



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de las acciones de insulina por
angiotensina II en células adiposas**

Tesis que presenta

Citlaly Gutiérrez Rodelo

Para obtener el grado de:

Doctora en ciencias

En la especialidad de:

BIOQUÍMICA

Director de Tesis:

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes.

La presente tesis experimental se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV IPN unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes y con el apoyo técnico de la Bióloga Judith Hernández Aranda y la Bióloga Esperanza Jiménez Barrón. Durante el desarrollo de este, la autora fue becaria de CONACYT (No. 261975). Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (donativos: 48777 y 167673).

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Olivares: esta tesis es producto de todo el tiempo y paciencia que invirtió en mi formación académica y también personal. Le agradezco muchas cosas, pero, sobre todo, esos minutos que se transformaban en horas en la discusión de datos y en el mejoramiento de mi desempeño, siempre confiando en que mejoraría, espero no defraudarlo. Gracias por siempre mostrarse amable, positivo y mantener su puerta abierta para quienes lo necesitamos, por enseñarnos a ser autónomos y responsables. Además, por permitirme introducirme este maravilloso mundo de la transducción de señales. Por todo, doctor, ¡Muchas Gracias!

A mi familia, que siempre ha confiado en mí y me anima a pesar de que el cumplir mis sueños significa estar lejos de ellos y perderme de todos los eventos cotidianos y los importantes, gracias porque siempre me apoyan y me alientan a continuar, gracias por inspirarme a ser mejor cada día.

A todo el equipo del laboratorio de transducción de señales, Judith, Paty, Esperanza, Fernanda, Paola, Adriana, Huguet, Karina, Monica, Wendy, Lis, por ser amigas, por el trabajo en equipo y la discusión de datos, por compartir conmigo y el apoyo en cada uno de esos días de adversidad en el transcurso de las clases y experimentos, también por las risas, me llevo muchos buenos recuerdos, pláticas y un enorme cariño para todas.

A los amigos que he adquirido en estos años en el Cinvestav Leo, Pris, Ely y el equipo, Ezequiel, a Márquez, gracias por las discusiones de los planetas inexistentes, toda la ciencia y los gatitos.

A los asesores directos de este proyecto al Dr. Rafael Villalobos, al Dr. Noé Durán, al Dr. Agustín Guerrero y a la Dra. Angélica Rueda, por las observaciones para la mejora del trabajo experimental y mi formación académica, así como la intervención con reactivos para cumplir con los objetivos aquí planteados.

Gracias a todo el colegio de profesores del departamento de Bioquímica por sus cátedras y convivencia, colaboraron mucho en mi formación.

A Rocío, Leticia, Oscar, Priscila, Angélica y Norma por su apoyo con trámites, compras, apoyo técnico y secretarial, por ser siempre amables y muy eficientes.

Resumen

A nivel celular, el término resistencia a insulina es definido como una señalización reducida de esta hormona desde el receptor de insulina (IR) a proteínas sustrato finales involucradas en sus funciones metabólicas y mitogénicas. En estudios realizados en pacientes obesos con hipertensión, se ha demostrado que los niveles de angiotensina II (AngII) se encuentran incrementados en tejido adiposo, sugiriendo que esta hormona está involucrada en la patogénesis de obesidad y resistencia a la insulina. Con el fin de determinar si la hormona AngII es capaz de modular las acciones de la insulina en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, durante este trabajo se encontró que la estimulación con AngII desde 5 hasta 90 minutos reduce la señalización por insulina al promover la fosforilación en Ser del IR. Por otra parte, esta fosforilación parece estar mediada por PKC y resulta en la disminución en la incorporación de glucosa inducida por insulina. Hasta el momento los datos sugieren que las isoformas PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC δ podrían ser importantes en el efecto de AngII en la vía de señalización de insulina en nuestro modelo celular. Además, se encontró que AngII conduce a la fosforilación de la fosfatasa PTP1B en un residuo que es importante para su asociación con IR, este residuo es la Tyr¹⁵² e implica la activación de Jak2 por AngII y, por otra parte, fomenta que esta fosfatasa no se regule negativamente al disminuir la fosforilación en Ser⁵⁰ mediada por insulina y Akt. Además, hemos encontrado que través de disminuir la activación de PTP1B mediante el silenciamiento genético (siRNA), se previene el efecto de AngII para disminuir la fosforilación en IR Tyr¹¹⁵⁸, Tyr^{1162/63} y Akt en Ser⁴⁷³ inducida por insulina. De esta forma, sugerimos que AngII reduce las acciones de insulina en células 3T3-L1 por mecanismos que involucran directamente la regulación a nivel del IR, a través de promover su fosforilación en Ser mediada por PKC clásicas y la desfosforilación en residuos de tirosina por acción de la fosfatasa PTP1B.

