura 38. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 por Ang II.....             | <b>53</b> |
| Figura 39. Modelo representativo del efecto del RSV en la vía de insulina en C9..... | <b>60</b> |
| Figura 40. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt en fibroblastos .....           | <b>61</b> |
| Figura 41. Efecto del RSV en insulina a través de su actividad antioxidante .....    | <b>62</b> |
| Figura 42. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 .....                       | <b>65</b> |
| Figura 43. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 en C9 .....                 | <b>66</b> |

### **LISTA DE TABLAS**

|   |           |
|---|-----------|
| Tabla 1. Estrategia experimental.....                     | <b>36</b> |
| Tabla 2. Anticuerpos empleados y sus características..... | <b>37</b> |

## ABREVIACIONES

|   |                     |
|---|---------------------|
| Aminoácido Tirosina                                       | Tyr                 |
| Aminoácidos Serina/Treonina                               | Ser/Thr             |
| Angiotensina II   | Ang II              |
| Células de Músculo Liso Vascular                          | VSMC                |
| Cinasa de Sintasa de Glucógeno                            | GSK-3               |
| Clona celular hepática                                    | C9                  |
| Diabetes Mellitus tipo II                                 | DM2                 |
| Diacilglicerol  | DAG                 |
| Enzima convertidora de Angiotensina                       | ECA                 |
| Especies Reactivas de Oxígeno                             | ERO's               |
| Fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato                   | PIP3                |
| Fosfatidilinositol 3 cinasa                               | PI3K                |
| Fosfolipasa C   | PLC                 |
| Inositol trifosfato                                       | IP3                 |
| Insulina  | Ins                 |
| N-Acetilcisteína  | NAC                 |
| Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato Oxidasa         | NADPH oxidasa / NOX |
| Proteína Cinasa C   | PKC                 |
| Proteína Cinasa B   | Akt                 |
| Proteína Cinasa dependiente de fosfoinositidos 3          | PDK1                |
| Proteína sustrato del Receptor de Insulina                | IRS                 |
| Proteínas Cinasas activadas por mitógenos                 | MAPK's              |
| Proteínas fosfatasas de Tirosina                          | PTPs                |
| Receptor de Angiotensina tipo 1                           | AT <sub>1</sub> R   |
| Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal               | EGFR                |
| Receptor de Insulina                                      | IR                  |
| Receptores acoplados a proteínas G                        | GPCR's              |
| Receptores con actividad intrínseca de cinasa de Tirosina | RTK's               |
| Resveratrol   | RSV                 |
| Sintasa de Glucógeno                                      | GS                  |
| Sistema de Renina - Angiotensina                          | SRA                 |
| Suero Fetal Bovino  | FBS                 |

## RESUMEN

Alteraciones en los mecanismos de regulación de la insulina, conllevan a una condición conocida como resistencia a la insulina, la cual contribuye al desarrollo de diabetes tipo II. Puede ser inducida por estados de hiperinsulinemia, incremento de ácidos grasos, o por la participación de distintas hormonas, como angiotensina II. Esta última, sintetizada por el sistema renina-angiotensina, tiene un papel catabólico sobre el tejido hepático. Sus acciones son mediadas a través de la activación del receptor AT<sub>1</sub>, un receptor perteneciente a la familia de los GPCRs, dando lugar a la formación de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol, una molécula que activa PKC, la cual puede fosforilar en Ser/Thr de IR e IRS-1, disminuyendo la señalización de insulina y promoviendo su degradación. Además, angiotensina II promueve la producción de especies reactivas de oxígeno, a través de la activación de la NADPH oxidasa. Cuando se manifiesta un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y el nivel antioxidante intracelular, conlleva a la generación de estrés oxidativo, causando la activación de cinasas de Ser/Thr. Para determinar el papel de la generación de especies reactivas de oxígeno por angiotensina II en resistencia a la insulina, se empleó los antioxidantes *resveratrol* (RSV) y *N-acetilcisteína* (NAC), partiendo de la hipótesis de que en el hígado, el tratamiento con el RSV y el NAC, revertirá el efecto provocado por angiotensina II. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar, como condición inicial, el efecto del RSV y del NAC en la señalización de la insulina y angiotensina II. De manera interesante los resultados mostraron que el RSV y el NAC, presentaron efectos diferentes en la línea celular C9. Mientras que el RSV no revirtió el efecto provocado por angiotensina II en la señal de insulina, mostrando por sí mismo un efecto inhibitorio en la fosforilación de Akt y de ERK 1/2 inducida por la insulina, el NAC no inhibió la fosforilación de Akt inducida por la insulina. Sin embargo, el NAC promovió un incremento en la fosforilación de ERK 1/2 de manera independiente a la angiotensina II. Por lo tanto, es posible que los efectos generados por el RSV y el NAC, de una manera dependiente al tiempo y a la concentración en células de origen hepático de rata, puedan deberse a distintos mecanismos independientes de su actividad antioxidante.



## ABSTRACT

Alterations in the regulatory mechanisms of insulin, lead to a condition of insulin resistance, which contributes to the development of diabetes mellitus II. It can be induced by states of hyperinsulinemia, increase of fatty acids, or participation of various hormones, such as Angiotensin II. Angiotensin II is synthesized by renin-angiotensin system, and it has a catabolic role on liver tissue, where Angiotensin II promotes glycogenolysis or glycogen degradation, their actions are mediated through the activation of a receptor belonging to the GPCRs family, resulting in the formation of IP3 and DAG, a molecule which activates PKC which can phosphorylate Ser/Thr IR and IRS-1, decreasing insulin signaling, and promote its degradation. In addition, Angiotensin II promotes the reactive oxygen species (ROS) production through NADPH oxidase activation. When there is an imbalance between the ROS production and intracellular antioxidant, leads to the generation of oxidative stress, causing activation Ser/Thr kinases. To determine the role of the generation of ROS by Angiotensin II in insulin resistance, we used *resveratrol* (RSV) and *N-acetylcysteine* (NAC) antioxidants, to study whether reactive oxygen species generated by Angiotensin II, regulate the actions of insulin, assuming that in the liver, Angiotensin II induces formation of ROS through activation of NADPH oxidase, which generate insulin resistance, a condition that could be reversed by treatment with RSV and NAC. Therefore, the aim of the present study was to determine, as an initial condition, the effect of RSV and NAC on insulin and Angiotensin II signaling. Interestingly, the results showed that RSV and NAC had different effects on the C9 cell line. While RSV did not reverse the effect caused by angiotensin II on the insulin signaling, by itself showing an inhibitory effect on insulin-induced Akt and ERK 1/2 phosphorylation, NAC did not inhibit insulin-induced Akt phosphorylation. However, NAC promoted an increase in ERK 1/2 phosphorylation independently of angiotensin II. Therefore, it is possible that the effects generated by RSV and NAC, in a time and concentration-dependent manner in hepatic rat-derived cells, may be due to mechanisms independent of their antioxidant activity.

# 1. INTRODUCCIÓN

La regulación en la señalización de la insulina es de vital importancia para mantener un adecuado funcionamiento en el metabolismo, y se han reportado distintos mecanismos como la participación de fosfatasa (PTPs) que desfosforilan en residuos de tirosina (Tyr) del receptor de insulina (IR) o su sustrato (IRS), la fosforilación en IR e IRS en serina/treonina (Ser/Thr) por acción de distintas cinasas, y la reducción de la actividad de proteínas efectoras río abajo, responsables de transmitir la señal de insulina para la regulación de eventos metabólicos dentro de la célula, entre otros. Alteraciones en estos mecanismos conllevan a una condición conocida como *resistencia a la insulina*, la cual contribuye al desarrollo de diabetes mellitus tipo II (DM2), y que consiste en que las células no responden adecuadamente a la insulina, presentando deficiencias en su señalización; puede ser inducida por estados de hiperinsulinemia, incremento de ácidos grasos, por citocinas pro-inflamatorias, o por la participación de distintas hormonas, como epinefrina, glucagón y angiotensina II (Ang II). Esta última, sintetizada por el sistema renina-angiotensina (SRA), puede regular la homeostasis renal y vascular, y tiene un papel catabólico importante sobre el tejido hepático (Arellano-Plancarte et al., 2010); sus acciones son mediadas a través de la activación del receptor AT<sub>1</sub>, un receptor situado en la membrana plasmática perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), dando lugar a la formación de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol, una molécula que activa PKC, la cual puede fosforilar en Ser/Thr de IR e IRS-1, disminuyendo la señalización de insulina y promoviendo su degradación (Gutiérrez et al., 2016). Además, Ang II promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's), a través de la activación del complejo multiproteico NADPH oxidasa (NOX) (Wei et al., 2006). Cuando se manifiesta un desequilibrio entre la producción de ERO's y el nivel antioxidante intracelular, conlleva a la generación de estrés oxidativo, causando la activación de cinasas de Ser/Thr, como JNK y PKC (Lastra-Lastra et al., 2009), mecanismo por el cual también se conduce a la desensibilización de las acciones de insulina, lo cual ha sido estudiado ampliamente en sistema cardiovascular. Evidencias experimentales y clínicas reportan el beneficio de los antioxidantes y su rol para prevenir efectos tóxicos del estrés oxidativo durante estados de hiperglicemia y DM2, restaurando la sensibilización a la

insulina, protegiendo a las células de acumulación lipídica, y reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Pervaiz, 2003).

De esta manera, el presente proyecto describe como condición inicial el efecto de los antioxidantes en la señalización de insulina y Ang II para evaluar posteriormente si las ERO's promovidas por Ang II, regulan las acciones de insulina en células hepáticas C9.

## 1.1 Mecanismos de Señalización de la Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica anabólica, cuya masa molecular corresponde a 5.8 KDa; a nivel estructural está formada por 51 aminoácidos distribuidos en dos cadenas unidas por puentes disulfuro (Fig. 1). Es secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans en respuesta a elevados niveles de glucosa en la sangre. Se ha reportado ampliamente en diversos modelos celulares que la vía de señalización de la insulina regula funciones metabólicas, como el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, para lo cual promueve su entrada y almacenamiento en músculo y tejido adiposo, además de regular el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. La insulina también regula funciones mitogénicas, como el crecimiento, diferenciación y crecimiento celular, y estudios más recientes han establecido un tercer rol para la insulina, relacionado con los mecanismos de envejecimiento y longevidad (Ramalingam et al., 2013), entre otras funciones.

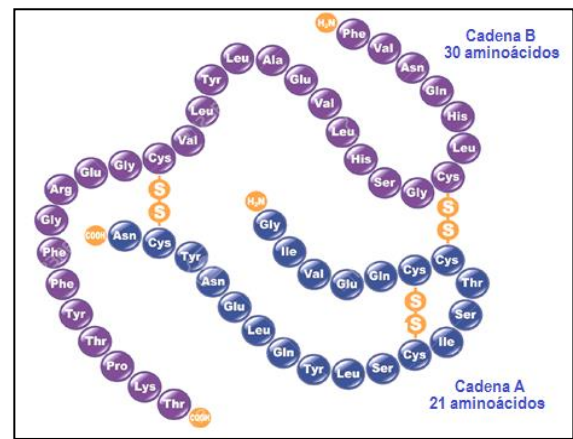


Figura 1. Estructura de la Insulina humana (Tomado de: <https://diabetesyembarazo.com/2016/02/17/insulina/>)

### 1.1.1 Activación

La acción de la insulina es mediada por cascadas de señalización que ocurren intracelularmente, e inician cuando la hormona se une a su receptor situado en la membrana plasmática.

Cuatrecasas y Cono (1971) (citado por Ramalingam et al., 2013), identificaron a través del aislamiento del IR de un tejido hepático y adiposo de rata, que el receptor es una glucoproteína que une a la insulina en la superficie celular. El receptor pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasa de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr; además, el receptor es un heterotetrámero conformado por dos subunidades  $\alpha$ , de aproximadamente 135 KDa, y dos subunidades  $\beta$ , con masa de 95 KDa (Hedo et al., 1983). Las subunidades  $\alpha$ , están situadas a nivel extracelular y cada una de ellas contiene dos sitios de unión al ligando. Las subunidades  $\beta$ , contienen una región extracelular, una transmembranal y una intracelular. Esta última contiene el dominio catalítico de cinasa de Tyr con un sitio de unión a ATP, y además, se han identificado tres subregiones estructurales: *la yuxtamembranal*, en donde se localizan las Tyr<sup>965</sup> y Tyr<sup>972</sup>, y parece tener un papel importante en la transmisión de la señal, *la región del asa de activación*, en donde se localizan las Tyr<sup>1158</sup>, Tyr<sup>1162</sup> y Tyr<sup>1163</sup>, y se ha demostrado que la autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad de cinasa del receptor, y *la región del carboxilo terminal*, en donde se localizan las Tyr<sup>1328</sup> y Tyr<sup>1334</sup> (Fig. 2a) (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). Cabe resaltar, que se ha reportado que el receptor de insulina tiene dos isoformas (A y B), que se generan por un mecanismo de splicing alternativo del exón 11, el cual codifica 12 aminoácidos adicionales que están presentes en la subunidad  $\alpha$  de la isoforma B (IR-B), pero ausentes de la isoforma A (IR-A); ambas isoformas tienen diferentes distribuciones en cada tejido, especificidades del ligando y aspectos cinéticos distintos. El IR-A se expresa principalmente en células cancerosas y tejidos fetales, mientras que el IR-B se expresa predominantemente en tejidos sensibles a la insulina (Yamaguchi et al., 1993).

En respuesta a altos niveles de glucosa circulante, dos moléculas de insulina se unen a dos sitios localizados en cada monómero de las subunidades- $\alpha$  ( $K_D = 300 \text{ pM}$ ) del receptor, induciendo un cambio conformacional al dominio intracelular, promoviendo la actividad de cinasa de Tyr y la autofosforilación de las subunidades- $\beta$  (Fig. 2b) (Ramalingam et al., 2013), dando lugar al reclutamiento y fosforilación de proteínas IRS y Shc.

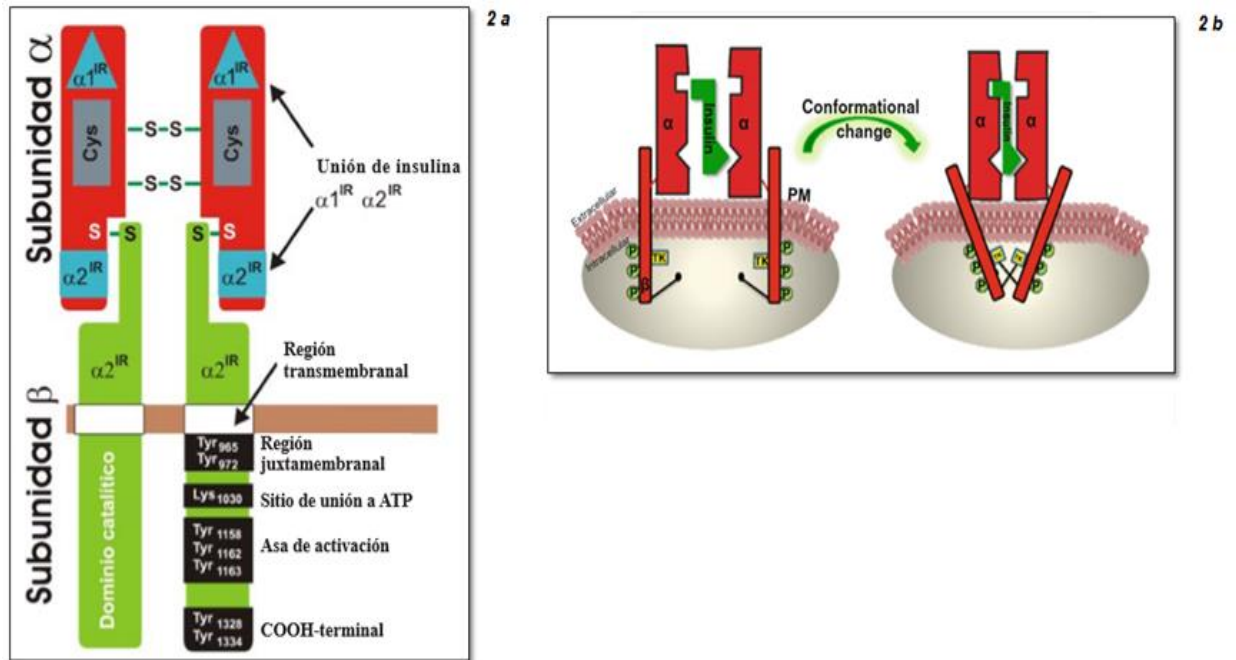


Figura 2. Receptor de Insulina. a. Representación estructural de IR (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008) b. Representación esquemática de la activación (Ramalingam et al., 2013)

Una vez que la insulina interacciona con su receptor, y este es activado, se inicia la activación de cascadas de señalización que dependen de varias interacciones proteicas; dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y la vía de la fosfatidilinositol 3- cinasa (PI3K) (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

### **1.1.1.1 Vía de señalización de las MAP cinasas**

Corresponde a la vía de señalización que regula la síntesis de proteínas y acciones mitogénicas dependientes de insulina (Fig. 3a). Se activa cuando el dominio citoplasmático del IR es fosforilado en residuos de Tyr, lo que promueve la asociación de la proteína Shc, la cual une al complejo Grb2/SOS. SOS es un factor recambiador de nucleótidos de guanina (GEF), capaz de activar a Ras. La activación de Ras (GTP-RAS) inicia el encendido de la cascada de las MAP cinasas (Raf/MEK/ERK) (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). Alternativamente a esta vía de señalización, la insulina promueve la activación de las MAP cinasas de una manera independiente a Shc, por una vía que depende de la activación de IRS, el cual estando activo une al complejo Grb2/SOS, y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc (Virkamäki et al., 1999; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). La conversión de GDP-Ras por GTP-Ras, mediado por SOS, es promovida por la acción de receptores con actividad intrínseca de cinasa de Tyr, incluyendo la familia de receptores de EGF, IGF y VEGF, así como también la familia de receptores acoplados a proteínas G (Roskoski, 2012).

ERK1 Y ERK2 son 84% idénticos en secuencia y comparten muchas funciones, por esta razón puede ser referido a ERK 1/2 y se expresan de forma ubicua, y cuando se activa fosforila proteínas citosólicas que se translocan al núcleo, donde ellos regulan la expresión génica y el crecimiento celular (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008; Vigneri et al., 2016), y otros procesos biológicos tales como la adhesión celular, progresión del ciclo celular, migración, supervivencia, diferenciación, metabolismo, proliferación y transcripción (Roskoski, 2012).

### **1.1.1.2 Vía de señalización PI3K/Akt**

La vía de señalización PI3K/Akt es el principal mediador de las acciones de la insulina en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Fig. 3b). Inicia cuando el receptor de insulina activo y auto-fosforilado, interacciona con IRS y lo fosforila en residuos de Tyr.

Las proteínas IRS contienen un dominio amino terminal de homología a pleckstrina (dominio PH), seguido por un dominio de unión a fosfotirosinas (PTB); este último promueve la interacción de IRS con la región yuxtamembranal del receptor de insulina, el cual fosforila a IRS en la región carboxilo terminal (-COOH). IRS al ser fosforilado por el IR, se convierte en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2, las cuales la mayoría funcionan como proteínas adaptadoras, como el PI3K, Grb2, entre otras. A pesar de que existen 4 isoformas de IRS (IRS-1 a IRS-4), la que está principalmente involucrada en el transporte de glucosa es la isoforma 1 (IRS-1) por lo que en adelante se hará referencia principalmente a esta isoforma.

PI3K, es un heterodímero que consta de dos subunidades: una reguladora (p85), que permite la unión a IRS-1, y la otra catalítica (p110), que es activada en respuesta a la interacción entre IRS-1 y p85. Su activación conduce al incremento en la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual activa a PDK1 (Vigneri et al., 2016), que junto con PDK2 promueven la activación de Akt (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Se han identificado tres isoformas de la proteína cinasa Akt: Akt 1-3, las cuales comparten un alto nivel de homología en su dominio catalítico, pero difieren en el dominio PH (el cual posee alta afinidad a PIP<sub>3</sub>) y en el dominio del C-terminal. Akt 1 y Akt 2 se expresan de forma ubicua, mientras que Akt 3 se encuentra predominantemente en el cerebro, corazón y riñón (Madhunapantula y Robertson, 2011). Cuando Akt permanece activa, regula los efectos de la insulina a través de la activación o inhibición por fosforilación de diferentes sustratos que propagan la respuesta asociada con varios procesos celulares tales como metabolismo, supervivencia celular, crecimiento, proliferación, captación de glucosa y angiogénesis (Manning y Cantley, 2007).

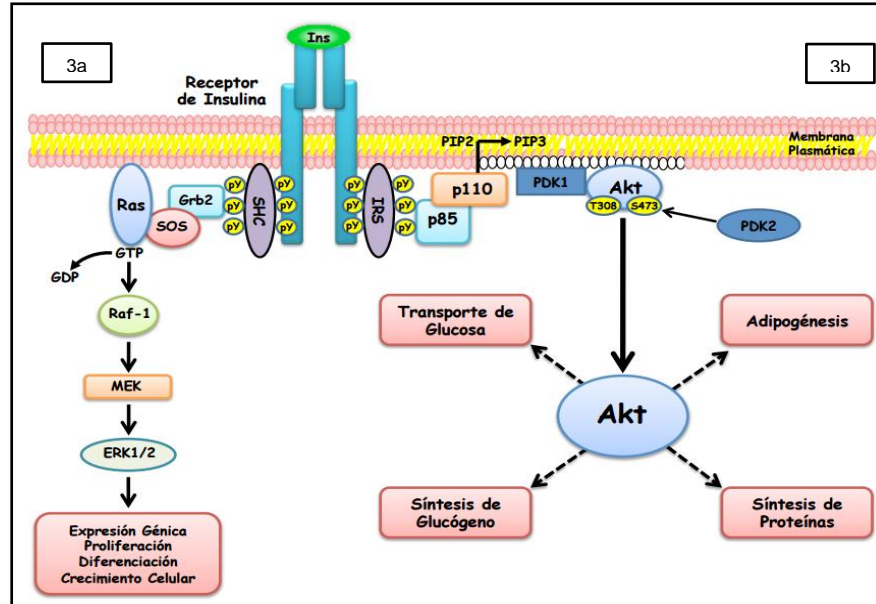
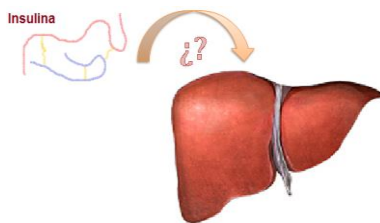


Figura 3. Vía de Señalización de la Insulina. a. Vía de las MAP cinasas. b. Vía PI3K/Akt (Gutiérrez et al., 2016)

### 1.1.1.3 Efecto de la Insulina en el hígado



Cuando la insulina promueve la activación de sus vías de señalización, propaga la señal para llevar a cabo procesos metabólicos de gran importancia fisiológica. Las acciones metabólicas de la insulina ocurren principalmente en músculo esquelético, tejidos hepático y adiposo.