Abstract

At the cellular level, the concept of insulin resistance means a decreased signaling by this hormone from the insulin receptor (IR) down to the final substrate proteins resulting in reduced metabolic and mitogenic functions. Studies in obese patients with hypertension have shown that angiotensin II (AngII) levels are increased in adipose tissue, suggesting that this hormone might be involved in the pathogenesis of obesity and insulin resistance. In order to determine whether AngII is able to modulate the actions of insulin in 3T3-L1 cells that have been differentiated in adipocytes, we have studied the effect of AngII on insulin signaling in these cells. We have found that preincubation with AngII promoted phosphorylation of Serine residues in IR as a function of time. This effect appears to involve the activation of PKC by AngII and this in turn results in decreased insulin-induced glucose uptake. So far, the data suggest that PKC α , PKC β I, PKC β II and PKC δ could be involved in the effect of AngII on insulin signaling in our cell model. In addition, it has been found that AngII leads to phosphorylation of phosphatase PTP1B in a residue that is important for its association with IR, this residue is Tyr¹⁵² and involves activation of Jak2 kinase by AngII. Additionally, AngII inhibits the insulin-triggered Akt-mediated phosphorylation of Ser⁵⁰ of PTP1B. Finally, we have determined that decreasing the activity of PTP1B with either a selective inhibitor or genetic silencing (siRNA) reverses the inhibitory effect of Ang II on insulin triggered phosphorylation in IR Tyr¹¹⁵⁸, Tyr^{1162/63} and on Ser⁴⁷³ in Akt. Thus, we suggest that AngII decreases the effect of insulin in 3T3-L1 cells by at least two different mechanisms, PKC-mediated Ser phosphorylation of IR and dephosphorylation of tyrosine residues by activation of PTP1B phosphatase.

Abreviaturas

Ang	Angiotensina
Ang II	Angiotensina II
AGT	Angiotensinógeno
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
AT ₁ R	Receptor de Angiotensina Tipo I
AT ₂ R	Receptor de Angiotensina Tipo II
BRA	Bloqueador de Receptor de Angiotensina
CBS	Suero de ternera
DM2	Diabetes Mellitus Tipo II
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina II
EGF	Factor de Crecimiento Epidermico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidermal
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
IECAS	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina II
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G
GLUT	Transportador de Glucosa
IR	Receptor de Insulina
IP3	Inositol Trisfosfato
JAK2	Cinasa Janus 2
LAR	Fosfatasa relacionada al antígeno común de leucocito
MAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
PA	Presión Arterial
PLC	Fosfolipasa C
PTB	Dominio de Unión a Fosfotirosina
PTP1B	Proteína Fosfatasa de Tyr tipo 1B
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Cinasa
PIP3	Fosfatidilinositol (3, 4,5) trisfosfato
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PTPs	Proteínas Fosfatasas de Tirosina
PTP1B	Fosfatasa de Tirosina-1B
IRS	Proteína Sustrato del Receptor de Insulina
RTK	Receptor con Actividad Intrínseca de Cinasa de Tirosina
Ser	Aminoácido Serina
SRA	Sistema Renina Angiotensina
Tyr	Aminoácido Tirosina
Thr	Aminoácido Treonina

Índice de tablas:

Pág.

Tabla 1. Reactivos empleados para estimular a las células 3T3-L1	37
Tabla 2. Condiciones de uso de los anticuerpos para su identificación por Western Blot	41

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del Receptor de insulina: dominios funcionales del receptor de insulina.....	3
Figura 2. Principales vías de señalización de insulina.....	5
Figura 3. Mecanismos de regulación de la señal de insulina.....	6
Figura 4. Mecanismos de resistencia a insulina.....	11
Figura 5. Sistema Renina Angiotensina.....	13
Figura 6. Vías de señalización de AngII.....	14
Figura 7. Efecto de AngII en la actividad de cinasa del IR.....	17
Figura 8. AngII promueve la incorporación de glucosa estimulada por insulina y la fosforilación en Tyr del IR.....	18
Figura 9. AngII promueve un incremento en la señalización de insulina.....	18
Figura 10. Efecto de la AngII en la fosforilación de la Ser ⁴⁷³ de Akt inducida por insulina.....	19
Figura 11a. Insulina y AngII promueven la fosforilación en Ser de IR.....	20
Figura 11b. El inhibidor de PKC BIM, previene la fosforilación en Ser de IR promovida por AngII.....	21
Figura 12. Efecto de insulina y AngII en la fosforilación en Ser de IRS.....	22
Figura 13. PKC participa en la regulación inducida por AngII en la señalización de insulina en células adiposas 3T3-L1.....	24
Figura 14. Representación de la estructura de PTP1B.....	26
Figura 15. Efecto de la AngII en la fosforilación de IRTyr ¹¹⁵⁸ inducida por insulina.....	28
Figura 16. Inmunoprecipitación de PTP1B con el IR.....	28
Figura 17. La hipótesis.....	30
Figura 18. Objetivos generales y objetivos específicos.....	32
Figura 19. Efecto de la AngII en la fosforilación en Ser del IR.....	42
Figura 20. Identificación de sitios putativos de fosforilación en el IR por PKC.....	44
Figura 21. Efecto de la AngII en la fosforilación de PKC.....	47
Figura 22. Estímulos de AngII para la Inmunoprecipitación de IR con PKC.....	49
Figura 23. Inmunoprecipitación de IR con PKCβII.....	50
Figura 24. Efecto de insulina en la fosforilación de PTP1B Tyr ¹⁵²	52
Figura 25. Efecto de AngII en la fosforilación de PTP1B Tyr ¹⁵²	53
Figura 26. Efecto de AngII en la fosforilación de PTP1B Ser ⁵⁰	54
Figura 27. Efecto de AngII en la fosforilación de PTP1B Tyr ¹⁵² inducida por insulina.....	55
Figura 28. Efecto de AngII en la fosforilación de PTP1B Ser ⁵⁰ inducida por insulina.....	56
Figura 29. Efecto del inhibidor de Akt en la fosforilación de PTP1B Ser ⁵⁰	57
Figura 30. Identificación de sitios putativos de fosforilación en PTP1B.....	58
Figura 31. Efecto de AngII en la fosforilación de Jak2 Tyr ^{1007/8}	59
Figura 32. Efecto del inhibidor de Jak2 en la fosforilación de PTP1B Tyr ¹⁵²	60

Figura 33. El inhibidor de PTP1B a diferentes concentraciones incrementa la fosforilación de Akt Ser ⁴⁷³ inducida por insulina.....	62
Figura 34. El inhibidor de PTP1B a diferentes tiempos incrementa la fosforilación de Akt Ser ⁴⁷³ inducida por insulina.....	63
Figura 35. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de PTP1B Tyr ¹⁵²	65
Figura 36. Efecto de la AngII en la fosforilación de IR Tyr ^{1162/63} inducida por insulina...	66
Figura 37. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de IR Tyr ^{1162/63}	67
Figura 38. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de IR Tyr ¹¹⁵⁸	68
Figura 39. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de Akt Ser ⁴⁷³	69
Figura 40. Evaluación de la expresión de PTP1B en células 3T3-L1 transfectadas con SiRNA.....	70
Figura 41. Efecto del siRNA de PTP1B en la fosforilación del IR Tyr ¹¹⁵⁸	72
Figura 42. Efecto del siRNA de PTP1B en la fosforilación de IR Tyr ^{1162/63}	73
Figura 43. Efecto del siRNA de PTP1B en la fosforilación de Akt Ser ⁴⁷³	74
Figura 44. Modelo de conclusiones.....	85