El hígado es un órgano importante para la captación y almacenamiento de glucosa como reserva energética, la cual es fundamental para momentos de ayuno prolongado. En general, la insulina es la hormona más importante que inhibe la gluconeogénesis por la activación de un mecanismo de señalización que involucra la activación del IR y FOXO1 o mediante la supresión de la expresión de los genes de las enzimas gluconeogénicas, predominantemente la *fosfoenolpiruvato carboxicinasa* (PEPCK) y la *glucosa-6-fosfatasa* (G-6-asa) (Barthel y Schmolli, 2003). Además, la insulina favorece la síntesis de glucógeno, a través de la fosforilación e inactivación de la *glucogenosintasa-3-cinasa* (GSK-3), la cual en condiciones de no-estímulo inhibe a la *sintasa de glucógeno* (GS), de tal manera que la inhibición de GSK-3 por Akt favorece



la activación de GS (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). También se ha evidenciado que la insulina está involucrada en la regulación de la incorporación hepática de la glucosa promoviendo la transcripción a corto plazo de la enzima *glucocinasa*, la cual cataliza la fosforilación dependiente de ATP de glucosa para formar G6P (Glucosa-6-fosfato) (Iozzo et al., 2003). La insulina también promueve la activación del *piruvato cinasa*, de la *fosfofructocinasa* y la *glucocinasa*, enzimas clave de la glucólisis, y la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, la insulina inhibe la transformación de ácidos grasos y aminoácidos a cetoácidos, por lo tanto, dichas funciones tienen un papel fundamental en el ajuste de los niveles de glucosa en la sangre, y por consiguiente, en la regulación del metabolismo de la glucosa, y de nutrientes como ácidos grasos y proteínas.

### **1.1.2 Mecanismos de regulación de las acciones de insulina**

La regulación en la señalización de la insulina es de vital importancia para mantener un adecuado funcionamiento en el metabolismo; sus acciones son altamente moduladas mediante mecanismos de auto-regulación, el cual es un proceso de desensibilización homóloga, en donde las enzimas río abajo involucradas en la señalización, inhiben la actividad de proteínas río arriba, como lo son el propio receptor o sus sustratos IRS. Además, las subunidades- $\alpha$  del receptor, tienen un papel regulador sobre las subunidades- $\beta$ , inhibiendo su capacidad para auto-fosforilarse.

Además de forma alterna, la regulación se puede llevar a cabo también mediante un mecanismo de desensibilización heteróloga, en donde participan señales de vías no relacionadas con la insulina. A continuación, se detallan los principales puntos de regulación:

#### **(a) A nivel del receptor**

En seguida del estímulo con insulina, el receptor es endocitado junto con el ligando, y una vez integrado en los endosomas (vesículas recubiertas de clatrina), la insulina es liberada en respuesta a la activación de la vía de degradación proteolítica. El receptor

es entonces reciclado hacia la superficie celular, mientras que la insulina es degradada en los lisosomas. Con este mecanismo de internalización, degradación y reciclamiento, existe un número de receptores presentes en la superficie celular disponibles para la interacción con el ligando; sin embargo, en condiciones saturantes de insulina por condiciones de estímulo prolongado, el receptor es endocitado hacia los lisosomas para su degradación (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

### ***(b) A nivel del receptor y de sus sustratos IRS***

Además del proceso de endocitosis, también existe la participación de proteínas fosfatasa de Tyr (PTPs) entre las que se incluyen a: PTP1B (asociada al retículo endoplásmico), LAR, PTP $\alpha$ , PTP $\epsilon$ , SHP-2, entre otras, las cuales tienen un rol predominante en el control de la señalización de la insulina, a partir de la defosforilación en Tyr de IR e IRS, dando lugar a la desactivación de la vía de señalización. La regulación mediada por la activación de PTPs representa un blanco terapéutico para el desarrollo de una nueva clase de fármacos que puedan controlar la DM2 (Drake y Posner, 1998; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Otro mecanismo de regulación a nivel de IR e IRS es mediado por el incremento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr, efecto que altera la autofosforilación de IR en respuesta a la insulina, en el que participan proteínas como las cinasas PKA, PKC, JNK, mTOR, S6K, MAP cinasas, entre otras, las cuales también participan como reguladores negativos de IRS-1. Además, después del estímulo con insulina, el IRS-1 se fosforila de manera notable, no únicamente en residuos de Tyr sino también en residuos de Ser/Thr, dando lugar: (1) al desacoplamiento con IR, lo que altera su capacidad de experimentar fosforilación en residuos de Tyr, (2) a la disociación de complejos intracelulares que lo mantienen en cercanía con el IR, (3) y a su degradación proteasomal (Gual et al., 2005; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

### ***(c) A nivel de proteínas río abajo de IRS***

Además de la regulación a nivel del receptor de insulina y de IRS, existen puntos de regulación por debajo de ambas proteínas entre las que se encuentran PI3K, Akt o GLUT-4, que también influyen en la modulación de la señal de insulina. En este contexto, se ha identificado la participación de fosfatasa de lípidos de membrana, como PTEN y SHIP-2, consideradas como reguladores negativos de las acciones de la insulina, las cuales inducen la desfosforilación de PIP<sub>3</sub> (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato), el cual es un producto de la activación de PI3K (Mahadevan et al., 2008), antagonizando así de manera específica la señalización de PI3K/Akt.

De manera interesante, un estudio reciente demostró que además de disminuir los niveles de PIP<sub>3</sub>, PTEN también puede desfosforilar a IRS-1 alterando de esta forma la señalización de insulina a través de la vía PI3K/Akt mediante estos dos mecanismos (Shi et al., 2014).

#### **1.1.3 Resistencia a la Insulina**

Alteraciones en los mecanismos de señalización mencionados, puede dar lugar a una condición de resistencia a la insulina, la cual está asociada con la obesidad, hipertensión, enfermedades de tipo cardiovascular y DM2. La resistencia se puede definir como una condición patológica en la cual las células no responden apropiadamente a la hormona, presentado deficiencias en la señalización, y se ha estudiado clínicamente como un factor que reduce el transporte de glucosa inducido por la insulina en tejido adiposo y muscular, el aumento de la producción de glucosa hepática, y genera alteraciones en el metabolismo de lípidos, entre otras funciones dependientes de la insulina (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008). Comprender los mecanismos que promueven el desarrollo de la resistencia a la insulina, permite desarrollar nuevas estrategias que conlleven a contrarrestar esta condición.

La resistencia a la insulina y la reducción en la producción de esta hormona, son las principales características de la patogénesis de DM2; el estilo de vida, la inactividad

física, la obesidad abdominal, la concentración excesiva de adipocinas pueden causar resistencia. En una etapa temprana, la tolerancia de glucosa normal es preservada por la compensación de un estado de hiperinsulinemia; sin embargo, el incremento de glucosa, ácidos grasos y niveles de insulina conducen a la sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno (ERO's), activando las vías inducidas por estrés oxidativo, que pueden regular negativamente las acciones de insulina para acelerar el comienzo de DM2 (Tangvarasittichai, 2015). En la figura 4 se resume el desarrollo de resistencia a la insulina y las consecuencias de la disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas.

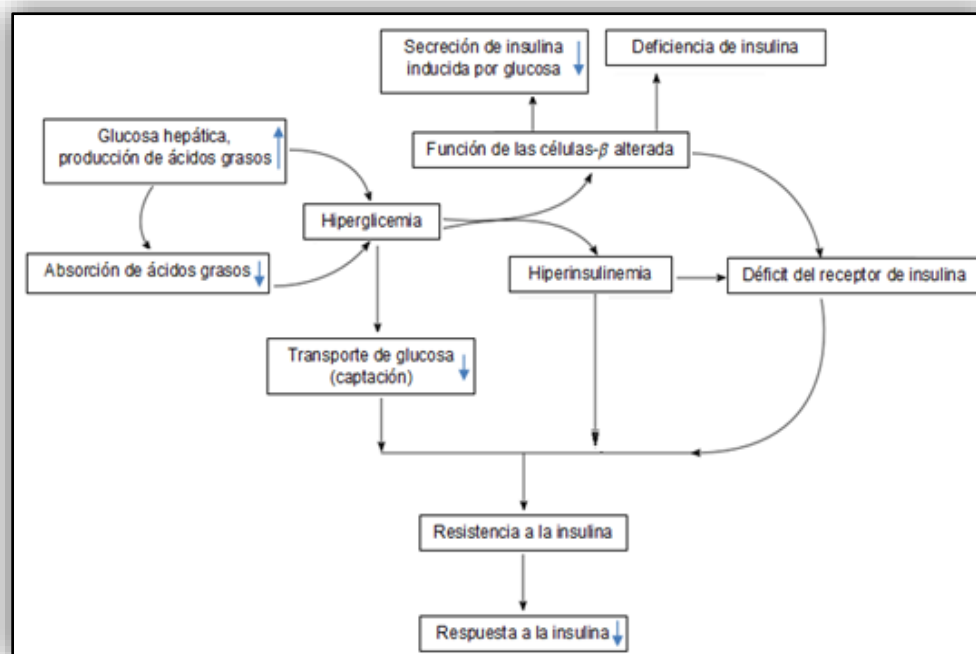


Figura 4. Esquema del desarrollo de resistencia a la insulina. Modificado de: Tangvarasittichai (2015)

En estudios desarrollados a nivel molecular en animales y modelos celulares, se ha sugerido que un aumento en la fosforilación de Ser/Thr en las proteínas IRS-1, inducido por un estímulo prolongado de insulina y otros estímulos (tales como Ang II, TNF- $\alpha$ , ácidos grasos libres, triglicéridos, endotelina-1 y estrés celular), juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina (Olivares-Reyes, Arellano-Plancarte, y Castillo-Hernandez, 2009).

De este modo, se ha descrito en modelos celulares relacionados con el sistema cardiovascular, que la Ang II a través de la activación de su receptor  $AT_1$  regula de manera negativa la vía de señalización de la insulina. Sin embargo, poco se ha descrito sobre su acción en modelos celulares relacionados con efectos metabólicos de la insulina como el hígado, que en conjunto con el músculo y el tejido adiposo, contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina. A continuación, se describirán los mecanismos de señalización de la Ang II, como elemento que induce desensibilización en las acciones de la insulina estudiado en el presente trabajo.

## 1.2 Síntesis y acciones biológicas de la Ang II

La Angiotensina II (Ang II) es el principal péptido del sistema de renina-angiotensina (SRA) (Fig. 5), el cual consiste en que en respuesta a un descenso de la presión arterial y una reducción del volumen total de sangre circulante de un individuo, se libera renina (2), también denominada *Angiotensinogenasa*, de la zona glomerular del riñón, la cual hidroliza angiotensinógeno, producido por el hígado (1), para formar angiotensina I. Esta última es catalizada por ECA (3) (*Enzima*

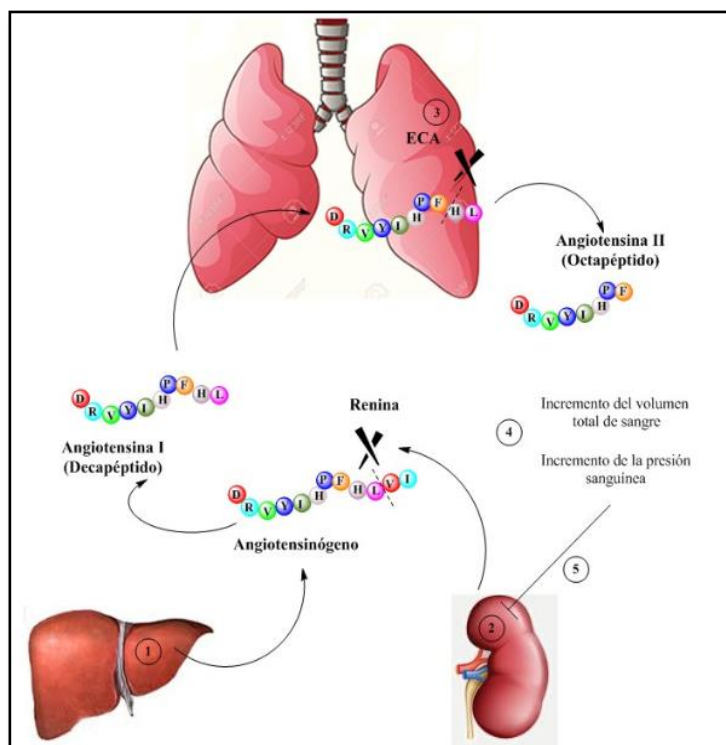


Figura 5. Esquema del sistema renina-angiotensina (SRA)

*convertidora de Angiotensina*), localizada en células endoteliales del pulmón, para formar Ang II. Dicha hormona tiene una variedad de efectos biológicos, los cuales actúan para regular la homeostasis cardiovascular, a través del incremento del volumen total de sangre circulante, y la presión sanguínea (4); además, tiene un papel clave en el control de la homeostasis renal, al favorecer la secreción de aldosterona. Una vez que

la presión arterial se restaura, el riñón detiene la producción de renina (5) (Balakumar y Jagadeesh, 2014). Ang II también está fuertemente implicada en enfermedades cardiovasculares, tales como hipertensión, aterosclerosis, e insuficiencia cardíaca (Higuchi et al., 2007). Además, tiene un papel catabólico importante sobre el tejido hepático, promoviendo la activación de la glucogenólisis (Arellano-Plancarte et al., 2010).

### **1.2.1 Mecanismo de señalización de la Ang II**

La Ang II ejerce sus funciones a través de la activación de AT<sub>1</sub>R, el cual está distribuido en todos los órganos, incluyendo el hígado, las glándulas adrenales, el cerebro, el intestino y el corazón. El receptor está conformado por 359 aminoácidos, y pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

La señalización de Ang II (Fig. 6), inicia cuando interacciona con el receptor, el cual se acopla a una proteína G ( $G\alpha_{q/11}$ ), activando a la fosfolipasa C (PLC), lo que genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los cuales están involucrados en la activación de distintas isoformas de PKC, por distintas vías. En la primera, PKC (isoformas de la familia de PKC nuevas) se activa directamente por DAG y no requiere de Ca<sup>2+</sup> intracelular; y en la segunda, el IP3 se une a su receptor/canal situado en el retículo endoplásmico, ocasionando la apertura del canal que permiten la salida del Ca<sup>2+</sup> al citoplasma, y junto con el DAG pueden activar a PKC (isoformas de la familia de PKC clásicas o convencionales). Estudios recientes han demostrado que PKC, puede fosforilar en residuos de Ser/Thr de IR e IRS-1, disminuyendo la señalización de la insulina.

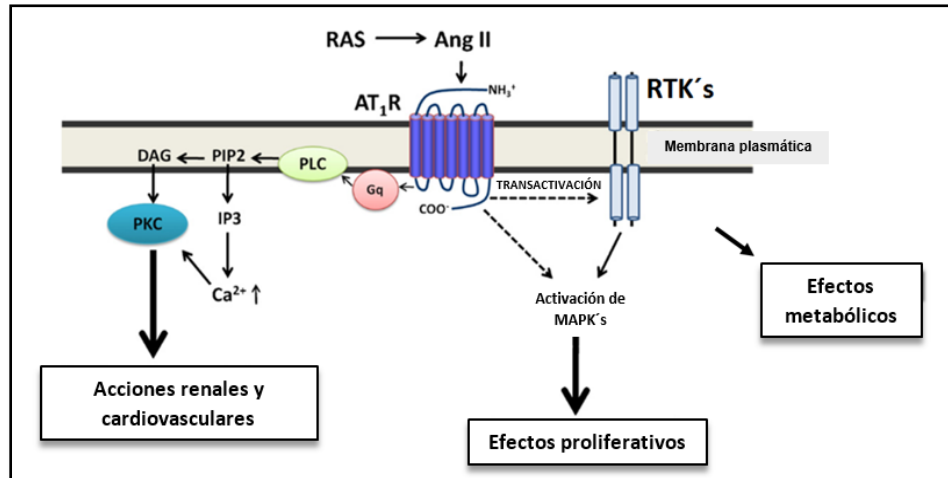


Figura 6. Vía de Señalización de la Ang II. Modificado de: Olivares-Reyes et al. (2009)

Por otra parte, se ha evidenciado que las proteínas G pequeñas, tales como Ras, Rho y Rac, involucradas en la regulación cardiovascular, son activadas tras la unión de Ang II a su receptor. Rac es un importante componente del complejo multienzimático NADPH oxidasa (NOX) para producir especies reactivas de oxígeno (ERO's) por Ang II en células de músculo liso vascular (VSMC) (Higuchi et al., 2007). Las ERO's generadas en respuesta al estímulo con Ang II tienen un papel importante en resistencia a la insulina (Wei et al., 2006).

### 1.3 Función de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's)

#### 1.3.1 Mecanismo de formación de ERO's

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) son productos parcialmente reducidos de reacciones oxidativas en las que las moléculas biológicas, tales como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, pierden electrones ( $e^-$ ) o átomos de hidrógeno, o ganan átomos de oxígeno. Dichas moléculas, consideradas como agentes nucleofílicos, tienen  $e^-$  susceptibles de compartir, es decir tienen  $e^-$  situados en orbitales superficiales que pueden ser capturados o compartidos por agentes oxidantes, los cuales son compuestos electrofílicos que tienen afección por estos  $e^-$ . De este modo, las ERO's son un subgrupo de moléculas oxidantes altamente reactivas

que pueden generar reacciones oxidativas en cadena (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009). A continuación, se representa un esquema general (Fig. 7) de la formación de las ERO's a partir de la interacción entre un agente nucleofílico (A-H) y un agente oxidante (O<sub>2</sub>):



Figura 7. Generación de las ERO's a partir de la reducción del oxígeno

### 1.3.2 Producción de ERO's

Las ERO's pueden ser generadas a partir de fuentes exógenas y fuentes endógenas:

- *Fuentes exógenas:* involucra múltiples factores externos como contaminantes del aire, humo de tabaco, radiaciones, alimentos, fármacos, xenobióticos, y agentes como quinonas, metales pesados [Pb, As, Hg, Cr, Cd, etc.], disolventes orgánicos, y pesticidas. Todos estos factores tienen un efecto directo o indirecto en funciones celulares (Bhattacharyya et al., 2014).
- *Fuentes endógenas:* Son dependientes de la activación de complejos multiproteicos, como la NADPH oxidasa (NOX), la lipoxigenasa, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, etc., y alteraciones en la actividad de los compartimentos celulares como el retículo endoplásmico (que induce la síntesis de proteínas malformadas), la cadena respiratoria mitocondrial, y los peroxisomas, en el cual se da la degradación de cadenas largas de ácidos grasos (Fig. 8) (Holmström y Finkel, 2014).

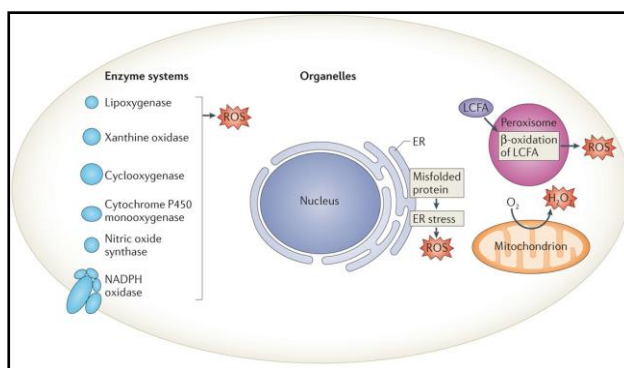


Figura 8. Fuentes endógenas de las ERO's (Holmström y Finkel, 2014)



### 1.3.3 Mecanismo de activación de NADPH Oxidasa (NOX)

Una fuente importante de las ERO's son las generadas a partir de la familia de la NOX. Esta familia fue descrita inicialmente en neutrófilos, los cuales son activados por varios mediadores inflamatorios y producen una gran cantidad de ERO's, como parte de su papel esencial en la defensa del huésped. Distintos ensayos han permitido la detección de bajos niveles de ERO's a nivel intracelular en células no fagocíticas; estos experimentos sugieren que una amplia variedad de ligandos, tales como TNF- $\alpha$ , Ang II, PDGF, EGF, insulina, entre otros, pueden incrementar rápidamente los niveles de ERO's (Holmström y Finkel, 2014).

NOX es un complejo multienzimático que consta de 6 subunidades proteicas, y requieren ensamblarse para poder activarse (Fig. 9) (Garrido y Griending, 2009).

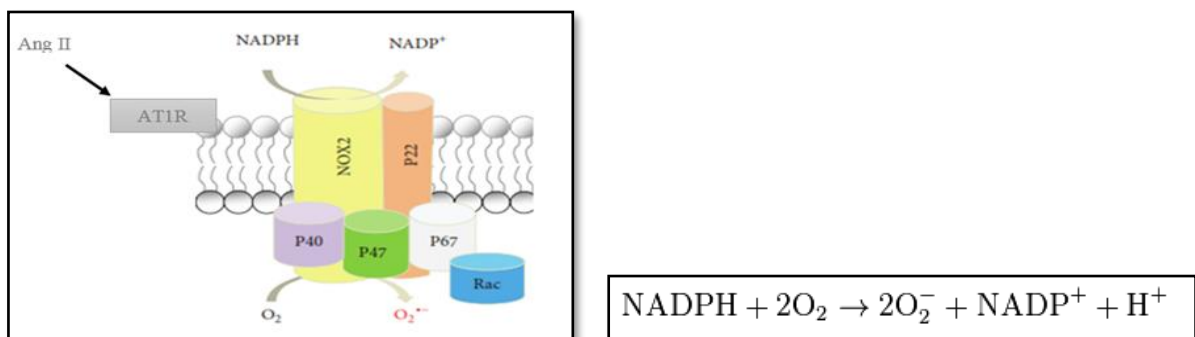


Figura 9. Complejo activado de la NOX por Ang II y su ecuación representativa

En el estado no activo del complejo, las subunidades están distribuidas de la siguiente manera:

- En la membrana celular se localizan las subunidades **p22<sup>phox</sup>** y **gp91<sup>phox</sup>**, las cuales son proteínas integrales de membrana, y forman un heterodímero [flavocitocromo b<sub>558</sub>], que constituye el *core* catalítico de la enzima.
- En el citoplasma se localizan las subunidades **Rac**, una proteína G pequeña, **p67<sup>phox</sup>**, la cual contiene un dominio esencial para la transferencia de e<sup>-</sup> a través del centro (REDOX) del flavocitocromo b, **p47<sup>phox</sup>**, la cual funciona como una proteína reguladora la cual media la unión de p67<sup>phox</sup> a b<sub>558</sub>, y **p40<sup>phox</sup>**, la cual puede regular negativamente la actividad del complejo por fosforilación.

### 1.3.4 Efectos biológicos de las ERO's

Las ERO's son bioproductos del metabolismo celular normal. A bajas y moderadas concentraciones, tienen efectos benéficos sobre procesos fisiológicos como cicatrización de heridas, reparación en los tejidos, diferenciación celular, proliferación, fagocitosis, muerte de patógenos invasores, metabolismo, reacciones inflamatorias, etc. (Bhattacharyya et al., 2014); y a altas concentraciones se encuentran involucradas en diversas patologías (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Diversos estudios han sugerido que las ERO's actúan como moléculas esenciales de señalización, y pueden estar involucradas en la regulación de receptores con actividad intrínseca de cinasa de Tyr, tales como el IR (Besse-Patin y Estall, 2014) o el EGFR, a través de dos mecanismos en los cuales las ERO's, específicamente el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), reacciona con el grupo tiol ( $-SH$ ) de cisteínas para formar ácido sulfénico, disulfuro, ácido sulfínico o ácido sulfónico (Garrido y Griendling, 2009).

- En el primer mecanismo, el  $H_2O_2$  formado por la activación de NOX inducido por Ang II, puede oxidar e inactivar PTPs formando puentes disulfuro, lo cual mejora la vía de señalización de la familia de receptores RTK's (Garrido y Griendling, 2009; Truong y Carroll, 2012).
- En el segundo mecanismo cuando el receptor se activa por la unión a su ligando (ej. EGF), se promueve la formación de  $H_2O_2$  vía NOX2, el cual directamente modifica al receptor en un residuo específico de cisteína (Cys797 para el receptor de EGF), formando ácido sulfénico en el sitio activo del receptor, dando lugar al mejoramiento de su actividad de cinasa de Tyr (Truong y Carroll, 2012).

Otros reportes han sugerido que las ERO's tienen un papel regulador sobre la proteína cinasa Src, favoreciendo su activación mediante la oxidación de las cisteínas 245 (en el dominio SH2) y 487 (en el dominio catalítico), dando lugar a la formación de enlaces disulfuro y un incremento en su actividad de cinasa (Corcoran y Cotter, 2013).

Por otro lado, complicaciones diabéticas en distintos órganos surgen de elevados niveles de glucosa y posiblemente de ácidos grasos, efecto mediado por el incremento

en la producción de las ERO's (Fig. 10) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN's). Las ERO's y las ERN's directamente oxidan y alteran el DNA, lípidos y proteínas, mediante la activación de múltiples vías sensibles a estrés celular, tales como la vía del factor nuclear  $k\beta$ , del p38 (proteína cinasa activada por mitógenos), JNK, entre otras. Además, distintos estudios han reportado que en DM2, el efecto provocado por las especies oxidativas conduce a resistencia a la insulina y daños en la secreción de insulina por la disfunción de las células  $\beta$ -pancreáticas (Calderón-Salinas et al., 2013; Evans et al., 2003; Ceriello, 2000).

Además, cuando se manifiesta un aumento crónico en la producción de las ERO's, asociado con la disminución del nivel antioxidante intracelular, conlleva a la generación de estrés oxidativo. Esta alteración, a nivel molecular, puede promover un incremento en la activación de cinasas de Ser/Thr, como JNK y PKC, las cuales fosforilan proteínas IRS-1 en Ser/Thr, lo que podría acelerar su degradación, mecanismo por el cual se conduce a la desensibilización en las acciones de la insulina (Evans et al., 2005).

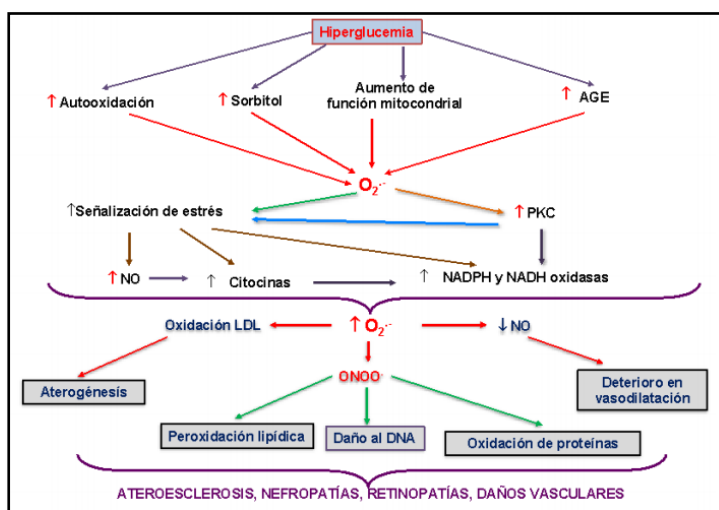


Figura 10. Efecto del estrés oxidativo generado por el incremento de glucosa en la sangre. Se observa el incremento en la producción de las ERO's y los efectos patológicos que pueden generarse en respuesta al estrés oxidativo, tales como aterosclerosis, nefropatías, retinopatías y daños vasculares (Calderón-Salinas et al., 2013)

Por otra parte, se ha reportado que Ang II está implicada en la patogénesis de complicaciones vasculares de la resistencia a la insulina, por un mecanismo

dependiente del incremento en la producción de las ERO's, de tal manera que diversas investigaciones proponen el uso de antioxidantes para prevenir sus efectos.

#### 1.4 Efectos biológicos de los antioxidantes

Los antioxidantes (AOX-H) son considerados como inhibidores de los procesos de oxidación, incluso a concentraciones relativamente bajas tienen un papel fisiológico en los seres vivos. Actúan como captadores de radicales libres, y favorecen la conversión de radicales libres (R') a especies menos reactivas (RH) (Mandal et al., 2009), como se representa en la siguiente figura (Fig. 11):

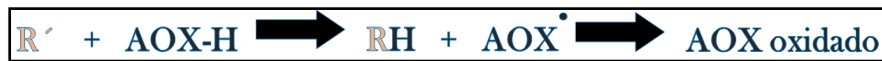


Figura 11. Mecanismo general de los antioxidantes

La propia célula ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante para contrarrestar el estrés oxidativo provocado por alteraciones metabólicas. El sistema antioxidante incluye *sistemas enzimáticos* y *no-enzimáticos*. El primer sistema está constituido por SOD (*superóxido dismutasa*), CAT (*catalasa*), GR (*glutación reductasa*), entre otros. Y el segundo sistema está conformado por GSH (glutación reducido), vitamina C (ácido ascórbico),  $\alpha$ -tocoferol, etc. (Mandal et al., 2009). Respecto a los antioxidantes que ingresan al organismo sólo a través de la dieta, se clasifican esencialmente, en vitaminas antioxidantes, como vitaminas C y E, carotenoides, polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no-flavonoides, y compuestos con grupos azufrados. Una gran variedad de agentes antioxidantes se encuentra en fuentes naturales, tales como los extractos vegetales y sus derivados, y son sintetizados a partir de los productos de la glucólisis, tales como el fosfoenolpiruvato y el acetil-CoA (Quiñones et al., 2012).

Los antioxidantes empleados en el presente trabajo fueron el resveratrol (RSV) y el N-acetilcisteína (NAC) de los cuales se hará una descripción sobre su estructura y funciones.

### 1.4.1 Características biológicas del Resveratrol (RSV)

El resveratrol (3,4',5 trihidroxiestilbeno), está conformado por dos anillos aromáticos conectados por un enlace estireno (un anillo de benceno con un sustituyente etileno, lo cual lo hace pertenecer al subgrupo de los estilbenos) (Fig. 12); el RSV es

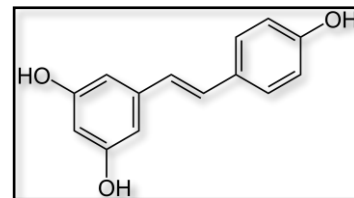


Figura 12. Estructura molecular del RSV

parte de la familia de los polifenoles, los cuales corresponden a sustancias no energéticas presentes en el vino tinto, y en los alimentos de origen vegetal, especialmente en la uva roja y en las bayas.

En diversos estudios se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. El RSV tiene la capacidad de modular la actividad de diferentes enzimas, e interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, y esto puede deberse, en parte, a sus características fisicoquímicas que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción, y en efecto, esto justifica muchos de sus efectos benéficos (Perez-Vizcaino et al., 2009; Pervaiz y Holme, 2009).

### 1.4.2 Características biológicas del N-acetilcisteína (NAC)

El N-acetilcisteína (NAC) es un derivado de la cisteína con un grupo acetil unido a un átomo de nitrógeno (Fig. 13). El NAC es un fármaco y precursor del glutatión reducido (GSH), que tiene propiedades antioxidantes que reaccionan rápidamente con

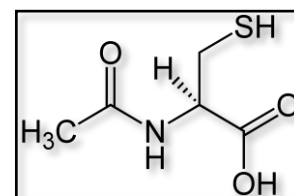


Figura 13. Estructura molecular del NAC

radicales libres, inhibiendo directamente a las ERO's a través del potencial reductor de su grupo *tiol*, o indirectamente por el incremento de los niveles de GSH localizado intracelularmente, el cual tiene la capacidad de restaurar un sistema fuertemente oxidado.

En distintas dosis, el NAC se ha utilizado en prácticas terapéuticas como un agente mucolítico en pacientes con fibrosis cística, para el tratamiento de intoxicaciones inducidas por pesticidas, para sistemas deficientes de glutatión en un gran rango de desórdenes metabólicos, enfermedades pulmonares, y estados patológicos de neurotoxicidad, hepatotoxicidad, bronquitis, etc. (Samuni et al., 2013; Elbini-Dhouib et al., 2016). Biológicamente, se ha mostrado que el NAC tiene efecto antioxidante y anti-apoptótico, mediante la reducción de los niveles del ion superóxido ( $O_2^-$ ) localizado intracelularmente. Este mecanismo está asociado en la expresión génica, en la regulación del ciclo celular y en la apoptosis (Samuni et al., 2013).

## 2. ANTECEDENTES

A continuación, se describirán algunos de los trabajos que dan soporte a los mecanismos de regulación de las acciones de insulina por Ang II en células de origen hepático; además, se indicarán evidencias experimentales que fundamentan la participación de Ang II en la producción de las ERO's a través de la activación de NOX, y finalmente, cómo este mecanismo media las acciones de la insulina. Para ello se requiere conocer el efecto de los antioxidantes como sustancias que inhiben los procesos de oxidación, los cuales modulan de alguna manera la vía de señalización de la insulina y Ang II.

### 2.1 Mecanismos asociados al desarrollo de resistencia a la insulina

A nivel molecular, los tejidos muscular, hepático y adiposo, son los más afectados debido a la sobrecarga de acumulación de lípidos y otros factores, dando lugar a un estado de resistencia a la insulina, en el que uno de los efectos estudiados es la reducción del número total de receptores de insulina; además, el exceso de ácidos grasos activa los receptores TLR (*Toll-like receptors*) sobre los macrófagos residentes de tejido adiposo, promoviendo la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), la activación de cinasas PKC, y la regulación de la

fosforilación en residuos de Tyr de receptores de insulina. Estos mecanismos promueven la desensibilización en la señalización de la insulina, debido a que la activación de distintas isoformas de PKC, fosforilan a IRS-1 en diferentes residuos de Ser, como la Ser<sup>307</sup>, que altera la asociación entre IRS-1 y PI3K, causando degradación proteosomal de IRS-1 e IRS-2 (Gual et al., 2005). Estos eventos inhiben la señalización de insulina, así como la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa inducida por insulina. En respuesta a la desensibilización se activan factores transcripcionales como SREBP-1c (proteínas de unión a elementos reguladores de estero), dando lugar a la disminución de los niveles de IRS-2. Río abajo en la señalización de insulina, son alteradas las subunidades p110/p85 de PI3K inhibiendo la dimerización de la enzima, y por consiguiente, esto reduce su actividad.

Otro elemento característico involucrado en resistencia a la insulina es la participación de las proteínas SOCS (proteína supresora de la señalización por citocinas). Su expresión se induce por acción de la insulina en diferentes tejidos y líneas celulares. SOCS son capaces de inhibir las acciones de la insulina al actuar a través de tres mecanismos: (1) mediante la inhibición de la fosforilación en Tyr de IRS, debido a que compiten por el mismo sitio de interacción en el receptor de insulina, (2) al promover la degradación proteosomal de IRS, y (3) por la inhibición de la actividad de cinasa del receptor de insulina bloqueando su señalización (Lebrun y Van Obberghen, 2008). La resistencia a la insulina también puede ser debida a un incremento en la actividad, así como en la expresión de las enzimas que normalmente revierten las acciones de insulina, incluyendo a las fosfatasas de Tyr (PTP-1B, PTEN, SHIP). Todos estos eventos conducen a una reducción en la activación de proteínas clave en la señalización de insulina como son la cinasa Akt (Cho et al., 2001) e isoformas atípicas de PKC, y en la reducción concomitante en la captación de glucosa y síntesis de glucógeno estimulada por insulina (Patel et al., 2015).

Como ya se describió, agentes como el TNF- $\alpha$  y otras citocinas, los ácidos grasos libres y sus metabolitos, y alteraciones metabólicas, han sido implicados en inducir resistencia a la insulina. Además, diversos estudios sugieren que hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagón y la Ang II, y hormonas secretadas por el

tejido adiposo como la resistina (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008), también están involucradas en la desensibilización de la señalización de insulina. Particularmente, Ang II causa resistencia a la insulina, a partir de promover la fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas IRS, causando la disociación entre IRS y el receptor, el bloqueo de sitios de fosforilación en Tyr de IRS, y la degradación proteosomal de IRS (Olivares-Reyes et al., 2009). De manera general muchas investigaciones, basadas en estudios en pacientes, animales, y en modelos celulares proponen que un aumento en la fosforilación de residuos de Ser/Thr en las proteínas IRS-1 (Fig. 14), inducido por un estímulo prolongado de insulina y otros estímulos tales como Ang II, TNF- $\alpha$ , ácidos grasos libres, triglicéridos, endotelina-1 y estrés celular, juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina (Olivares-Reyes et al., 2009).

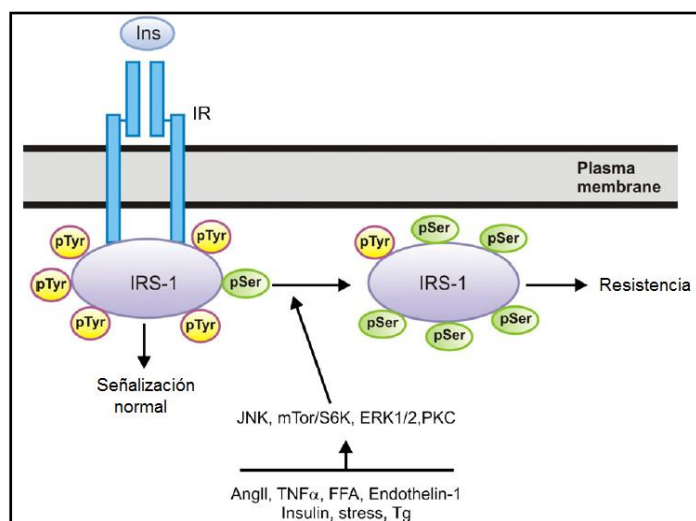


Figura 14. Fosforilación en Ser/Thr de IRS-1 inducido por estímulo prolongado de insulina y otros estímulos tales como Ang II, TNF- $\alpha$ , ácidos grasos libres (FFA), triglicéridos (Tg), Endotelina-1 y estrés celular. Modificado de: Olivares-Reyes et al. (2009)

## 2.2 Participación de Ang II en el desarrollo de resistencia a la insulina

Como ya se mencionó, Ang II está involucrada en la regulación de las acciones de insulina promoviendo fosforilación en residuos de Ser de IRS-1. De este modo, se ha demostrado que en células hepáticas C9, Ang II puede inhibir la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> y Thr<sup>308</sup>, y su sustrato río abajo GSK-3 inducida por insulina, por la fosforilación



en la Ser<sup>636/639</sup> de IRS-1 (Fig. 15). Lo anterior se debe a un mecanismo de transactivación del receptor de EGF, conduciendo a la activación de la vía PI3K/ERK 1/2/mTOR/S6K-1, en la que S6K-1 tiene un función importante en la fosforilación y degradación de IRS-1, el cual perjudica la activación de PI3K y Akt inducida por insulina (Arellano-Plancarte et al., 2010; Boura-Halfon y Zick, 2009).

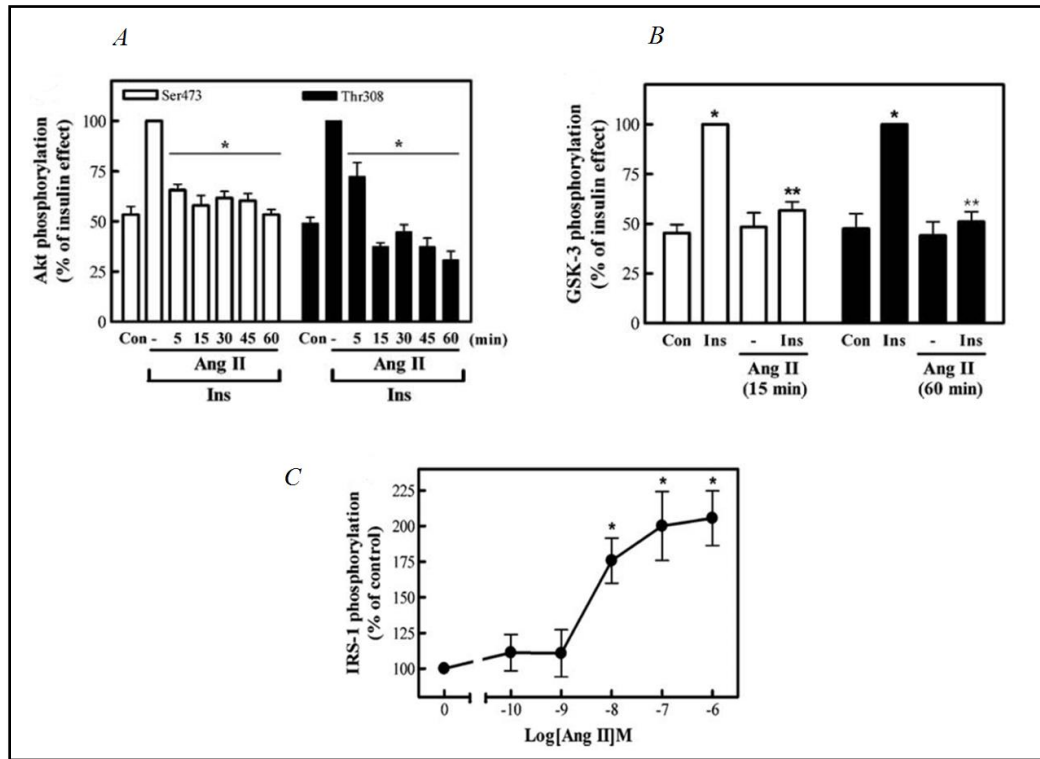


Figura 15. Efecto de la Ang II en la señalización de la insulina en C9 (A) Efecto de Ang II en la fosforilación de Akt (B) Efecto de Ang II en la fosforilación de GSK-3 (C) Efecto de Ang II en la fosforilación de IRS-1 en Ser<sup>636/639</sup> (Arellano-Plancarte et al., 2010)

Por otro lado, también se ha estudiado que la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II tiene un papel importante en la regulación de la señalización de insulina (Fig. 16) (Arellano-Plancarte et al., 2010; Izawa et al., 2005; Eringa et al., 2004). Estudios clínicos sugieren una relación entre hipertensión y resistencia a la insulina, y en la línea celular VSMC se reportó, mediante el uso de PD98059, un inhibidor de MEK, que la activación de ERK 1/2 inducida por Ang II inhibe la captación de glucosa dependiente de insulina y sus mecanismos moleculares, a través de la fosforilación en Ser<sup>307</sup> y Ser<sup>616</sup> de IRS-1 (Izawa et al., 2005).

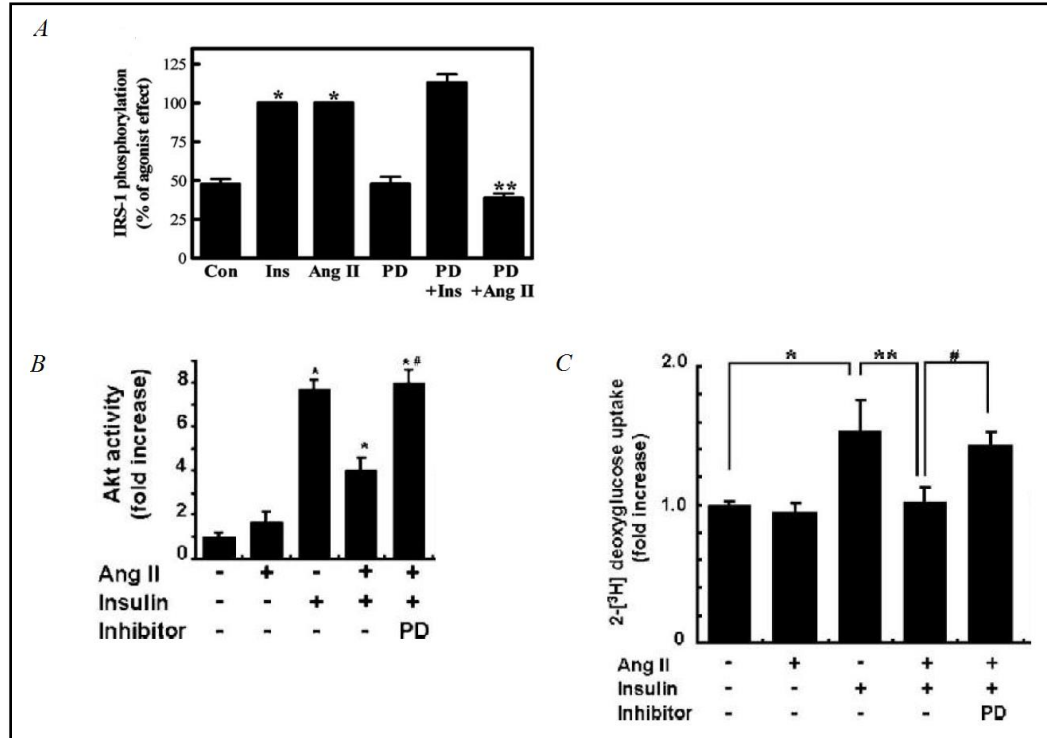


Figura 16. La activación de ERK1/2 está implicada en la regulación de las acciones de insulina (A) La Inhibición de la activación de ERK 1/2 inducida por Ang II reduce completamente la fosforilación de IRS-1 en C9 (Arellano et al., 2010) (B-C) La inhibición de la activación de ERK 1/2 revierte el efecto provocado por Ang II, favoreciendo la activación de Akt y la captación de glucosa dependiente de insulina en VSMC (Izawa et al., 2005)

Por lo tanto, Ang II tiene un papel importante en resistencia a la insulina a través de diversos mecanismos, uno de ellos dependiente de la transactivación de EGFR.