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Funciones de la insulina y sus mecanismos de acción.....	1
1.2 Mecanismos de regulación de la señal de la insulina.....	5
1.2.1 Internalización.....	6
1.2.2 La Fosforilación en Ser/Thr.....	6
1.2.3 Proteínas fosfatasa.....	7
1.3 Mecanismos moleculares de la resistencia a insulina.....	9
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Mecanismos de señalización de AngII y sus implicaciones en la vía de señalización de la insulina.....	11
2.2 Participación de AngII en resistencia a insulina en tejido adiposo.....	16
2.3 Fosforilación en Ser del IR promueve resistencia a insulina.....	19
2.4 AngII- PKC y resistencia a insulina.....	23
2.5 AngII, PTP1B y la resistencia a insulina.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVO GENERAL.....	31
ETAPA I.....	32
5.1 Objetivos particulares: Etapa 1.....	32
ETAPA II.....	32
5.2 Objetivos particulares: Etapa 2.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Cultivo celular y protocolo de diferenciación de células 3T3-L1.....	33
6.2 Detección de proteínas mediante Western Blot.....	36
6.3 Protocolo de inmunoprecipitación.....	38
6.4 Técnica de disminución de la expresión de la fosfatasa PTP1B (uso de un inhibidor y de siRNAs).....	40
6.5 Análisis de datos.....	40
7. RESULTADOS.....	41
ETAPA 1	
1) El IR es un sustrato de fosforilación en Ser de PKC.....	41
2) AngII activa isoformas clásicas y nuevas de PKC en células 3T3-L1.....	44
3) AngII conduce a la asociación de isoformas clásicas de PKC con el IR.....	48
ETAPA 2	
1) AngII participa en los mecanismos de regulación y activación de PTP1B.....	51
a) Fosforilación en Tyr ¹⁵² de PTP1B.....	51
b) Fosforilación en Ser ⁵⁰ de PTP1B.....	53
2) La activación de PTP1B es regulada por AngII e insulina, mediado por Akt y Jak2.....	56

3) La disminución en la actividad y expresión de PTP1B reduce el efecto de AngII en la señalización de insulina.....	60
a) Uso de un inhibidor específico de PTP1B	60
b) Uso de siRNA de interferencia de PTP1B	70
8. DISCUSIÓN.....	75
9. PERSPECTIVAS.....	87
10. REFERENCIAS.....	88

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Funciones de la insulina y sus mecanismos de acción

La insulina es una hormona de 5.8 kDa que se produce y secreta por las células- β de los islotes pancreáticos; esta hormona es ensamblada en el retículo endoplásmico como prehormona y transportada al aparato de Golgi donde la insulina se empaqueta dentro de gránulos en espera de señales metabólicas (Najjar, 2001). Éste péptido consiste en dos cadenas, las cadenas- α y - β de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, conectadas por puentes disulfuro (Olivares y Arrellano, 2008; Davis y Granner, 2001; de Luca y Olefsky, 2008).

Las funciones más importantes de la insulina son: controlar la concentración de glucosa en sangre entre los 80 y 105 mg/dl, a través de favorecer la incorporación y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo; en hígado favorece su almacenamiento e inhibe su producción. Además, regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y participa en el crecimiento y división celular.

Las acciones biológicas de esta hormona se inician cuando insulina se une a su receptor, receptor de insulina (IR), una glucoproteína integral de membrana, el cual está formado por 2 subunidades- α y 2 subunidades- β (**Figura 1**). Las subunidades- α (de 135 kDa), que contienen el sitio de unión para la insulina, son totalmente extracelulares y se unen entre ellas y a la región extracelular de la subunidad- β a través de puentes disulfuro. Las subunidades- β (de 95 KDa) se componen de un dominio extracelular, un dominio transmembranal, y un dominio intracelular de cinasa, que puede ser activado por autofosforilación (Hubbard, 2013).

El IR pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTKs), el cual al unirse su ligando se auto-fosforila en residuos de tirosina (Tyr). En el estado basal, el asa de activación del IR está situada dentro del sitio activo de la cinasa, lo que limita el acceso de ATP y sustratos de proteínas para sus respectivos sitios de unión. La autofosforilación de las Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ dentro del asa de

activación de la subunidad- β desestabiliza esta conformación, lo que resulta en un cambio que permite el acceso a los sitios de ATP y la unión de sustratos proteicos para su fosforilación (Youngren, 2007).

En el IR se reconocen 3 regiones importantes en el dominio catalítico (del lado intracelular): una región juxtamembranal (JM) que participa en la transmisión de la señal, la cual contiene a los residuos Tyr⁹⁶⁵ y Tyr⁹⁷²; una región reguladora en donde se localizan las Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ y una región en el carboxilo terminal, con los residuos Tyr¹³²⁸ y Tyr¹³³⁴, que al parecer puede jugar un importante papel regulador independiente de la señalización del receptor insulina (**Figura 1**) (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Una vez activo, el IR recluta y fosforila a un grupo de moléculas sustrato, entre ellas destacan los sustratos del receptor de insulina (IRS) 1/4, de los cuales IRS-1 e IRS-2 se consideran como los principales mediadores de las acciones metabólicas de la insulina. Además, se incluyen a las tres isoformas de las proteínas Shc, p60dok, CBL, APS y Gab-1 (Khan y cols., 2002, Saltiel y cols., 2002). Las proteínas IRS no poseen actividad enzimática de cinasa, como el IR, sino que funcionan como moléculas adaptadoras o de andamiaje que organizan la formación de complejos moleculares y de esta forma se desencadenan cascadas de señalización intracelular promovidas por insulina (Olivares Reyes, 2012).