### 2.3 Papel de la formación de ERO's por Ang II en resistencia a la insulina

Se ha mostrado una función de las ERO's en la vía de señalización de Ang II, así como de otros receptores para factores de crecimiento, tales como PDGF y EGF; el tratamiento en VSMC con Ang II incrementa la producción de  $O_2^-$  (ion superóxido) a través de promover la activación de NOX (Fig. 17) (Ichiki et al., 2001; Nickenig et al., 2000; Griendling et al., 1994)

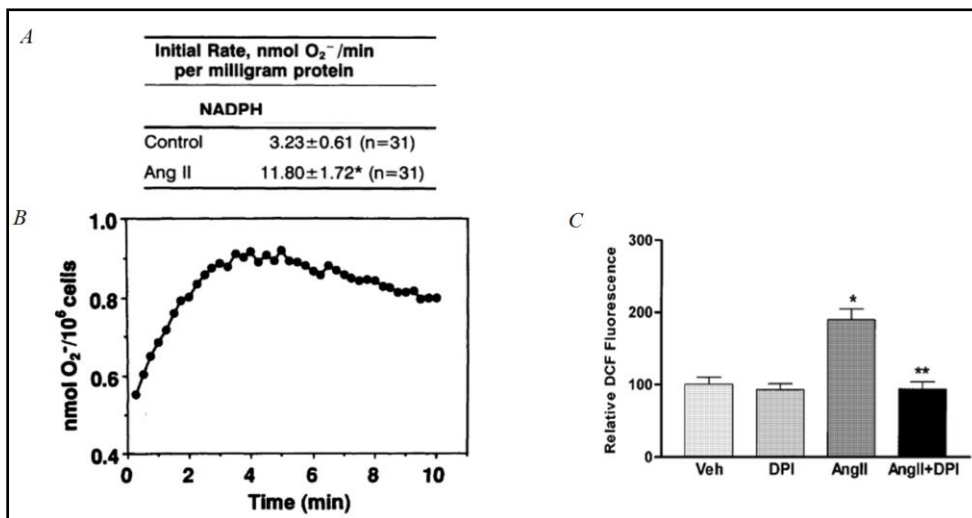


Figura 17. Ang II promueve la formación de ERO's a través de la activación de NOX (A) Efecto de Ang II en la actividad de NOX en VSMC (B) Formación del ion superóxido inducido por Ang II en VSMC (Griendling et al., 1994) (C) Cuantificación de liberación de radicales libres inducido por Ang II visualizado a través de DCF fluorescente [Marcador de ERO's] en VSMC (Nickenig et al., 2000)

En tejido de músculo esquelético y vascular, se ha demostrado la importancia de las ERO's en el desarrollo de diferentes enfermedades en las cuales Ang II es un componente central (Garrido y Griendling, 2009). Ang II inhibe las acciones de insulina a través de promover la activación de RhoA, una proteína G pequeña, y el incremento en la producción de las ERO's, factores que inhiben la señalización de PI3K/Akt dando lugar a la reducción en la producción de óxido nítrico en células endoteliales, y a la disminución del transporte de glucosa en el músculo esquelético (Sowers, 2004).

Además, en VSMC, Ang II induce degradación de IRS-1 (Fig. 18), a través de la fosforilación en Ser<sup>307</sup> por PDK1, evento mediado por las ERO's que son generadas tras la unión de Ang II a su receptor, las cuales regulan la activación de Src, una cinasa que fosforila y activa a PDK1 en la Tyr<sup>9</sup> (Taniyama et al., 2005). En músculo esquelético (L6 miotubos) (Fig.

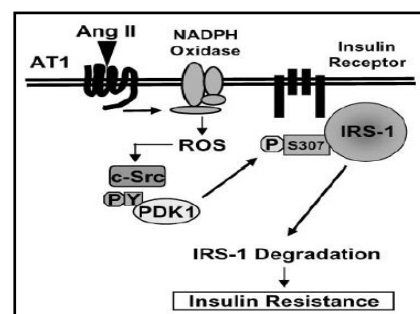


Figura 18. Mecanismo molecular de resistencia a la insulina inducida por Ang II en VSMC (Taniyama et al., 2005)

19) se sugiere que las ERO's generadas por Ang II participan en la inhibición de la señalización de la insulina, a partir de la disminución en la activación y fosforilación de

IRS-1 en Tyr, y de Akt en Ser<sup>473</sup>, efectos revertidos por *losartán*, *apocinina* y el *siRNA* de *p47* (Wei et al., 2006).

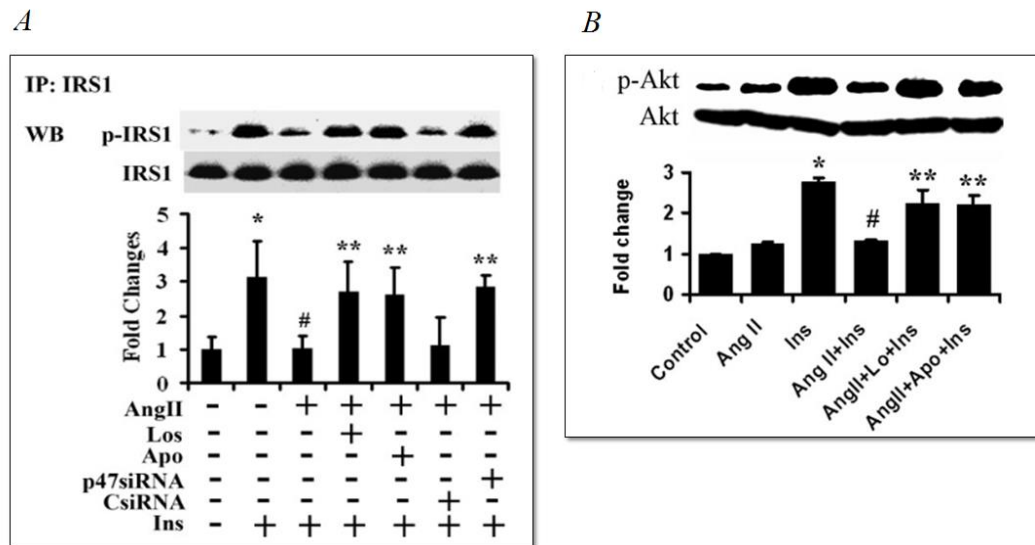


Figura 19. Efecto de las ERO's generadas por Ang II en la señalización de la insulina en L6 (Wei et al., 2006)

Estos y otros estudios ponen de manifiesto el interés de evaluar la participación de los antioxidantes como agentes que reducen las especies oxidativas, pasándolas a un estado químicamente neutro, con el fin de prevenir sus efectos en las acciones de la insulina.

## 2.4 Efecto de los antioxidantes

Evidencias experimentales y clínicas reportan el beneficio de los antioxidantes y su rol para prevenir efectos tóxicos del estrés oxidativo durante estados de hiperglicemia y DM2, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares y restaurando la sensibilización a la insulina a través de proteger a las células de acumulación lipídica y otros factores. El resveratrol (RSV) tiene varios efectos metabólicos dependientes de la dosis, sin embargo, la capacidad del antioxidante para modular la señalización de la insulina no ha sido ampliamente estudiada; en la línea celular 3T3-L1, se encontró que el RSV inhibió la fosforilación de IRS-1 en Tyr<sup>612</sup> y la activación de Akt en Ser<sup>473</sup> inducida por insulina. En condiciones de resistencia a la insulina (Fig. 20), el RSV

redujo la expresión de la *sintasa de óxido nítrico*, la degradación de la proteína  $I\kappa B\alpha$ , y mejoró la fosforilación de Akt inducida por insulina en tejidos sensibles a la insulina de ratones alimentados con dosis alta en grasa. Con estos resultados, se pudo mostrar que el RSV mejora las acciones de la insulina únicamente bajo condiciones resistentes a la insulina, sugiriendo que el efecto del RSV puede depender del tipo de tejido y su estado metabólico (Kang et al., 2012).

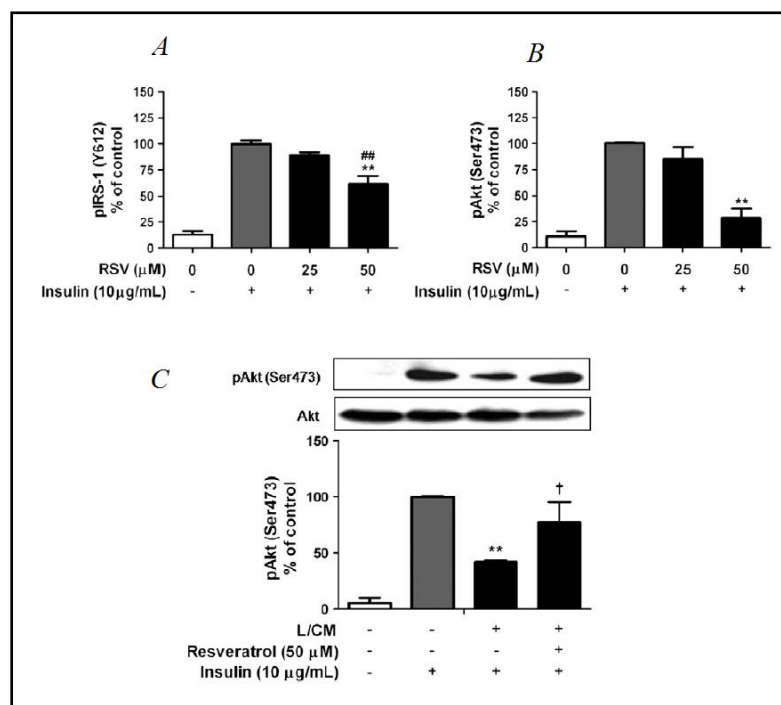


Figura 20. Efecto divergente del RSV en la señalización de insulina en adipocitos (A-B) Efecto inhibitorio del RSV en la fosforilación de IRS-1 en Tyr<sup>612</sup> y de Akt en Ser<sup>473</sup> inducida por insulina en adipocitos normales (C) Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducido por insulina en adipocitos con resistencia a la insulina (Kang et al., 2012)

Otro antioxidante empleado es el NAC, el cual ha mostrado capacidad para prevenir los efectos tóxicos del estrés oxidativo durante la diabetes y ha sido propuesto como un tratamiento complementario para mejorar procesos inflamatorios; además, tiene un papel importante en las primeras etapas de resistencia a la insulina. En cultivos celulares se ha indicado que el NAC tiene efectos anti-apoptóticos mediados por las ERO's. Diferentes evidencias han mostrado que la regulación negativa de la apoptosis por NAC no es muy clara y depende del tipo celular y estímulo específico (Samuni et al., 2013). Muchos reportes señalan que el NAC afecta varias vías de señalización y

de expresión génica, y directamente modula la actividad de factores transcripcionales *in vitro* e *in vivo*.

En ratas diabéticas, el NAC regula río arriba las vías de PI3K/Akt y JNK2/STAT3; además, mejora la activación de Akt, STAT3 y eNOS (*sintasa de óxido nítrico endotelial*) y el incremento de la producción de NO (óxido nítrico) en tejido cardiaco, sugiriendo que la activación de Akt y STAT3 representa el mejor mecanismo por el cual NAC atenúa las complicaciones diabéticas (Wang et al., 2013). Con relación a los trabajos enfocados en la regulación de la vía de señalización de la insulina, en adipocitos 3T3-L1 (Fig. 21) se empleó el NAC como antioxidante para prevenir el efecto inhibitorio de IGF-1 en las acciones de la insulina a través de la formación de las ERO's vía NOX, lo cual afecta el estado de fosforilación de IRS-1 y la captación de glucosa inducida por insulina (Fukuoka et al., 2010).

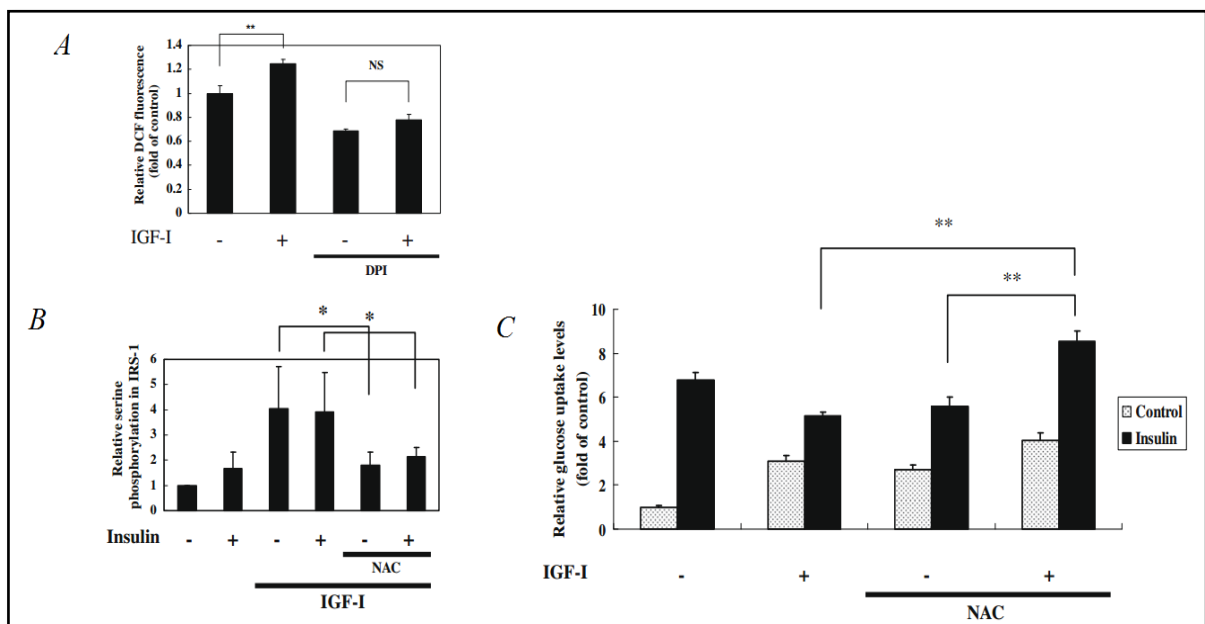


Figura 21. NAC restaura la inhibición de las acciones de la insulina promovida por las ERO's en 3T3-L1 (A) Formación de ERO's inducida por IGF-1 por DCF fluorescente (B) Estado de fosforilación de IRS-1 en Ser<sup>307</sup> regulada por IGF-1 e inhibida por NAC (C) Tratamiento con NAC restaura la inhibición inducida por IGF-1 de la captación de glucosa dependiente de insulina (Fukuoka et al., 2010)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Como se resumió en los antecedentes, se ha demostrado que en el sistema cardiovascular y en músculo esquelético, Ang II puede modular negativamente la activación de la vía de señalización de insulina mediante la formación de las ERO's vía NADPH oxidasa; este efecto puede ser prevenido por la acción de distintos antioxidantes, los cuales donan electrones a las especies oxidativas para dejarlas químicamente neutras.

Sin embargo, en tejidos de alta demanda metabólica como el hepático no se han definido claramente los mecanismos moleculares por los cuales las ERO's generadas por Ang II, pueden regular la vía de señalización de insulina, y en consecuencia sus efectos metabólicos. Por otra parte, tampoco se ha dilucidado cuál es el efecto que ejercen los antioxidantes, tales como el RSV y el NAC, en las vías de señalización de la insulina y Ang II.

Por este motivo, como trabajo inicial, se propone evaluar el efecto de los antioxidantes en la activación de proteínas involucradas en la señalización de la insulina y Ang II, en células de origen hepático C9.

### **4. HIPÓTESIS**

A partir de la justificación, y con base en los antecedentes mencionados, se propone que en células de origen hepático, la Ang II induce la formación de ERO's a través de la activación de NADPH oxidasa, las cuales generarán resistencia a la insulina, condición que será prevenida por el tratamiento con distintos antioxidantes, tales como el RSV y NAC.

## 5. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de los antioxidantes (RSV y NAC), en la señalización de la insulina y Ang II en células de origen hepático C9.

Para cumplir este objetivo general, se plantearon como objetivos específicos:

- Evaluar la respuesta de insulina y Ang II en la línea celular hepática C9
- Establecer las condiciones por las que Ang II induce resistencia a la Insulina
- Determinar el efecto “*per se*” del RSV y del NAC en la señalización de insulina y Ang II
- Evaluar la respuesta de insulina y Ang II en presencia de los antioxidantes.



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Cultivo celular

Se empleó como modelo de estudio la línea celular C9 obtenida de ATCC, correspondiente a células aisladas de un tejido hepático normal de ratas macho “*Sprague-Dawley*”, con morfología epitelial; y se utilizó para el estudio de las acciones de insulina y Ang II, mediadas a través de sus receptores IR y AT<sub>1</sub>, respectivamente. Las células se cultivaron en medio F12-K suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10% *v/v*, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin, 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de penicilina, y 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B a 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>.

Para todos los experimentos, las células se usaron entre los pasajes 3 al 12, debido a que durante estos pasajes la línea celular presenta la máxima expresión endógena del receptor AT<sub>1</sub> (Arellano-Plancarte et al., 2010; Olivares-Reyes et al., 2005). Para cada ensayo se sembraron las células en cajas de cultivo de 6 pozos, en las cuales se les distribuyó por pozo de  $1 \cdot 10^5$  a  $1.2 \cdot 10^5$  células, para obtener una confluencia del 70 al 80%.

### 6.2 Tratamientos

Para cada ensayo, se utilizaron cultivos con una confluencia entre 70 – 80%. Antes del experimento, se les retiró el medio y se les cambió a medio libre de suero durante 6 horas más. Con la finalidad de evaluar el efecto de los antioxidantes en la vía de señalización de insulina y Ang II, los ensayos se dividieron en tres fases (Tabla no. 2): en la primera etapa se determinó la respuesta de la línea celular al estímulo con insulina y Ang II; en la segunda etapa se establecieron las condiciones por las cuales Ang II induce resistencia a la insulina, y en la tercera, se evaluaron los efectos del RSV y del NAC en ausencia y presencia de los estímulos hormonales, como condición inicial para prevenir el efecto provocado por Ang II en las acciones de la insulina.

Tabla 1. Estrategia experimental

| Fase 1  |  | Fase 2  |                              | Fase 3   |  |
|---|--|---|------------------------------|--|--|
| Efecto de la insulina en la fosforilación de Akt, y Ang II en la fosforilación de ERK 1/2 |  | Efecto de Ang II en la señalización de insulina |                              | Efecto del RSV y NAC en la señalización de insulina y Ang II |  |
| <b>Proteínas fosforiladas a evaluar</b>   |  |   |                              |  |  |
| Akt en Ser <sup>473</sup>   | ERK 1/2 en Thr <sup>202</sup> y Tyr <sup>204</sup> | Akt en Ser <sup>473</sup>                       | GSK-3 en Ser <sup>21/9</sup> | Akt en Ser <sup>473</sup>                                    | ERK 1/2 en Thr <sup>202</sup> y Tyr <sup>204</sup> |

### 6.3 Fin del experimento

Una vez terminados los tratamientos, se detuvo la reacción en frío, y se lavaron los pozos con buffer de fosfatos (PBS) frío (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.4). Las células se lisaron con buffer de lisis Laemli 1X (SDS 20% - protein gel loading solution 2x [Quality Biological Inc.], β-mercaptoetanol 10%, y agua), con el fin de preparar las muestras para obtener la proteína de interés mediante la técnica de western blot.

### 6.4 Ensayos de inmunoblot

Las muestras se sonicaron utilizando pulsos de 40 Khz durante 20 segundos por muestra (Sonics Vibra Cell, Ultrasonic processor), se calentaron a 99°C durante 5 minutos (Termomixer Comfort eppendorf), y se centrifugaron a 14,500 rpm durante 5 minutos (MiniSpin PLUS eppendorf). Los sobrenadantes se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 10% con buffer de corrida (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%) a 120 Volts. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas polivinilideno difluoruro (PVDF) en un sistema de transferencia semi-seco a 15 Volts., durante 1 hora, empleando buffer de transferencia (tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%).

Las membranas se bloquearon empleando leche sin grasa (Blotto, non-fat dry milk Santa Cruz Biotechnology) al 5% en TBS-Tween 0.1% (tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, Y Tween 20 0.1%, pH 7.5) para detectar a pAkt Ser<sup>473</sup>, pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> y pGSK-3 $\alpha/\beta$  Ser<sup>21/9</sup>, y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios, toda la noche a 4°C y con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente. También se detectaron las proteínas totales de Akt, ERK 1/2 y GSK-3 $\alpha/\beta$  y la actina, como un control de carga. Al término de cada incubación tanto con el anticuerpo primario como secundario, las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos con buffer TBS-Tween 0.1%.

Todos los anticuerpos secundarios están acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). En la tabla 3, se hace mención de las características de cada uno de los anticuerpos utilizados. Finalmente, los blots fueron revelados utilizando un kit de detección de quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Analysis System). Las placas fueron escaneadas utilizando el densitómetro escáner GS-800 (Calibrated Densitometer), y las bandas fueron cuantificadas utilizando el programa Quantity One (BIORAD).

Tabla 2. Anticuerpos empleados y sus características

| Anticuerpo                              | Dilución | Medio del Solvente | Especificidad  |
|---|----------|--------------------|--|
| <b>p-Akt473</b>                         | 1:6000   | leche 5% TBST 0.1% | Detecta Akt2 cuando está fosforilada en la Ser <sup>473</sup>                              |
| <b><math>\alpha</math> -sec-rabbit</b>  | 1:13000  | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b>p-ERK 1/2</b>                        | 1:15000  | TBST 0.1%          | Detecta la forma fosforilada en la Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> de la MAP cinasa |
| <b><math>\alpha</math> -sec-rabbit</b>  | 1:24000  | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b>p-GSK-3<math>\alpha/\beta</math></b> | 1:5000   | leche 5% TBST 0.1% | Detecta a GSK-3 cuando está fosforilada en Ser <sup>21/9</sup>                             |
| <b><math>\alpha</math> -sec-rabbit</b>  | 1:5000   | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b>Erk2 rotal</b>                       | 1:12000  | leche 5% TBST 0.1% | Detecta los niveles totales de ERK 2   |
| <b><math>\alpha</math> -sec-rabbit</b>  | 1:22000  | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b>Akt 1,2,3 total</b>                  | 1:5000   | leche 5% TBST 0.1% | Detecta los niveles totales de Akt 1,2,3   |
| <b><math>\alpha</math> -sec-rabbit</b>  | 1:8000   | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b>GSK-3</b>                            | 1:6000   | leche 5% TBST 0.1% | Detecta los niveles totales de GSK-3   |
| <b><math>\alpha</math> -sec-mouse</b>   | 1:8000   | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b><math>\alpha</math> -actin</b>       | 1:10000  | leche 5% TBST 0.1% |  |
| <b><math>\alpha</math> -sec-mouse</b>   | 1:13000  | leche 5% TBST 0.1% |  |

## 6.5 Análisis estadístico

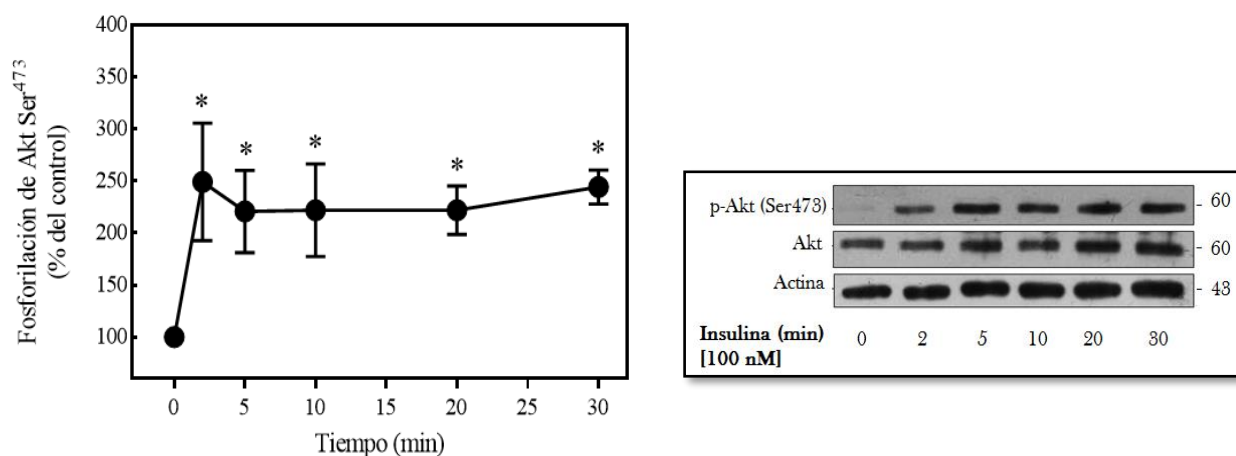
Para cuantificar los datos obtenidos de la densidad de las bandas se analizaron en el programa *GradPad Prism6.0* en donde se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y post-test Dunnett. En todos los casos se consideró una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa. Los datos obtenidos fueron graficados y expresados como promedio  $\pm$  estándar de la media (SEM) de por lo menos tres o seis experimentos realizados por separado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de Insulina en la fosforilación de Akt

El objetivo de la primera fase fue determinar la respuesta al estímulo con insulina en la línea celular C9, mediante la fosforilación y activación de proteínas involucradas en la vía de señalización de la insulina.

Se determinó el efecto de insulina en la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup>, paso fundamental para activar las vías de señalización involucradas en las funciones de la insulina, y se observó que la fosforilación de Akt incrementó significativamente y llegó al máximo a partir de los 2 minutos de exposición a 100 nM de insulina (250% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control), efecto que se mantuvo por lo menos durante 30 minutos (Fig. 22). Con este resultado se pudo observar que en C9 la insulina provoca la fosforilación de Akt.

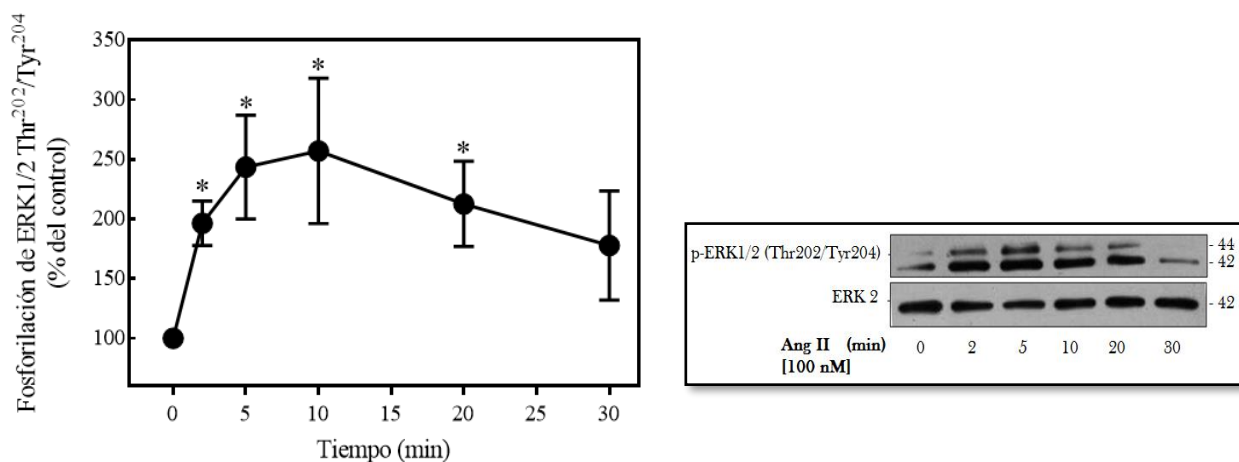


**Figura 22. Fosforilación de Akt inducida por insulina en función del tiempo de estímulo.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se incubaron con 100 nM de insulina a 2, 5, 10, 20 y 30 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de seis experimentos independientes; los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ )

## 7.2 Efecto de Ang II en la fosforilación de ERK 1/2

Dentro de la primera fase, también se determinó el efecto de Ang II en la fosforilación de ERK 1/2, proteína cinasa activada por mitógeno, que regula acciones proliferativas. Diferentes estudios han demostrado que la fosforilación en ERK 1/2 está relacionada con la fosforilación en residuos de Ser de IRS-1, mecanismo asociado con resistencia a la insulina (Arellano-Plancarte et al., 2010).

Como se observa en la figura 23, la fosforilación de ERK 1/2 en Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> inducida por Ang II incrementó significativamente a partir de los 2 minutos, y llegó al efecto máximo a los 10 minutos de exposición con 100 nM de Ang II (250% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control). Sin embargo, a partir de este tiempo la fosforilación empezó a disminuir, sin llegar a ser igual al valor del control por lo menos hasta los 30 minutos. Con este resultado se pudo observar que la línea celular C9 responde al estímulo con Ang II, permitiendo evaluar la participación de Ang II en las acciones de la insulina.

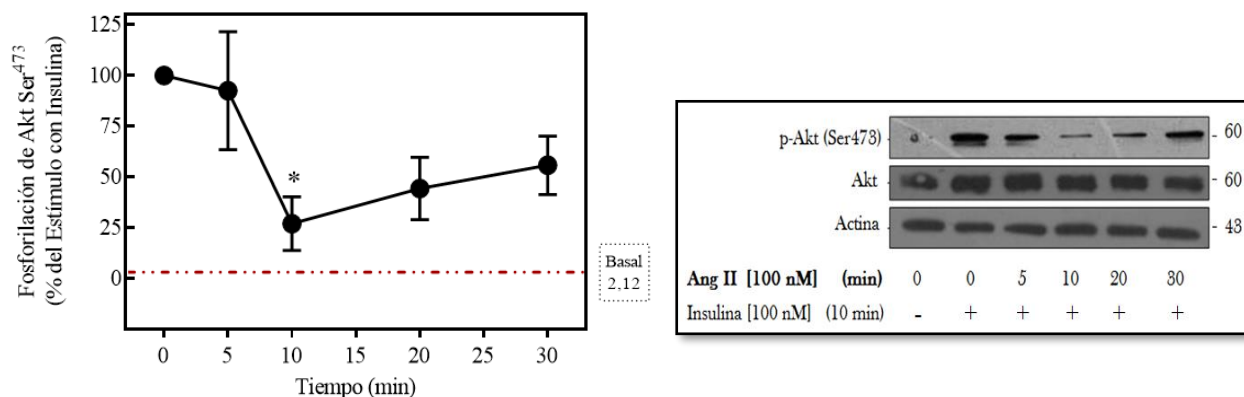


**Figura 23. Fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II en función del tiempo de estímulo.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se incubaron con 100 nM de Ang II a 2, 5, 10, 20 y 30 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de seis experimentos independientes; los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ )

### 7.3 Efecto de Ang II en la vía de señalización de la insulina

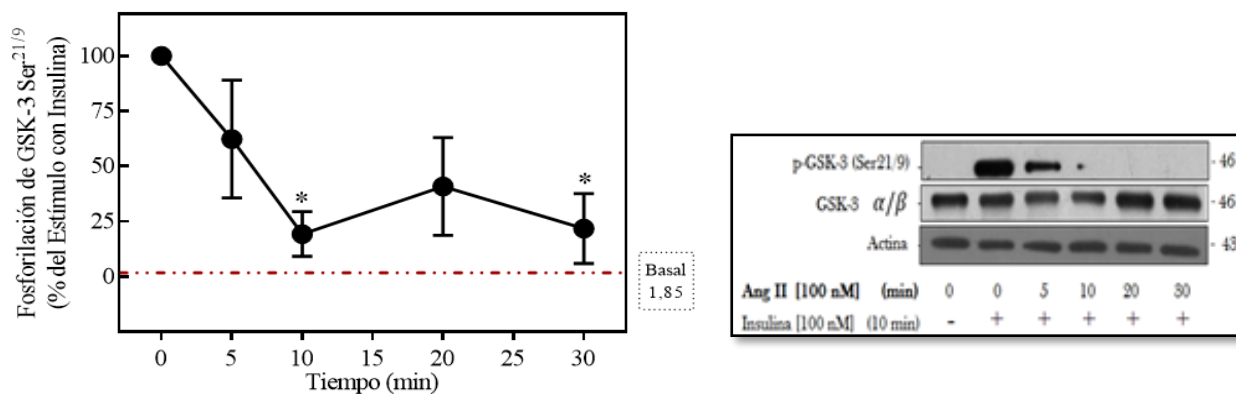
Distintos estudios han sugerido que los mecanismos de regulación en la señalización de insulina pueden ser alterados provocando resistencia a la insulina, la cual puede ser inducida por distintos factores, como Ang II. Teniendo en cuenta que Ang II está asociada con la fosforilación en residuos de Ser de IRS-1, mecanismo involucrado con resistencia a la insulina (Arellano-Plancarte et al., 2010), se determinó el efecto de Ang II en la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> y de GSK-3 $\alpha/\beta$  en Ser<sup>21/9</sup> inducida por insulina.

Para ello se pre-incubaron las células por 5, 10, 20 y 30 minutos con 100 nM de Ang II, y finalizado este tiempo se incubaron con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales, ya que en este tiempo se obtiene el efecto máximo de la hormona. Como se observa en la figura 24, Ang II inhibió la fosforilación de Akt en Ser<sup>473</sup> inducida por insulina (75% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. insulina). La disminución en la fosforilación de Akt provocada por Ang II a los 20 y 30 minutos, no es significativa, ya que su mayor efecto lo presenta en el tiempo de 10 minutos de tratamiento.



**Figura 24. Efecto de Ang II en la fosforilación de Akt inducida por insulina.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se pre-incubaron con 100 nM de Ang II por 5, 10, 20 y 30 minutos, y finalizado este tiempo se incubaron con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cinco experimentos independientes; los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. La línea horizontal punteada indica el basal de Akt fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

Debido a la importancia que tiene GSK-3 como moduladora de la síntesis de glucógeno, se evaluó el efecto de Ang II en la fosforilación de GSK-3  $\alpha/\beta$  en la Ser<sup>21/9</sup> inducida por insulina. Como se observa en la figura 25, Ang II también inhibió la fosforilación de GSK-3  $\alpha/\beta$  en Ser<sup>21/9</sup> inducida por insulina (75% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. *insulina*), a los 10 y 30 minutos de incubación con Ang II. Estos datos sugieren que la inhibición que ejerce la Ang II, en la fosforilación de Akt, altera la regulación inducida por la insulina de GSK-3  $\alpha/\beta$ , y por consiguiente en células hepáticas, la Ang II podría estar afectando la síntesis de glucógeno inducida por insulina.



**Figura 25. Efecto de Ang II en la fosforilación de GSK-3  $\alpha/\beta$  inducida por insulina.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se pre-incubaron con 100 nM de Ang II por 5, 10, 20 y 30 minutos, y finalizado este tiempo se incubaron con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pGSK-3 Ser<sup>21/9</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-GSK-3 y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes; los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. La línea horizontal punteada indica el basal de GSK-3 fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

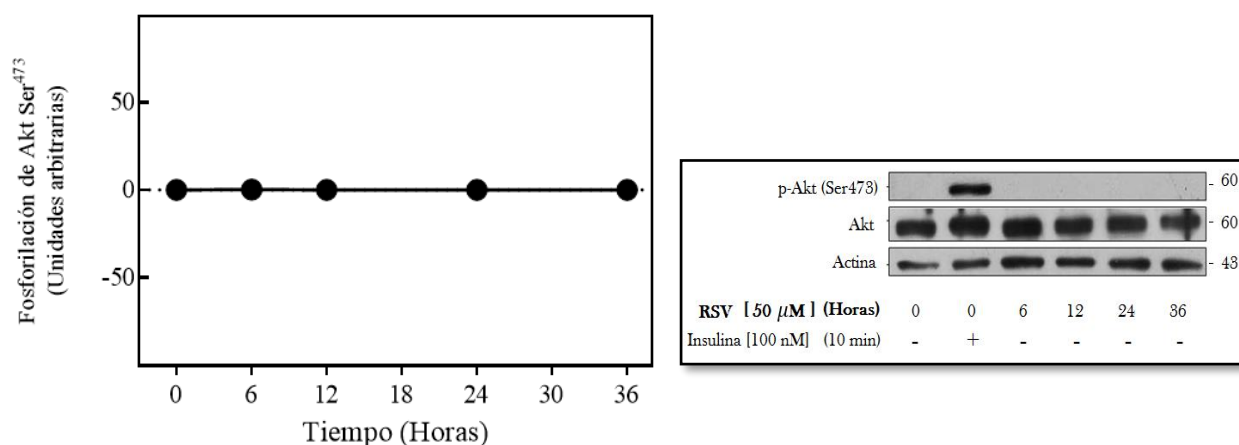
En conclusión, los datos obtenidos hasta el momento sugieren que en células hepáticas C9, la Ang II altera la señalización de la insulina, debido a que inhibe la fosforilación de Akt inducida por insulina, y de GSK-3  $\alpha/\beta$ , uno de sus sustratos efectores.



## 7.4 Efecto del RSV en la señalización de insulina modulada por Ang II

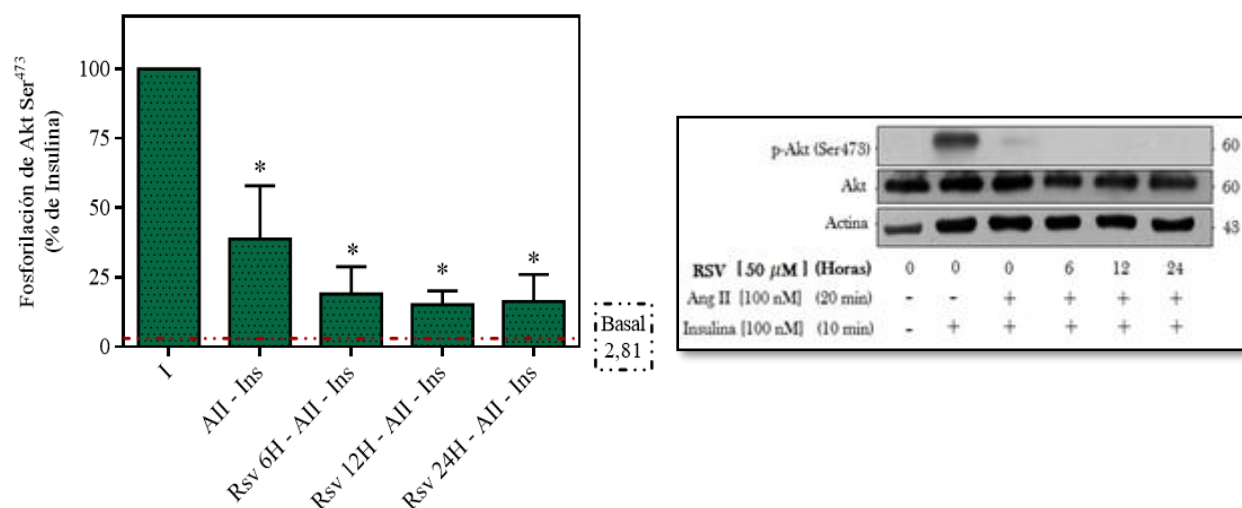
Se ha evidenciado en sistema cardiovascular que Ang II promueve la producción de ERO's vía NOX (Wei et al., 2006). Cuando se manifiesta un desequilibrio entre las ERO's y el nivel antioxidante intracelular, conlleva a la generación de estrés oxidativo, causando la activación de cinasas de Ser/Thr (Lastra et al., 2009), mecanismo que conduce a la desensibilización de las acciones de insulina. Debido a la importancia que tiene los antioxidantes como agentes que reducen a las especies oxidativas, y al beneficio que presenta para prevenir efectos tóxicos del estrés oxidativo (Pervaiz, 2003), se determinó el efecto del RSV, un antioxidante de la familia de los polifenoles, sobre la acción que ejerce Ang II en la señalización de la insulina.

Se determinó como control el efecto que por sí solo tiene el RSV en la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup>. Como se observa en la figura 26, a diferentes tiempos de incubación (6, 12, 24 y 36 horas) con 50  $\mu\text{M}$  de RSV, no se promovió un cambio en la fosforilación de Akt, comparado con el efecto máximo que tuvo insulina (100 nM) a los 10 minutos de tratamiento (indicado en el blot representativo). Cabe resaltar que los datos se expresaron en unidades arbitrarias debido a que no se obtuvo señal cuantificable en el control.



**Figura 26. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se incubaron con 50  $\mu\text{M}$  de RSV a 6, 12, 24, y 36 horas. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes; los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica.

Para determinar el efecto del RSV sobre la acción que ejerce Ang II en la señalización de insulina, las células fueron pre-tratadas con 50  $\mu\text{M}$  del antioxidante durante 6, 12 y 24 horas, finalizado este tiempo, las células fueron incubadas con Ang II (100 nM) durante 20 minutos y posteriormente con insulina (100 nM) por 10 minutos más. Como se observa en la figura 27, la fosforilación de Akt inducida por la insulina fue inhibida al exponer a las células durante 20 minutos con Ang II (63% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. *insulina*). Al pre-incubar las células por distintos tiempos con el RSV, se esperaba que el antioxidante previniera el efecto provocado por Ang II en la señal de insulina; sin embargo, la fosforilación de Akt se inhibió por completo con respecto al basal con este tratamiento (100% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. *insulina*). Además, se observó con base en la expresión proteica de Akt total y de actina, que no fue afectada la integridad de ambas proteínas por la exposición del antioxidante, así como en los demás experimentos relacionados a este pre-tratamiento. Por lo tanto, los datos indican que el antioxidante no previno la señal de insulina inhibida por Ang II.



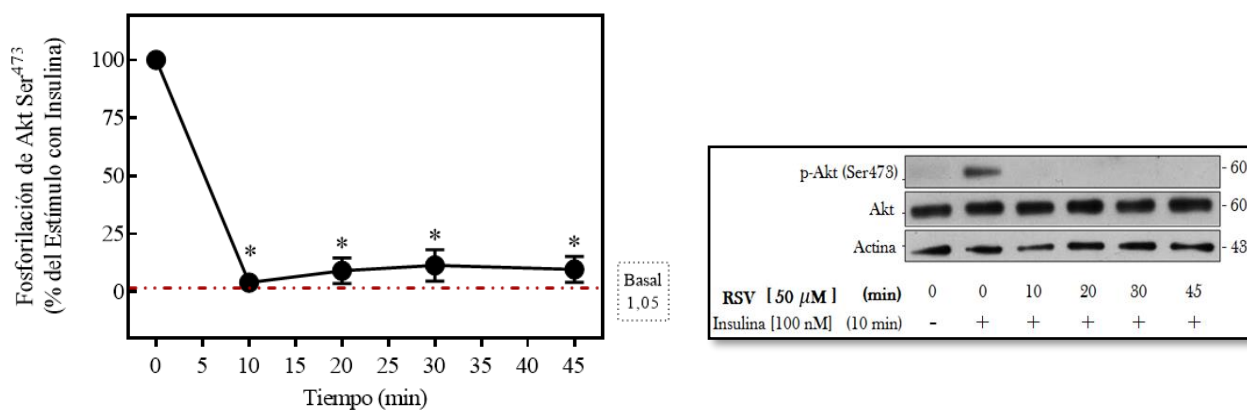
**Figura 27. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inhibida por Ang II.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-tratadas con 50  $\mu\text{M}$  del antioxidante a 6, 12 y 24 horas, finalizado este tiempo de pretratamiento, las células fueron incubadas con 100 nM de Ang II durante 20 minutos y posteriormente con 100 nM de insulina por 10 minutos más. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de Akt fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

## 7.5 Efecto del RSV en la señalización de la insulina

Una vez determinado que el RSV no previno el efecto inhibitorio de Ang II en la señal de insulina, se evaluó su efecto en la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup> inducida por insulina en diferentes tiempos y concentraciones estimadas en un rango micromolar, en el cual trabajos previos han reportado sus efectos.

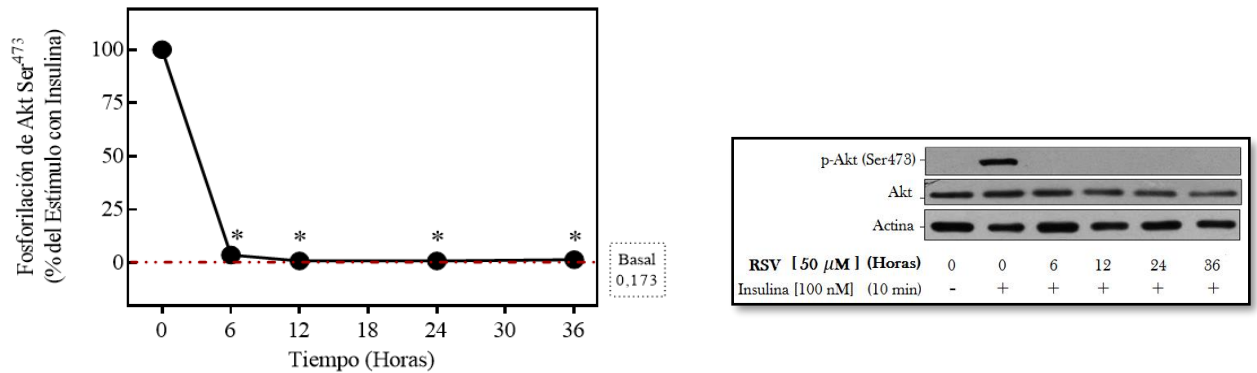
### 7.5.1 Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina

Para determinar el efecto del RSV en la activación de Akt por insulina, las células se pre-incubaron con 50  $\mu\text{M}$  de RSV durante tiempos cortos y largos, desde 10 min hasta 36 horas. Finalizado estos tiempos, las células fueron incubadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos más. Como se observa en las figuras 28 y 29, la fosforilación de Akt inducida por insulina fue inhibida totalmente (100% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. *insulina*) a partir de los 10 min (Fig. 28), inhibición que fue mantenida por lo menos hasta las 36 horas con RSV (Fig. 29).