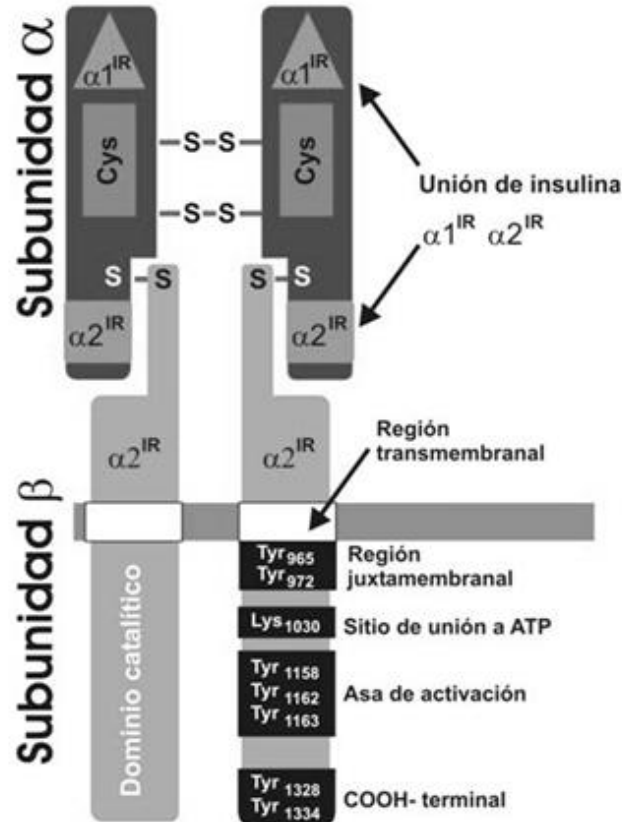


Figura 1. Estructura del receptor de insulina: dominios funcionales del receptor de insulina. En las subunidades-α unidas por puentes disulfuro de cada monómero del IR se encuentran dos sitios de unión a insulina. Las subunidades-β, contienen los dominios catalíticos y de cinasa, donde resaltan los residuos Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ importantes para la autofosforilación y activación del receptor una vez que insulina se une (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

El IRS contiene un sitio de homología al dominio de pleckstrina (PH) conservado, que se encuentra en su extremo amino y con el cual se une con los fosfoinosítidos de membrana. El dominio PH está flanqueado por un dominio de unión a fosfotirosina (PTB) que funciona como un sitio de unión al motivo NPXY en el dominio JM del IR. En la región C-terminal el IRS contiene varios motivos de fosforilación de Tyr que sirven para el acoplamiento con proteínas que contienen dominios SH2, como la subunidad reguladora de PI3K p85, Grb2, Nck, Crk, Fyn, SHP2, entre otras (Liu y cols., 2004).

La mayoría de las acciones de la insulina se llevan a cabo por la activación de dos principales vías de señalización: la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) /Akt, la cual es

responsable de sus acciones metabólicas, y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)/Ras que regula la expresión génica y los efectos mitogénicos asociados a la insulina (**Figura 2**). La enzima PI3K tiene un importante papel en la estimulación del transporte de glucosa, síntesis de glucógeno y de proteínas, adipogénesis, proliferación y la supervivencia celular (Manning y Cantley, 2007; Sale y Sale, 2008). Esta enzima se asocia a IRS cuando se encuentra fosforilado en tirosina después de la estimulación con insulina; la subunidad reguladora p85 asociada al IRS experimenta un cambio conformacional que conduce a la activación de la subunidad catalítica p110, la cual cataliza la formación de fosfatidilinositol-3, 4,5-trisfosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2). El fosfoinositido PIP3 funciona como un sitio de anclaje para proteínas cinasas de serina/treonina (Ser/Thr), como la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK-1) y Akt (o proteína cinasa B, PKB) (Olivares, 2012). Akt participa de forma muy importante en la incorporación de glucosa en músculo y tejido adiposo al favorecer la translocación de la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT4), de vesículas localizadas intracelularmente a la membrana celular. Así mismo, Akt participa en la inhibición de la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno en el hígado y en la síntesis de lípidos en tejido adiposo y proteínas en tejido muscular (**Figura 2**). Por otra parte, las MAPKs son activadas por insulina a través de un mecanismo que implica la asociación de Shc con el IR, lo que a su vez une a las proteínas Grb2-SOS (SOS es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF) y posteriormente lleva a la activación de Ras, lo que desencadena la activación de las MAPK, primero de Raf-1, después el reclutamiento y activación de MEK y finalmente de ERK. Este mecanismo de activación también puede ser a través de IRS e independiente de Shc. Una vez activas, las MAPK pueden fosforilar sustratos como factores de transcripción como Elk1 y otras cinasas (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017).