**Figura 28. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina en tiempos cortos de incubación.**

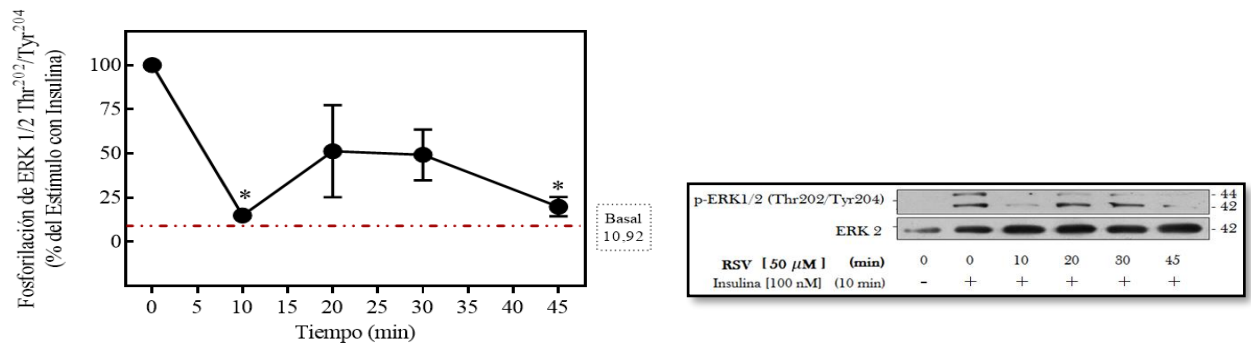
Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con 50  $\mu\text{M}$  del antioxidante a 10, 20, 30 y 45 minutos, finalizado este tiempo, las células fueron incubadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de Akt fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).



**Figura 29. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina en tiempos largos.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con 50 μM del antioxidante a 6, 12, 24 y 36 horas, finalizado este tiempo, las células fueron incubadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de Akt fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

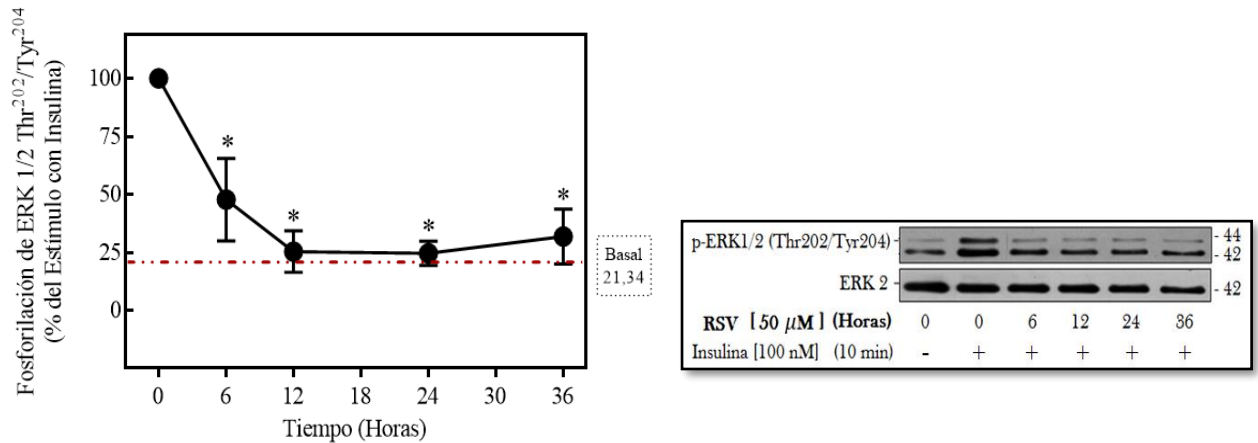
### 7.5.2 Efecto del RSV en la fosforilación de ERK/2 inducida por insulina

Por otra parte, la fosforilación de ERK 1/2 en Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> inducida por insulina, también fue inhibida con respecto al basal (línea punteada) (100% del efecto máximo inducido por insulina,  $p < 0.05$  vs. insulina) a partir de los 10 minutos (Fig. 30), efecto que fue mantenido por lo menos hasta las 36 horas (Fig. 31).



**Figura 30. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por insulina en tiempos cortos de incubación.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con 50 μM del antioxidante a 10, 20, 30 y 45 minutos, finalizado este tiempo, las células fueron incubadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de ERK 1/2 fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

Cabe resaltar que en los tiempos de 20 y 30 minutos con el RSV hubo un mayor margen de error, y por consiguiente mayor desviación, por lo que los datos no mostraron cambios significativos.



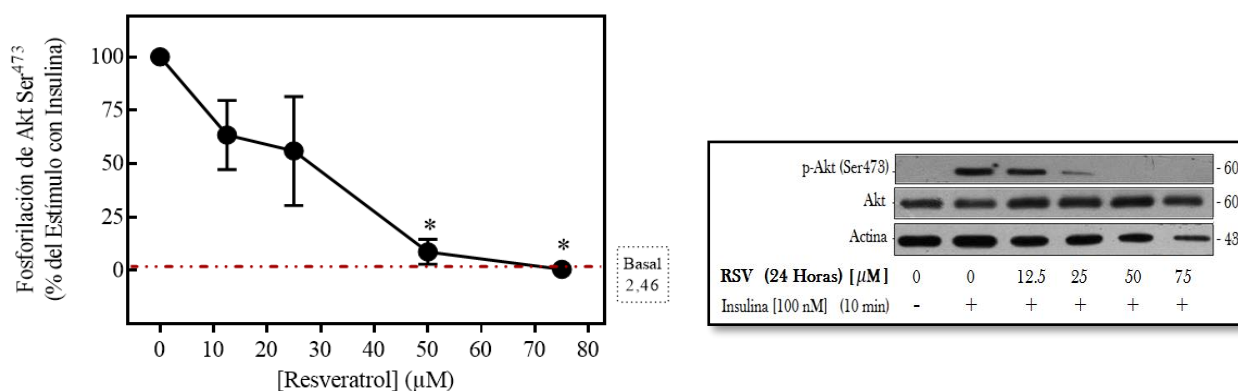
**Figura 31. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por insulina en tiempos largos.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con 50 μM del antioxidante a 6, 12, 24 y 36 horas, finalizado este tiempo, las células fueron incubadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de ERK 1/2 fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

### 7.5.3 Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina en función de la concentración

Una vez determinado el efecto del RSV en la activación de Akt en función del tiempo de incubación, se realizaron ensayos para observar si el efecto era dependiente de la concentración. Para ello las células fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de RSV en un rango de 12.5 a 75 μM durante 24 horas, terminado este tiempo de pre-incubación, las células fueron tratadas con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales.

Como se observa en la figura 32, la fosforilación de Akt inducida por la insulina se redujo 37% a las concentraciones de 12.5 y 25 μM y se inhibió totalmente en presencia del RSV a las concentraciones de 50 y 75 μM (100% del efecto máximo inducido por

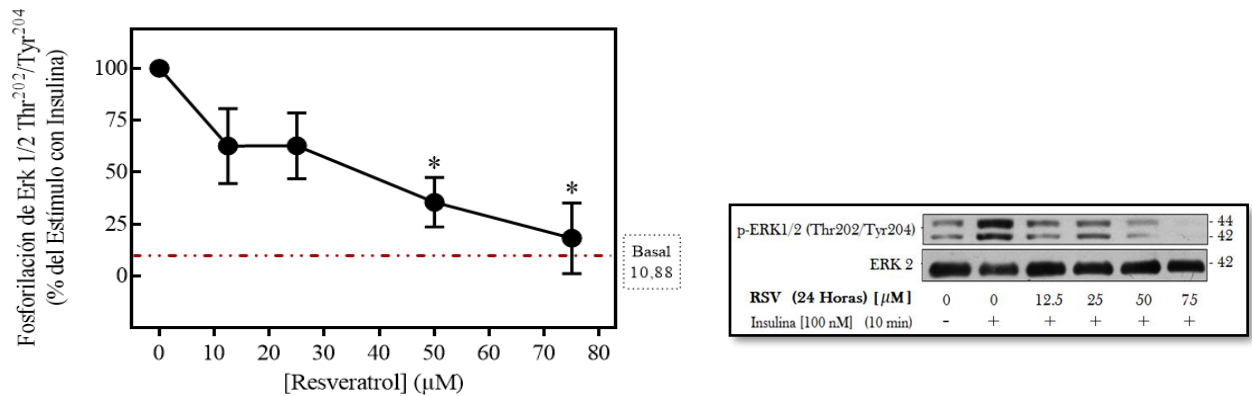
insulina,  $p < 0.05$  vs. insulina). Estos datos coinciden con el curso temporal del RSV desarrollado con  $50 \mu M$  (Fig. 29). Además, los datos sugieren que la inhibición provocada por el RSV en la fosforilación de Akt es dependiente de la concentración.



**Figura 32. Efecto del RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina en función de la concentración.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Fueron tratadas con distintas concentraciones de 12.5 a  $75 \mu M$  de RSV durante 24 horas, y después con  $100 nM$  de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de Akt fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

#### 7.5.4 Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por insulina en función de la concentración

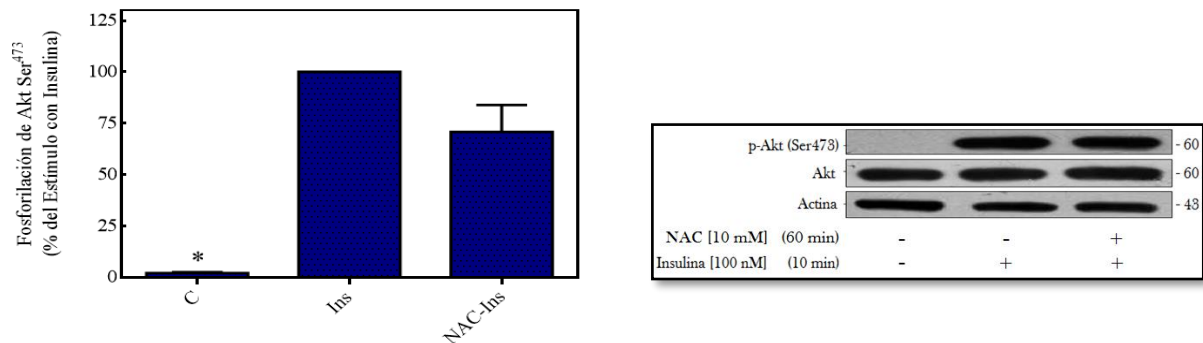
A partir del efecto inhibitorio que tiene el RSV en la fosforilación de Akt inducida por insulina en función de la concentración, también se evaluó su efecto en la fosforilación de ERK 1/2 por insulina, bajo las mismas condiciones. Como se observa en la figura 33, la fosforilación de ERK 1/2 disminuyó a medida que se incrementó la concentración del RSV, y fue inhibida totalmente con respecto al nivel del basal (línea punteada) ( $p < 0.05$  vs. insulina).



**Figura 33. Efecto del RSV en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por insulina en función de la concentración.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Fueron tratadas con distintas concentraciones de 12.5 a 75 μM de RSV durante 24 horas, y después con 100 nM de insulina durante 10 minutos adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica el basal de ERK 1/2 fosforilado calculado con respecto al efecto máximo inducido por insulina. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

## 7.6 Efecto del NAC en la señalización de la insulina

En función de los resultados obtenidos con el RSV se decidió evaluar el efecto de otro antioxidante, el NAC, en la fosforilación de Akt. Para ello se pre-incubaron las células con 10 mM de NAC por 60 minutos, finalizado este tiempo se incubaron con 100 nM de insulina por 10 minutos adicionales. Como se muestra en la figura 34, el NAC no afectó significativamente la fosforilación en la Ser<sup>473</sup> de Akt inducida por insulina.



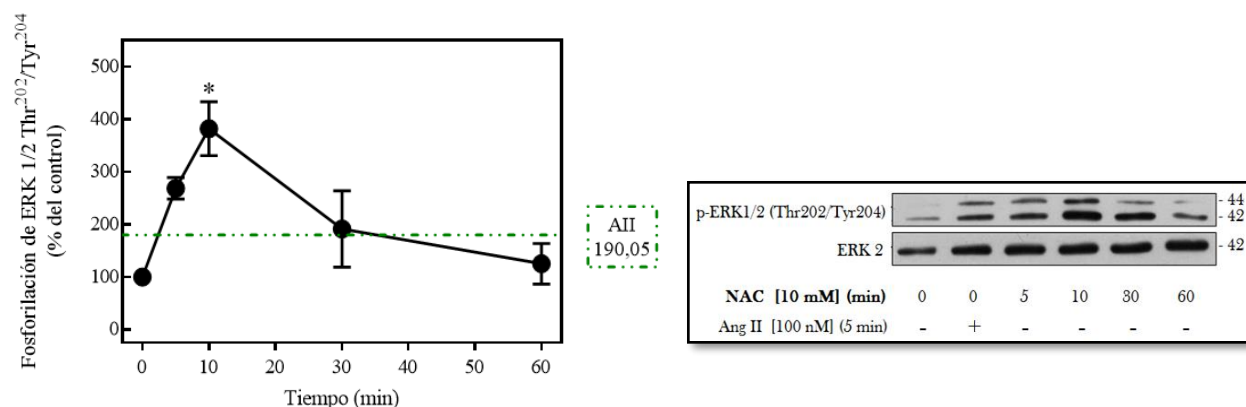
**Figura 34. Efecto del NAC en la fosforilación de Akt inducida por insulina.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas. Las células se pre-incubaron con 10 mM de NAC durante 60 min., posteriormente se incubaron con insulina con 100 nM por 10 min. adicionales. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pAkt Ser<sup>473</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-Akt y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto a insulina ( $p < 0.05$ ).

## 7.7 Efecto del NAC en la señalización de Ang II

Debido a la importancia que tienen los antioxidantes como agentes que reducen a las especies oxidativas, en este caso generadas por Ang II, se determinó el efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II, con el fin de determinar cuál acción ejerce sobre el efecto provocado por Ang II.

### 7.7.1 Efecto por sí solo del NAC en la fosforilación de ERK 1/2

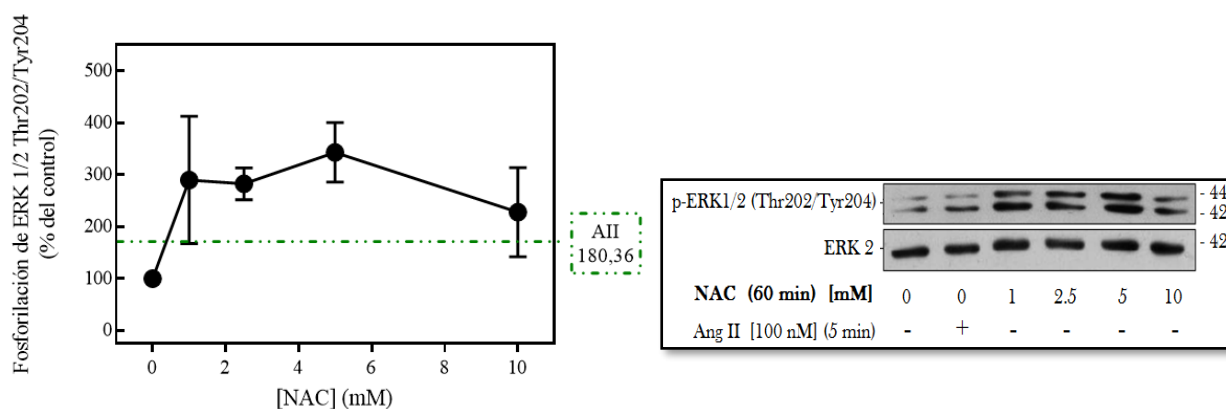
Se determinó en primer lugar el efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2. Como se observa en la figura 35 en diferentes tiempos de incubación (5, 10, 30 y 60 minutos) con 10 mM de NAC, el antioxidante promovió un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 a partir de los 5 minutos, presentando un efecto máximo y significativo a los 10 minutos (300% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control); sin embargo, la respuesta fue disminuida alcanzando el nivel basal a los 60 minutos de tratamiento. Con el fin de evaluar los cambios sobre la fosforilación de ERK 1/2 inducida por sólo NAC, se evaluó el efecto de Ang II sobre esta fosforilación como base de comparación (línea punteada verde).



**Figura 35. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 en función del tiempo de incubación.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se incubaron con 10 mM de NAC a 5, 10, 30, y 60 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica la señal de Ang II calculada con respecto al basal. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ ).



Una vez determinado el efecto del NAC en función del tiempo, también se realizaron ensayos para determinar si el efecto del NAC es dependiente de la concentración. De este modo, las células fueron incubadas con distintas concentraciones de NAC en un rango de 1 a 10 mM durante 60 minutos. Como se observa en la figura 36, aunque los datos no presentaron cambios significativos, el NAC por sí solo promovió un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 a partir de 1 mM, mayor que el generado por solo Ang II. Como ya se mencionó, en la gráfica se indica el estado de fosforilación de ERK 1/2 en respuesta al estímulo con solo Ang II (línea punteada verde), con el fin de comparar el efecto del NAC sobre esta fosforilación.

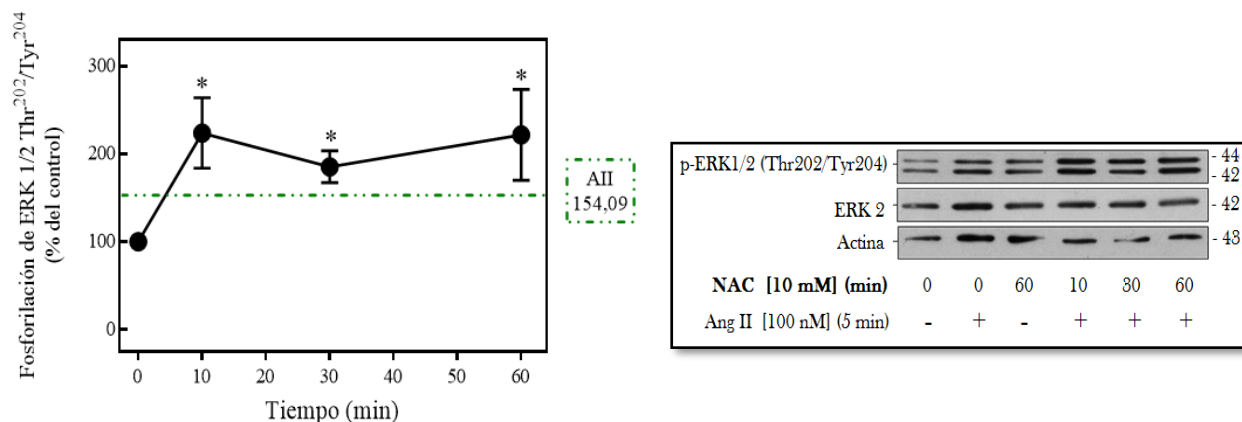


**Figura 36. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 en función de la concentración.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células se incubaron con distintas concentraciones de NAC durante 60 minutos. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica la señal de Ang II calculada con respecto al basal. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica.

### 7.7.2 Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II

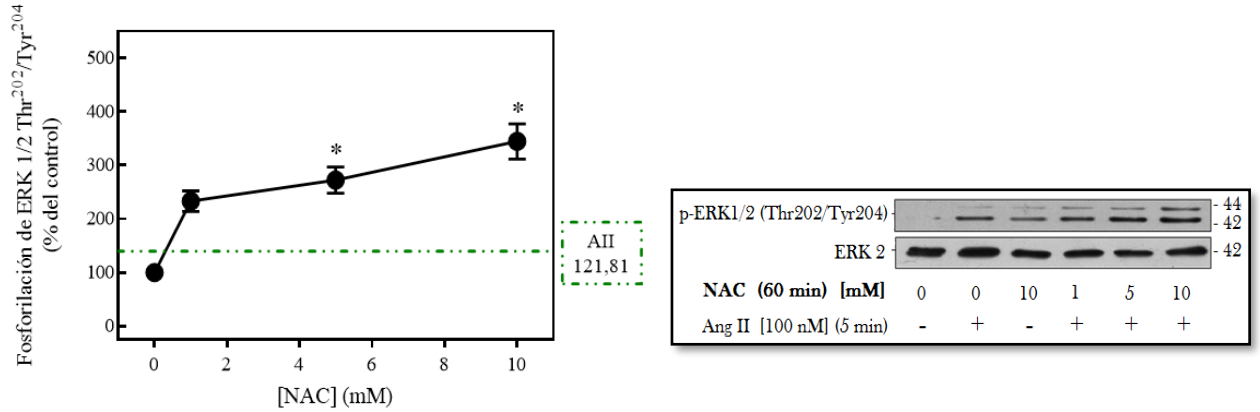
Por otra parte, se evaluó el efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II. Para ello las células fueron pre-incubadas con 10 mM de NAC por 10, 30 y 60 minutos, terminado este tiempo, se incubaron con 100 nM de Ang II durante 5 minutos más. Como se observa en la figura 37, la fosforilación de ERK 1/2 incrementó

significativamente con respecto al control (120% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control), efecto que se mantuvo por lo menos hasta 60 minutos en presencia de ambos estímulos. Con el fin de evaluar los cambios sobre la fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a Ang II en presencia del antioxidante, se evaluó el efecto de solo Ang II sobre esta fosforilación como base de comparación (línea punteada verde).



**Figura 37. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II en función del tiempo.** Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con 10 mM de NAC por 10, 30 y 60 minutos, terminado este tiempo, se incubaron con 100 nM de Ang II durante 5 minutos más. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 y anti-actina como controles de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica la señal de Ang II calculada con respecto al basal. Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

En un segundo experimento, las células fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de NAC en un rango de 1 a 10 mM durante 60 minutos, terminado este tiempo, las células se incubaron con 100 nM de Ang II durante 5 minutos más. Como se observa en la figura 38, la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II y en presencia de NAC, aumentó significativamente a una concentración de 5 mM (200% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control) y de 10 mM (250% sobre el nivel basal,  $p < 0.05$  vs. control). Estos datos sugieren que el efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II es dependiente de la concentración del antioxidante.



**Figura 38. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II en función de la concentración**  
 Las células C9 crecieron en medio con suero al 10%; posteriormente se mantuvieron en medio sin suero durante 6 horas para iniciar el experimento. Las células fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de NAC por 60 minutos, terminado este tiempo, se incubaron con 100 nM de Ang II durante 5 minutos más. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE y analizadas con el anticuerpo anti-pERK 1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>. La cantidad de proteína total se determinó con el anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. La línea horizontal punteada indica la señal de Ang II calculada con respecto al basal. Los datos son expresados como el promedio ± ESM en porcentaje. Se muestra un blot representativo de la gráfica. \* Significativamente diferentes con respecto al control (  $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron en el presente proyecto, indicaron que el RSV y el NAC, tuvieron distintos efectos sobre el estado de fosforilación de proteínas clave en la señalización de la insulina y la Ang II, como lo son Akt y ERK 1/2, en la línea celular hepática C9.

De acuerdo con el planteamiento inicial del proyecto, se emplearon los antioxidantes para determinar el papel de las ERO's generadas por Ang II en resistencia a la insulina, partiendo de la hipótesis de que en células hepáticas, el tratamiento con el RSV y el NAC, podría prevenir el efecto provocado por Ang II.

Para ello, inicialmente se determinó el efecto de Ang II en la vía de señalización de la insulina. En primer lugar, se evaluó la respuesta de cada una de las vías de señalización por separado en células hepáticas C9, observando que el modelo celular respondió al estímulo con ambas hormonas, debido a que la línea celular expresa endógenamente receptores de insulina y receptores AT<sub>1</sub>, lo que permite el estudio de los mecanismos de regulación de insulina por Ang II (García-Caballero et al., 2001; Yin et al., 2008; Arellano-Plancarte et al., 2010).

La fosforilación de Akt es un paso fundamental para activar a las vías de señalización de la insulina. En el tejido hepático, la activación de Akt regula la síntesis de glucógeno, y la supresión en la expresión de genes de las enzimas gluconeogénicas, como *fosfoenolpiruvato carboxicinas* (PEPCK) y *glucosa-6-fosfatasa* (G-6-Pasa), las cuales tienen un papel importante en la producción de glucosa hepática (Barthel y Schmoll, 2003). En otros modelos celulares como adipocitos 3T3-L1, hepatoma humano HepG2, células derivadas de ovario de hámster chino CHO-IR y macrófagos J774.2, la activación de la cinasa PI3K es fundamental en la activación de Akt, mecanismo esencial para casi todos los efectos de insulina (Chaussade et al., 2007), los cuales pueden ser alterados por la Ang II. Asimismo, la regulación negativa de Akt, está implicada en la patogénesis de cáncer y diabetes (Sarbasov et al., 2005).

Por otro lado, la fosforilación y activación de ERK 1/2 en respuesta al estímulo con Ang II, está asociada con la regulación de las acciones proliferativas, efectos mediados por

la transactivación de receptores para factor de crecimiento epidérmico (ej. EGFR), los cuales tienen actividad intrínseca de cinasa de Tyr, mecanismo de Ang II asociado con la regulación de las acciones de insulina (Arellano-Plancarte et al., 2010).

## 8.1 Efecto de Ang II en las acciones de insulina en la línea celular C9

Debido a la importancia que tiene el hígado en las funciones de la insulina, y a lo poco que se conoce del efecto de Ang II en la señalización por insulina en la línea celular C9, en el presente trabajo se propuso investigar la participación de Ang II en la vía de señalización de la insulina.

Como se observó en nuestros resultados, el efecto inhibitorio de Ang II en la fosforilación y activación de Akt y GSK-3  $\alpha/\beta$  inducida por insulina, coincide con lo observado en la línea celular C9, donde se demostró que la activación de ERK 1/2 se asocia con la fosforilación en residuos de Ser de IRS-1, mecanismo relacionado con resistencia a la insulina (Arellano-Plancarte et al., 2010). Además, en células del músculo liso vascular (VSMC), se encontró inhibiendo MEK con PD98059, que la activación de ERK 1/2 inducida por Ang II inhibe la captación de glucosa dependiente de insulina y sus mecanismos moleculares a través de la fosforilación en Ser<sup>307</sup> y Ser<sup>616</sup> de IRS-1 (Izawa et al., 2005).

El efecto inhibitorio de Ang II en la fosforilación de GSK-3 inducida por insulina, observado en nuestros datos, también fue determinado en células de músculo esquelético, donde la Angiotensina  $-(1-7)$  asociada con la activación de la vía MEK/ERK, inactiva a la *sintasa de glucógeno* (GS) en células con elevadas concentraciones de glucosa. En efecto, la inhibición de ERK 1/2 (por U0126), y de GSK-3 (por SB415286), mejora la activación y desfosforilación en Ser<sup>640/1</sup> de GS en respuesta a la reducción de los niveles de glucosa (Montori-Grau et al., 2013).

Por otra parte, en miotubos de ratas hipertensas TG(Mren2)27, asociadas con resistencia a la insulina con altos niveles de Ang II, se observó que la fosforilación de GSK-3 y la GS se encontraban inhibidas, debido a la reducción en la fosforilación de

IR e IRS-1 en Tyr, de Akt en Ser<sup>473</sup> y de GSK-3 en Ser<sup>9</sup>, y a la disminución de la asociación del complejo IRS y p85 de PI3K (Sloniger et al., 2005).

Por lo tanto, en la línea celular hepática C9, la reducción notable en el estado de fosforilación de Akt y de GSK-3, sugiere que la inhibición que ejerce la Ang II, podría estar afectando la síntesis de glucógeno inducida por insulina, efecto asociado a resistencia a la insulina.

También se ha evidenciado, principalmente en sistema cardiovascular y en músculo esquelético, que Ang II promueve la producción de ERO's por activación de la NADPH oxidasa (Wei et al., 2006). Cuando se manifiesta un desequilibrio entre la producción de ERO's y el nivel antioxidante intracelular, conlleva a la generación de estrés oxidativo, causando la activación de cinasas de Ser/Thr (Lastra-Lastra et al., 2009), mecanismo que conduce a la desensibilización de las acciones de insulina. Evidencias experimentales y clínicas han reportado el beneficio de los antioxidantes y su rol para prevenir efectos tóxicos del estrés oxidativo durante estados de hiperglicemia y DM2, protegiendo a las células de acumulación lipídica, y reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Pervaiz, 2003).

Así, en el presente trabajo se emplearon antioxidantes para determinar el papel de las ERO's generadas por Ang II en resistencia a la insulina, partiendo de la hipótesis de que en células hepáticas, el tratamiento con el RSV y el NAC, podría prevenir el efecto de Ang II en la señalización de la insulina.

## **8.2 Efecto de los antioxidantes en las acciones de la insulina y Ang II**

Los antioxidantes donan electrones a las especies oxidativas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009). En particular, se ha evidenciado que el RSV o NAC pueden reducir un estado de resistencia a la insulina. En adipocitos resistentes a la insulina por incubación con LPS (lipopolisacárido), que promueve secreción de factores

inflamatorios, se observó que el RSV redujo la expresión de la sintasa de óxido nítrico, y la degradación de la proteína  $I\kappa B\alpha$ . Además, en tejidos sensibles a la insulina de ratones alimentados con altas concentraciones de grasa, el tratamiento con RSV incrementó la fosforilación de Akt inducida por la insulina. Estos resultados demuestran que el RSV mejora las acciones de insulina únicamente bajo condiciones de resistencia a la insulina, sugiriendo que su efecto puede depender del tipo de tejido y su estado metabólico (Kang et al., 2012).

Por otro lado, en adipocitos 3T3-L1 el antioxidante NAC contrarrestó el efecto inhibitorio de IGF-1 en las acciones de insulina a través de ERO's vía NADPH oxidasa, lo cual afecta el estado de fosforilación de IRS-1 y la captación de glucosa inducida por la insulina (Fukuoka et al., 2010).

### **8.2.1 Efecto del RSV en la vía de señalización de la insulina**

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los antioxidantes RSV y NAC, para prevenir el efecto provocado por Ang II en la vía de señalización de la insulina, por reducción y/o inactivación de las ERO's generadas por Ang II, mecanismo evidenciado en células de músculo esquelético (Wei et al., 2006). Las ERO's promueven la activación de cinasas de Ser/Thr, que fosforilan a proteínas IRS en distintos residuos de Ser fundamentales para conducir a la degradación proteosomal de IRS-1, y por consiguiente, desensibilización en la vía de señalización de la insulina (Taniyama et al., 2005; Lastra-Lastra et al., 2009).

Sin embargo, el RSV presentó un efecto inhibitorio sobre las acciones de la insulina; y los mecanismos por los cuales el antioxidante actúa sobre la vía de señalización de la insulina aún no están claramente definidos.

Estos resultados pueden tener un significado funcional ya que el RSV, posiblemente a determinadas concentraciones, puede afectar los procesos metabólicos de la insulina mediados por la activación de Akt, causando los mismos efectos generados por la Ang II. Sin embargo, el efecto del RSV es mucho mayor que el generado por Ang II, por lo

cual ambos tratamientos regulan negativamente la activación de Akt posiblemente por distintas vías de señalización (Haider et al., 2005). Cabe resaltar que el RSV por sí sólo no promovió un cambio en la fosforilación de Akt, observado en la figura 26, por lo que sus acciones dependen de la presencia de insulina.

Un estudio desarrollado en células del cáncer de próstata, reportó que el RSV promueve apoptosis, y que a nivel molecular puede inhibir la transcripción de la ciclooxigenasa-2, y la vía de activación de PI3K, mecanismo por el cual también inhibe el crecimiento y proliferación celular (Benítez et al., 2007). Así mismo, en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, el RSV a bajas concentraciones [1  $pM$  – 10  $\mu M$ ] induce la fosforilación de ERK 1/2, respuesta mantenida de 2 a 30 min, mientras que a altas concentraciones [50  $\mu M$  – 100  $\mu M$ ] inhibe la fosforilación de la MAP cinasa; por lo que se sugiere que en células neuronales tiene un efecto biológico diferente de su propiedad antioxidante, y también podría ser considerado para activar otros receptores y/o vías celulares (Miloso et al., 1999).

Otros estudios han evidenciado que el RSV inhibe vías señalización relacionadas al crecimiento en fibroblastos cardiacos, así como una acción anti-hipertrófica en VSMC activada por Ang II, proceso mediado por la inhibición selectiva de la fosforilación de Akt (Haider et al., 2005). De acuerdo con su estructura química, el RSV tiene propiedades antioxidantes, y se ha reportado que su capacidad antioxidante puede estar vinculada a receptores de la superficie celular, vías de señalización activadas desde la membrana, maquinaria de transducción de señales, receptores nucleares, transcripción génica y vías metabólicas (Pervaiz et al., 2009).

De acuerdo con la respuesta celular generada por el pretratamiento con el RSV, y en conjunto con lo que se ha reportado acerca de los efectos de éste en distintos modelos celulares, se proponen algunos mecanismos por los cuales el RSV inhibe la fosforilación y activación de Akt inducida por la insulina, de manera dependiente e independiente a su capacidad antioxidante:



➤ *Por inhibición directa de PI3K*

La inhibición de la activación de Akt, podría ocurrir porque el RSV es un inhibidor natural de PI3K. En líneas celulares humanas derivadas del músculo, el RSV inhibe la vía de señalización PI3K/Akt/FOXO inducida por insulina. Esta inhibición se debe a una acción directa e inhibitoria del RSV en la clase 1A de la subunidad catalítica p110 de PI3K, en la cual el grupo 4'-OH del RSV forma un enlace de hidrógeno con residuos de Lys dentro del sitio de unión a ATP de la PI3K, impidiendo su capacidad para activarse. Por lo tanto, la clase 1A de PI3K es un blanco adicional por el cual el RSV puede afectar las acciones de insulina y ejercer funciones quimiopreventivas (Fröjdö et al., 2007).

➤ *Por reducción de la asociación entre el complejo IRS-1/ PI3K e IRS/Grb2 inducida por la insulina*

Diversos estudios han mostrado el efecto inhibitorio del RSV en las acciones de la insulina, como en cultivo primario de hepatocitos de rata, y en las líneas celulares H4IIE y HepG2, derivadas del hígado (Zhang, 2006). En este trabajo, se evaluó el efecto del RSV en el estado de fosforilación de IR e IRS-1 en Tyr por inmunoprecipitación, mostrando que en presencia de RSV, la insulina promovió un incremento en el estado de fosforilación en Tyr de IR- $\beta$  e IRS-1, lo que sugiere que el RSV actúa río abajo del receptor de insulina e IRS, para inhibir a la vía de señalización de la insulina.

Además, el mismo grupo observó que RSV más insulina, disminuyó la asociación de los complejos IRS-1/p85 e IRS-1/Grb2, proponiendo que el efecto del RSV puede deberse a que el antioxidante altera la interacción entre IRS-1 y sus proteínas efectoras río abajo como p85, la subunidad reguladora de PI3K, disminuyendo la activación de esta cinasa inducida por insulina, y Grb2, razón por la cual también es afectada la vía de las MAP cinasas. De tal forma que en nuestros resultados con C9, la inhibición de la actividad de Akt y de ERK 1/2, podría estar asociado al efecto inhibitorio del RSV en la asociación entre el complejo IRS-1/p85 e IRS-1/Grb2 (Fig. 39).

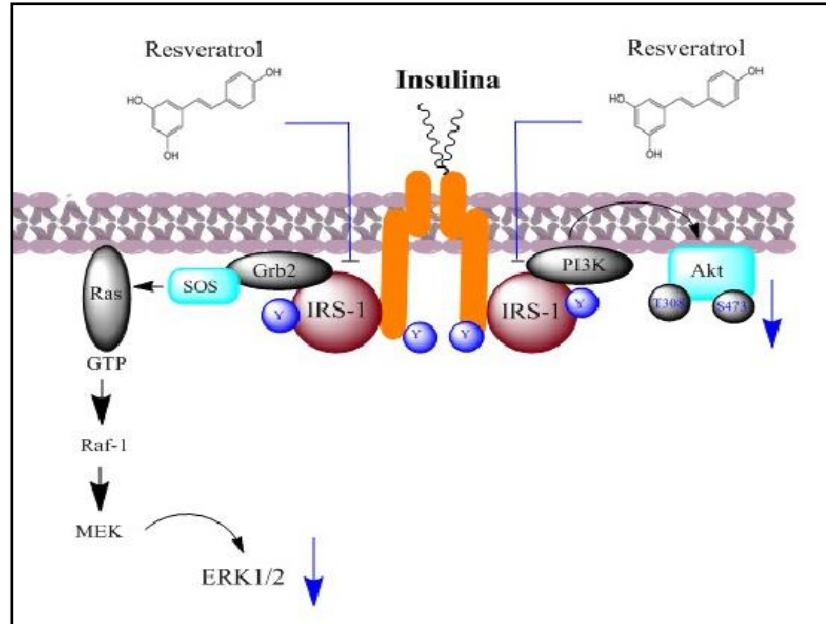


Figura 39. Efecto del RSV en la vía de señalización de la insulina en células derivadas del hígado. El RSV inhibe la activación de Akt y de ERK 1/2 a través de reducir la asociación entre el complejo IRS/PI3K o IRS/Grb2. Mecanismo propuesto por Zhang (2006). Los símbolos azules indican el mecanismo por el cual el RSV podría estar actuando en la vía de señalización de la insulina

El efecto del RSV sobre la vía de señalización de la insulina también fue estudiado en VSMC, donde se observó que un derivado del RSV sin actividad antioxidante por estar metilado en el grupo 4'-OH (trans-3,5-dihidroxi-4'-metilestilbeno), inhibió la fosforilación de Akt, lo que sugiere que el RSV puede actuar de manera independiente a su actividad antioxidante (Schreiner et al., 2011).

➤ *Por reducción de las ERO's favoreciendo la activación de fosfatasa de Tyr*

Como ya se mencionó, a bajas concentraciones las ERO's pueden participar en regular procesos fisiológicos, como reparación en los tejidos (Bhattacharyya et al., 2014), proliferación celular, fagocitosis, metabolismo, reacciones inflamatorias, etc. Diversos estudios han sugerido que las ERO's son moléculas esenciales de señalización, y pueden estar involucradas en regular receptores con actividad intrínseca de cinasa de Tyr (Besse-Patin y Estall, 2014), en donde las ERO's,

específicamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reacciona con el grupo tiol de cisteínas de fosfatasa de Tyr para ser oxidadas, dejándolas en un estado inactivo (Garrido y Griendling, 2009).

Por lo tanto, en función de su actividad antioxidante, se estudió en adipocitos 3T3-L1 la capacidad reductora de ISL (isoliquiritigenin), un flavonoide que comparte propiedades con el RSV, y se ha involucrado en la regulación de los eventos moleculares de la cascada de señalización de la insulina. El ISL restauró la actividad de la fosfatasa de Tyr PTP-1B al inhibir la oxidación de PTB-1B mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generado por la activación de NOX4 en respuesta a insulina. Este mecanismo óxido-reducción da lugar a la inactivación de la vía IR/PI3K/Akt, durante los primeros estados de la adipogénesis inducida por la insulina (Park et al., 2016).

Otro estudio muestra que el RSV, inhibió la fosforilación de Akt cuando las VSMC son estimuladas por EGF, observando que en células deficientes de Shp2, gen que codifica para una proteína fosfatasa de Tyr, el RSV no inhibió la activación de Akt inducida por EGF; mientras que en las células con Shp2, el RSV disminuyó significativamente la fosforilación de Akt inducida por EGF. Además, el RSV promovió el incremento en actividad de la fosfatasa dependiente de la concentración. Por lo que la fosfatasa Shp2 es necesaria para el efecto inhibitorio del RSV en la vía PI3K/Akt estimulada por EGF (Fig. 41) (Haider et al., 2005).

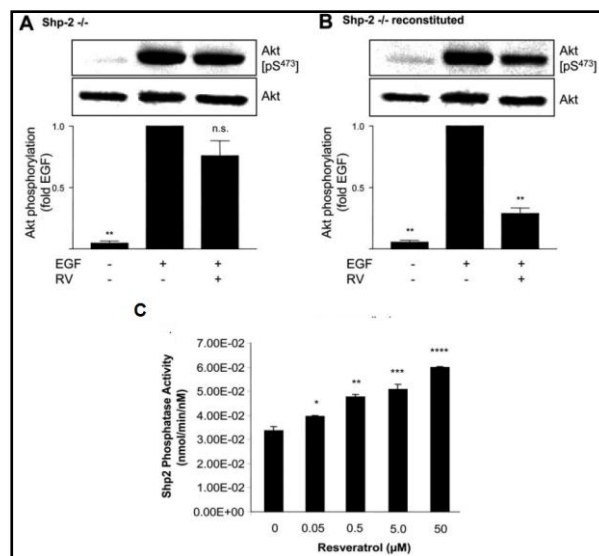


Figura 40. (A-B) RSV no inhibe la fosforilación de Akt en fibroblastos deficientes de Shp-2. (C) RSV activa a Shp2 de manera dependiente a la concentración (Haider et al., 2005)

Por lo tanto, con base en los estudios mencionados, en el presente trabajo se sugiere que el RSV inhibe la activación de Akt en Ser<sup>473</sup> inducida por insulina, de manera dependiente de su actividad antioxidante, al inhibir la oxidación de PTP's por ERO's generadas por la propia hormona, dejándola en una conformación constitutivamente activa para desfosforilar residuos de Tyr de IR o IRS-1 (Fig. 41).

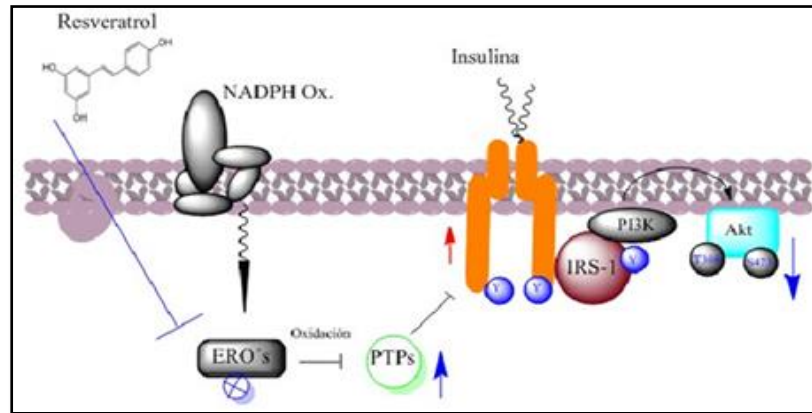


Figura 41. Modelo propuesto del efecto del RSV dependiente de su capacidad antioxidante en la vía de señalización de la insulina. Los símbolos azules indican el mecanismo por el cual el RSV podría estar actuando, de tal manera que el RSV inhibe la activación de Akt, al inhibir la oxidación PTP's por ERO's, dejándola en una conformación constitutivamente activa para desfosforilar residuos de Tyr de IR o IRS-1

## 8.2.2 Efecto del NAC en la señalización de la insulina

De acuerdo a los resultados con el RSV, se decidió evaluar el efecto de otro agente con capacidad de inhibir procesos de oxidación al disminuir radicales libres. Por lo anterior, se evaluó el efecto del NAC en la vía de señalización de la insulina; en el que se observó que el pre-tratamiento con NAC no afectó la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup> inducida por insulina, respuesta diferente al RSV.

En diversos estudios se ha evidenciado que el NAC tiene un efecto potencial en contra de resistencia a la insulina, DM2 y sus complicaciones (Samuni et al., 2013). En humanos, la perfusión intravenosa de NAC durante la hiperglicemia mejora la sensibilidad a la insulina e incrementa la absorción de glucosa. Así mismo, el grupo de Ho (1999) reportó que el NAC reduce la hiperglicemia en ratones con diabetes. Y

similarmente, Kaneo et al. (1999) observaron efectos benéficos del NAC en células  $\beta$ -pancreáticas de ratones diabéticos *db/db*.

En otro estudio la suplementación con NAC previene el estrés oxidativo, mejorando la sensibilidad a la insulina en ratas alimentadas con una dieta alta en sacarosa (Montassar et al., 2015). De acuerdo a su propiedad antioxidante, el grupo de Fukuoka (2010), en adipocitos 3T3-L1, empleó el NAC para contrarrestar el efecto inhibitorio de IGF-1 en las acciones de insulina por formación de las ERO's vía NOX, lo cual afecta el estado de fosforilación de IRS-1 y la captación de glucosa inducida por insulina.

Por consiguiente, a pesar de que se ha reportado ampliamente el efecto del NAC en las acciones de la insulina dependiente de su actividad antioxidante, en nuestros resultados el estado de fosforilación de la cinasa Akt estimulado por insulina no fue alterado; de tal manera que tanto el RSV como el NAC, aunque comparten propiedades reductoras, podrían presentar diferentes mecanismos, independientes de su actividad antioxidante, para regular distintas vías de señalización.

### **8.2.3 Efecto del NAC en la vía de señalización de la Angiotensina II**

Así como se evaluó el efecto del NAC en la señalización de la insulina, también se determinó su efecto en la vía de señalización de la Ang II, con el fin de observar si la actividad antioxidante del NAC podría disminuir la activación y fosforilación de ERK 1/2 inducida por Ang II, efecto evidenciado en fibroblastos cardíacos de rata (Wang et al., 1998), el cual es mediado por la reducción de las ERO's generadas por la activación de NOX. Además, reportes sobre VSMC, han sugerido que las ERO's regulan efectos proliferativos al modular positivamente a la vía de las MAP cinasas (Baas y Berk, 1995).

Nuestros resultados con NAC son diferentes a lo reportado en fibroblastos sobre la activación de ERK 1/2 mediada por Ang II (Wang et al., 1998). En las C9, el NAC promovió un aumento en la fosforilación de ERK 1/2 con efecto máximo y significativo a los 10 minutos; sin embargo, la respuesta disminuyó alcanzando el basal a los 60 minutos de tratamiento, efecto similar al trabajo de Lin et al. (2006). Por otro lado, la

fosforilación de ERK 1/2 incrementó significativamente con respecto al control, en presencia de NAC y Ang II, efecto que se sostuvo por lo menos hasta 60 minutos. Ambos tratamientos presentaron un patrón diferente en función del tiempo, siendo transitorio con NAC, y sostenido con NAC y Ang II, posiblemente debido a un efecto aditivo generado por la activación, de manera independiente de la vía de ERK 1/2 por ambos estímulos.

Además, en función de la concentración, la fosforilación de ERK 1/2 incrementó en presencia de NAC incubado por 60 minutos, respuesta no observada en el ensayo previo del curso temporal, en el cual se empleó 10 *mM* de NAC. Sin embargo, es importante resaltar que el NAC por sí mismo promovió una respuesta en la fosforilación de ERK 1/2. Por otro lado, cuando las células fueron incubadas con NAC y Ang II, la activación de ERK 1/2 aumentó significativamente a 5 *mM* y 10 *mM*. Sin embargo, no se observaron cambios significativos entre los dos tratamientos, por lo que se requiere realizar experimentos en tiempos menores a 60 minutos, donde se observa el efecto del NAC.

Trabajos previos en distintos modelos coinciden con el efecto del NAC sobre la activación de ERK 1/2 en C9. Se ha reportado que el NAC se asocia con actividad mitogénica en células HeLa, a partir de la regulación en la activación de ERK, y que tiene efectos anti-apoptóticos y proliferativos por el incremento en ERK fosforilado. De manera similar, el grupo de Lin et al. (2006) sugirió que el NAC activa de forma seriada las proteínas cinasas ERK y p38 MAPK, y ambas cinasas trabajan en conjunto para mediar el efecto neuroprotectivo de NAC; para ello investigaron el efecto de I6, un derivado de jengibre que induce muerte celular en un cultivo de neuronas corticales, observando que el pre-tratamiento con NAC previno la muerte celular inducida por I6 de manera dependiente a la concentración, efecto mediado por el incremento en la fosforilación y activación de ERK 1/2 (Fig. 42). Además, con el empleo de inhibidores de MEK y farnesiltransferasa, fue bloqueado el efecto neuroprotectivo del NAC, por lo que se sugiere que la activación y fosforilación de ERK 1/2 está asociada con el efecto neuroprotectivo del NAC.

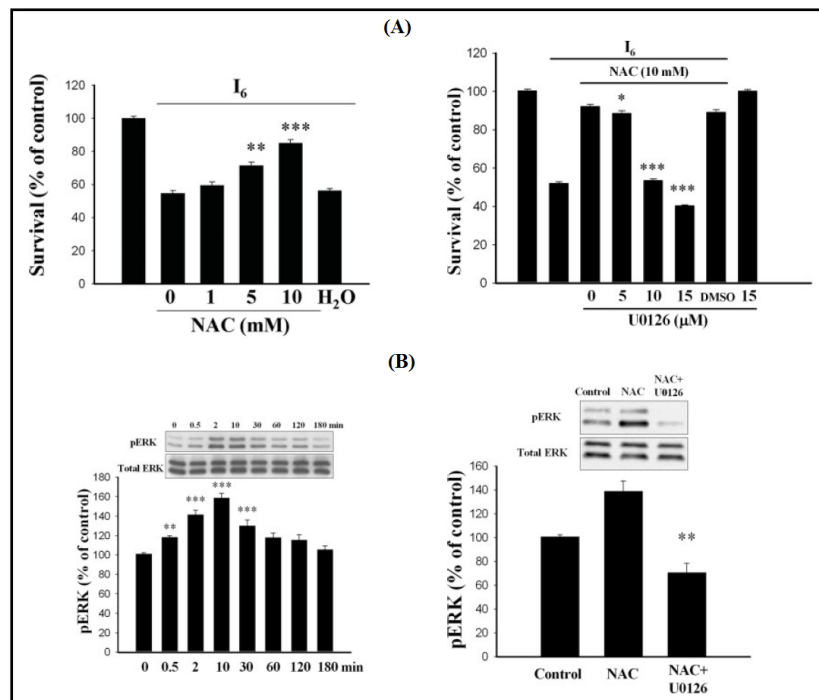


Figura 42. Efecto del NAC en la fosforilación de ERK (A) Requerimiento de la activación de ERK 1/2 para el efecto neuroprotector del NAC (B) NAC induce fosforilación de ERK 1/2; U0126 es un inhibidor de MEK (Lin, et al., 2006)

Otros estudios desarrollados en células endoteliales (Faruqi et al., 1997) han mostrado en un ambiente celular de oxido-reducción, que el NAC aumentó significativamente el glutatión [GSH - un antioxidante potente que actúa de manera ubicua localizado intracelularmente para ayudar a proteger a las células del estrés oxidativo (Lushchak, 2012)], por lo cual se ha sugerido como posible mecanismo por el que el NAC ejerce su acción reguladora en la activación de ERK 1/2.

Por otro lado, se ha reportado que el NAC inhibe procesos de apoptosis al reducir los radicales libres, como el ion superóxido, involucrado en mediar la activación de la apoptosis. Además, se ha reportado que el NAC tiene propiedades anti-inflamatorias donde el antioxidante limita la liberación de citocinas y reduce la producción de IL-6 en pacientes en hemodiálisis, y las citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en roedores sometidos a isquemia cerebral. Además, los efectos anti-inflamatorios del NAC están asociados con la disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B (Khan et al., 2004), y a la reducción de ERO's involucradas en la secreción y liberación de citocinas pro-inflamatorias. Todos estos mecanismos no excluyen necesariamente la función de las

ERO's, como una consecuencia directa de las propiedades antioxidantes del NAC, al contrario, mantener el estado REDOX a nivel celular puede modular la actividad de factores transcripcionales sensibles a REDOX tales como NF- $\kappa$ B (Zafarullah et al., 2003), y en general, la regulación de múltiples vías de señalización.

En la figura 43, se representa dos posibles mecanismos de acuerdo con lo que está reportado, por los cuales el NAC regula el estado de fosforilación de ERK 1/2 en células hepáticas, de manera independiente a la Ang II.

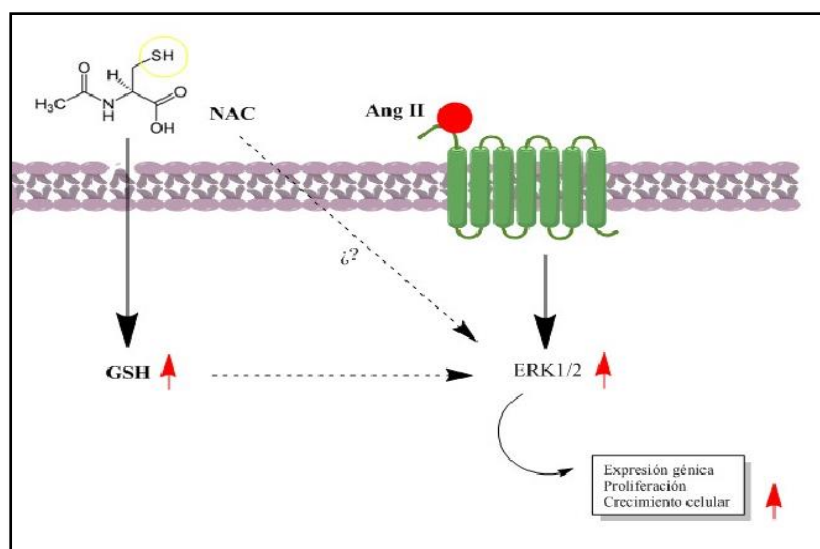


Figura 43. Modelo representativo del efecto del NAC en la fosforilación de ERK 1/2. El NAC puede mediar efectos proliferativos a través de regular la activación de ERK 1/2, de manera directa (línea punteada) sobre la proteína, o de manera indirecta sobre el incremento en los niveles de GSH, el cual puede interactuar de alguna manera con ERK 1/2

Por ello, la diferencia del efecto del RSV y del NAC en el estado de fosforilación de proteínas claves en la señalización de la insulina y la Ang II, puede deberse a distintos mecanismos independientes de su actividad antioxidante; de alguna manera, actuando sobre distintos blancos proteicos que regulan procesos biológicos como la expresión génica, la proliferación y crecimiento celular, entre otros. Sin embargo, poco se ha estudiado en la manera que actúan ambas moléculas, por lo que se podría sugerir un diseño experimental exponiendo a las células con ambos antioxidantes para evaluar su efecto en conjunto en respuesta al estímulo con insulina y Ang II, y establecer una relación entre los dos e involucrada en la regulación de ambas vías de señalización.



## 9. CONCLUSIONES

En la línea celular hepática C9:

- ❖ La incubación con insulina a diferentes tiempos promovió la fosforilación de Akt, proteína clave en los mecanismos de señalización de la insulina. Por consiguiente, el modelo es útil para estudiar las acciones de la insulina.
- ❖ La incubación con Ang II a diferentes tiempos aumentó la fosforilación de ERK 1/2, el cual es un paso fundamental en la regulación de las acciones proliferativas. De modo que el modelo es útil también para estudiar las acciones de la Ang II.
- ❖ La Ang II impidió la fosforilación de Akt y GSK-3 inducida por la insulina, por lo que se sugiere que en C9 la inhibición que ejerce la Ang II, podría estar afectando la síntesis de glucógeno promovida por insulina, efecto asociado a resistencia a la insulina.
- ❖ El pretratamiento con el antioxidante RSV a diferentes tiempos no previno el efecto provocado por Ang II en la vía de señalización de la insulina. Por lo cual, en el modelo celular bajo estas condiciones, el estrés oxidativo no hace parte del mecanismo empleado por Ang II para promover resistencia a la insulina.
- ❖ El RSV por sí mismo, no tiene ningún efecto en la vía de señalización de la insulina. Sin embargo, el pretratamiento con el RSV inhibió la fosforilación y activación de Akt y de ERK 1/2 promovida por la insulina. Por lo anterior, el RSV también podría inducir resistencia a la insulina.
- ❖ El NAC, otro antioxidante, no promovió un cambio significativo en la fosforilación de Akt promovida por la insulina. Por consiguiente, bajo estas condiciones el NAC no tiene ningún efecto en la vía de señalización de la insulina.
- ❖ La incubación con sólo NAC promovió un incremento en la fosforilación de ERK 1/2. Por lo que el efecto del NAC, es similar al inducido por Ang II.

Por lo anterior, los distintos efectos que se mostraron en células hepáticas tanto del RSV como del NAC en la fosforilación de proteínas claves en la señalización de insulina y Ang II, son independientes a su acción como antioxidante. Por lo que aún queda mucho por dilucidar sobre los mecanismos que ejercen estos compuestos en la regulación de la vía de señalización de la insulina y la Ang II.

## 10. PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar la activación de la NADPH oxidasa por Ang II en C9
- ❖ Identificar un mecanismo por el cual las ERO's generadas por Ang II, regulan las acciones de insulina.
- ❖ Evaluar el estado de activación del receptor de insulina, IRS-1, y GSK-3, inducida por la insulina, en células tratadas con RSV y NAC, con el fin de proponer un mecanismo molecular por el cual podrían estar actuando en la línea celular C9.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Arellano-Plancarte, A., Olivares-Reyes, J., Hernandez-Aranda, J., and Catt, K. (2010). Angiotensin- induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochemical Pharmacology*, 79, 733-745.

Baas, A., and Berk, B. (1995). Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases by  $H_2O_2$  and  $O_2^{\cdot -}$  in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 77, 29-36.

Balakumar, P., and Jagadeesh, G. (2014). A century old renin–angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular Signalling*, 26, 2147-2160.

Baron, S., Bedarida, T., Cottart, C. H., Vibert, F., Vessieres, E., and Nivet-Antoine, V. (2014). Dual Effects of Resveratrol on Arterial Damage Induced By Insulin Resistance in Aged Mice. *Journals of Gerontology: Biological Sciences*, 69(3), 260–269.

Barthel, A., and Schmolli, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 285(4), 685-692.

- Besse-Patin, A., and Estall, J. (2014). An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *International Journal of Cell Biology*, 2014, 1-9.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., and Crowe, S. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews*, 94, 329-354.
- Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 296, 581-591.
- Calderón-Salinas, J., Muñoz-Reyes, E., y Quintanar-Escorza, M. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*, 32(2), 53-66.
- Ceriello, A. (2000). Oxidative Stress and Glycemic Regulation. *Metabolism*, 49(2), 27-29.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J., Thorvaldsen, J., Chu, Q., Crenshaw, E., and Birnbaum, M. (2001). Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus–Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2. *Science*, 292, 1728-1731.
- Corcoran, A., and Cotter, T. (2013). Redox regulation of protein kinases. *FEBS Journal*, 280, 1944–1965.
- Drake, P. G., and Posner, B. I. (1998). Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase(s): Role in insulin action. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 182, 79-89.
- Elbini-Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., and Montassar-Lasram, M. (2016). A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sciences*, 151, 359-363.
- Eringa, E., Stehouwer, C., Nieuw-Amerongen, G., Ouwehand, L., Westerhof, N., and Sipkema, P. (2004). Vasoconstrictor effects of insulin in skeletal muscle arterioles are mediated by ERK 1/2 activation in endothelium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287, 2043-2048.
- Evans, J., Goldfine, I., Maddux, B., and Grodsky, G. (2003). Are Oxidative Stress - Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and BETA-Cell Dysfunction? *Diabetes*, 52, 1-8.
- Evans, J., Maddux, B., and Goldfine, I. (2005). The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(7), 1040-1052.
- Fröjdö, S., Cozzone, D., Vidal, H., and Pirola, L. (2007). Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor. *Biochemical Journal*, 406, 511–518.
- Fukuoka, H., Iida, K., Nishizawa, H., Imanaka, M., Takeno, R., Iguchi, G., and Takahashi, Y. (2010). IGF-I stimulates reactive oxygen species (ROS) production and inhibits insulin-

dependent glucose uptake via ROS in 3T3-L1 adipocytes. *Growth Hormone & IGF Research*, 20, 212-219.

Galic, S., Klingler-Hoffmann, M., Fodero-Tavoletti, M., Puryer, M., Meng, T.-C., Tonks, N., and Tiganis, T. (2003). Regulation of Insulin Receptor Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatase TCPTP. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), 2096–2108.

García-Caballero, A., Olivares-Reyes, J., Catt, K., and García-Saíñz, J. (2001). Angiotensin AT1 Receptor Phosphorylation and Desensitization in a Hepatic Cell Line. Roles of Protein Kinase C and Phosphoinositide 3-Kinase. *Molecular Pharmacology*, 59(3), 576-585.

Garrido, A. M., and Griendling, K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302, 148-158.

Griendling, K., Minieri, C., Ollerenshaw, J., and Alexander, R. (1994). Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 74(6), 1141-1148.

Gual, P., Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.-F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87, Issue 1, 99-109.

Gutiérrez, C., Roura, A., and Olivares-Reyes, J. (2016). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update.

Haider, U., Roos, T., Kontaridis, M., Neel, B., Sorescu, D., Griendling, K., and Dirsch, V. (2005). Resveratrol Inhibits Angiotensin II- and Epidermal Growth Factor-Mediated Akt Activation: Role of Gab1 and Shp2. *Molecular Pharmacology*, 68(1), 41–48.

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

Holmström, K., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 15, 411-421.

Ichiki, T., Takeda, K., Tokunou, T., Funakoshi, Y., Ito, K., Iino, N., and Takeshita, A. (2001). Reactive Oxygen Species–Mediated Homologous Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptor mRNA by Angiotensin II. *Hypertension*, 535-540.

Izawa, Y., Yoshizumi, M., Fujita, Y., Ali, N., Kanematsu, Y., Ishizawa, K., and Tamaki, T. (2005). ERK 1/2 activation by angiotensin II inhibits insulin-induced glucose uptake in vascular smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*, 308, 291-299.

Kang, W., Hong, H. J., Guan, J., Kim, D. G., Yang, E. J., Koh, G., and Lee, D. H. (2012). Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism*, 424-433.

- Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., and Singh, A. (2004). Administration of N-Acetylcysteine after Focal Cerebral Ischemia Protects Brain and Reduces Inflammation in a Rat Model of Experimental Stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 76, 519–527.
- Kim, K.-Y., Rhim, T.-Y., Choi, I., and Kim, S.-S. (2001). N-Acetylcysteine Induces Cell Cycle Arrest in Hepatic Stellate Cells through Its Reducing Activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 276(44), 40591-40598.
- Kim, Y. B., Nikoulina, S., Ciaraldi, T., Henry, R., and Kahn, B. (1999). Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 733-741.
- Kim, Y. B., Peroni, O., Franke, T., and Kahn, B. (2000). Divergent Regulation of Akt1 and Akt2 Isoforms in Insulin Target Tissues of Obese Zucker Rats. *Diabetes*, 49, 847-856.
- Lancon, A., Delmas, D., Osman, H., Thénot, J. P., Jannin, B., and Latruffe, N. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316, 1132–1137.
- Lastra-Lastra, G., Sowerst, J., Restrepo, K., Manrique, C., and Lastra-González, G. (2009). Role of aldosterone and angiotensin II in insulin resistance: an update. *Clinical Endocrinology*, 71, 1-6.
- Lebrun, P., and Van Obberghen, E. (2008). SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta physiologica (Oxf)*, 192(1), 29-36.
- Lin, C. H., Kuo, S. C., Huang, L. J., and Gean, P. W. (2006). Neuroprotective Effect of N-Acetylcysteine on Neuronal Apoptosis Induced by a Synthetic Gingerdione Compound: Involvement of ERK and p38 Phosphorylation. *Journal of Neuroscience Research*, 84, 1485–1494.
- Lushchak, V. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1-26.
- Madhunapantula, S., and Robertson, G. (2011). Therapeutic Implications of Targeting AKT Signaling in Melanoma. *Enzyme Research*, 2011, 1-20.
- Mahadevan, D., Meuillet, E., Powis, G., Mash, E., George, B., Gokhale, V., and Shakalya, K. (2008). Discovery of a novel class of AKT pleckstrin homology (PH) domain inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 2621-2632.
- Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S., and Nema, R. K. (2009). Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104.
- Michael, M., Kulkarni, R., Postic, C., Previs, S., Shulman, G., Magnuson, M., and Kahn, C. (2000). Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell*, 6, 87–97.

Miloso, M., Bertelli, A., Nicolini, G., and Tredici, G. (1999). Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 264, 141-144.

Montassar, M., Bini, I., and Annabi, A. (2015). A review on the possible molecular mechanism of action N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clinical Biochemistry*, 48, 1200-1208.

Montori-Grau, M., Tarrats, N., Osorio-Conles, O., Orozco, A., Serrano-Marco, L., Vázquez-Carrera, M., and Gómez-Foix, A. (2013). Glucose dependence of glycogen synthase activity regulation by GSK3 and MEK/ERK inhibitors and angiotensin-(1-7) action on these pathways in cultured human myotubes. *Cellular Signaling*, 25(5), 1318-1327.

Nickenig, G., Strehlow, K., Bäumer, A., Baudler, S., Wabmann, S., Sauer, H., and Böhm, M. (2000). Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression. *British Journal of Pharmacology*, 131, 795-803.

Olivares-Reyes, J. A., y Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *REB*, 27(1), 9-18.

Olivares-Reyes, J., Arellano-Plancarte, A., and Castillo-Hernandez, J. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: Implications for diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302, 128–139.

Olivares-Reyes, J., Shah, B., Hernández-Aranda, J., García-Caballero, A., Farshori, P., García-Sáinz, A., and Catt, K. (2005). Agonist-Induced Interactions between Angiotensin AT1 and Epidermal Growth Factor Receptors. *Molecular pharmacology*, 68(2), 356–364.

Park, S. J., Choe, Y. G., Kim, J. H., Chang, K. T., Lee, H. S., and Lee, D. S. (2016). Isoliquiritigenin impairs insulin signaling and adipocyte differentiation through the inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1B oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 5-12.

Patel, T., Rawal, K., Bagchi, A., Akolkar, G., Bernardes, N., Dias, D., and Singal, P. (2015). Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Failure Reviews*, 21, 11-23.

Pederson, T., Kramer, D., and Rondinone, C. (2001). Serine/Threonine Phosphorylation of IRS-1 Triggers Its Degradation - Possible Regulation by Tyrosine Phosphorylation. *Diabetes*, 50, 24-31.

Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., and Osuna, A. (2009). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacological Reports*, 61, 67–75.

Pervaiz, S. (2003). Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB Journal*, 17, 1975-1985.

- Pervaiz, S., and Holme, A. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2851-2897.
- Queiroz, A., Gomes, B., Moraes, W., and Borges, R. (2009). A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1644–1649.
- Quintanar-Escorza, M. A., y Calderón-Salinas, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28(3), 89-101.
- Quiñones, M., Miguel, M., and Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ramalingam, L., Oh, E., and Thurmond, D. (2013). Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 2815–2834.
- Roskoski, R. (2012). ERK 1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66, 105-143.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O., and Berk, M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 4117-4129.
- Sarbassov, D., Guertin, D., Ali, S., and Sabatini, D. (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science*, 307, 1098-1101.
- Schreiner, C., Kumerz, M., Gesslbauer, J., Schachner, D., Joa, H., Erker, T., and Dirsch, V. (2011). Resveratrol blocks Akt activation in angiotensin- II or EGF-stimulated vascular smooth muscle cells in a redox-independent manner. *Cardiovascular Research*, 90, 140–147.
- Shi, Y., Wang, J., Chandarlapaty, S., Cross, J., Thompson, C., Rosen, N., and Jiang, X. (2014). PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS-1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21, 522–527.
- Shulman, G. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 171–176.
- Sloniger, J., Saengsirisuwan, V., Diehl, C., Dokken, B., Lailerd, N., Lemieux, A., and Henriksen, E. (2005). Defective insulin signaling in skeletal muscle of the hypertensive TG(mREN2)27 rat. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(6), 1074-1081.
- Sowers, J. (2004). Insulin resistance and hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 286, 1597-1602.
- Stivala, L., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., and Vannini, V. (2001). Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22586–22594.

- Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456-480.
- Taniyama, Y., Hitomi, H., Shah, A., Wayne, A., and Griending, 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.
- Truong, T., and Carroll, K. (2012). Redox Regulation of EGFR Signaling Through Cysteine. *Biochemistry*, 51(50), 9954–9965.
- Varman, S., and Shulman, G. (2012). Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148(5), 852-871.
- Vigneri, R., Goldfine, I., and Frittitta, L. (2016). Insulin, insulin receptors, and cancer. *Journal of Endocrinological Investigation*, 1-12.
- Virkamäki, A., Ueki, K., and Kahn, R. (1999). Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(7), 931-943.
- Wang, D., Yu, X., and Brecher, P. (1998). Nitric Oxide and N-Acetylcysteine Inhibit the Activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Angiotensin II in Rat Cardiac Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 33027–33034.
- Wang, T., Mao, X., Li, H., Qiao, S., Xu, A., Wang, J., and Xia, Z. (2013). N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial posts ischemic injury in diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 63, 291–303.
- Wei, Y., Sowers, J., Nistala, R., Gong, H., Uptergrove, G., Clark, S., and Stump, C. (2006). AngiotensinII-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35137–35146.
- Yamaguchi, Y., Flier, J. S., Benecke, H., Ransil, B. J., and Moller, D. E. (1993). Ligand-binding properties of the 2 isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology*, 132, 1132–1138 .
- Yin, X., Li, B., Chen, H., and Catt, K. (2008). Differential Signaling Pathways in Angiotensin II- and Epidermal Growth Factor-stimulated Hepatic C9 Cells. *Molecular Pharmacology*, 1223–1233.
- Zafarullah, M., Li, W., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 6-20.
- Zhang, J. (2006). Resveratrol inhibits insulin responses in a SirT1-independent pathway. *Biochemical Journal*, 519–527.