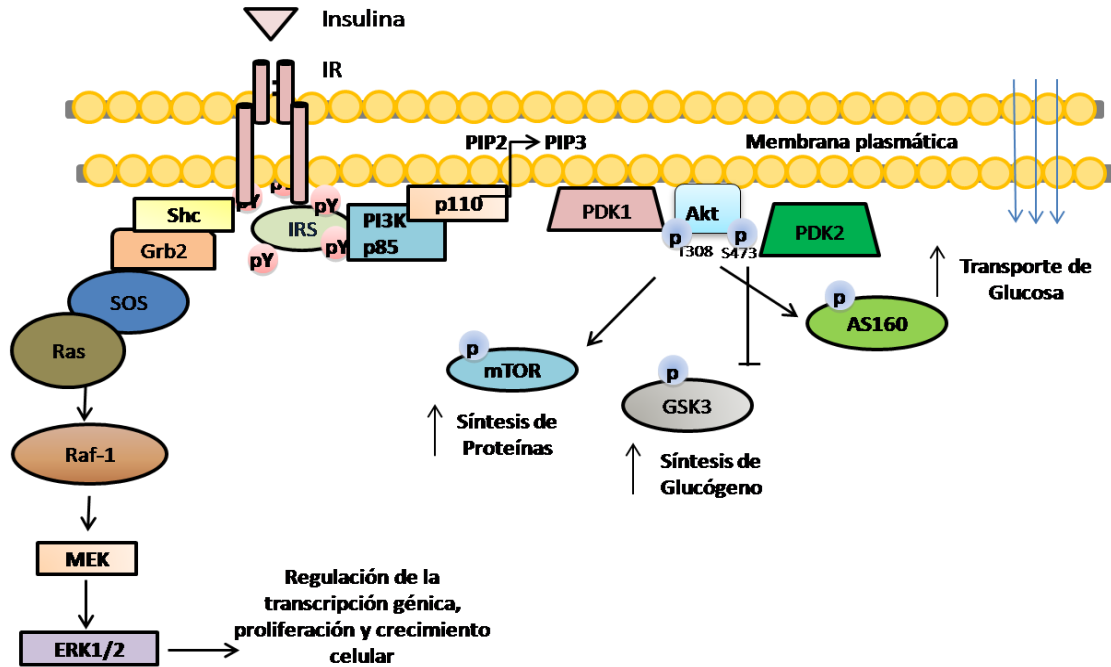


Figura 2. Principales vías de señalización de insulina. La unión de insulina con su receptor lleva a la autofosforilación de este en residuos de Tyr, lo que permite la asociación de proteínas sustrato como IRS y Shc. El IRS fosforilado en Tyr une a PI3K lo que conduce a la activación de la cascada de señalización río abajo para la activación de Akt y otros efectores importantes en la incorporación de glucosa, síntesis de proteínas, etc. La unión de Grb2 a Shc lleva a la activación de las MAPKs que controlan la proliferación y el crecimiento celular (Modificado de Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017).

1.2 Mecanismos de regulación de la señal de la insulina

Las acciones de la insulina son reguladas gracias a distintos mecanismos que pueden ser llevados a cabo por enzimas activadas mediante su propia vía, conocidos como mecanismos de autorregulación o de desensibilización homóloga, en donde la insulina promueve la inhibición de la actividad de proteínas clave de su señalización, como el IR o sus sustratos IRS. Además, puede ser regulada por señales de vías no relacionadas por mecanismos de desensibilización heteróloga (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017) (**Figura 3**).

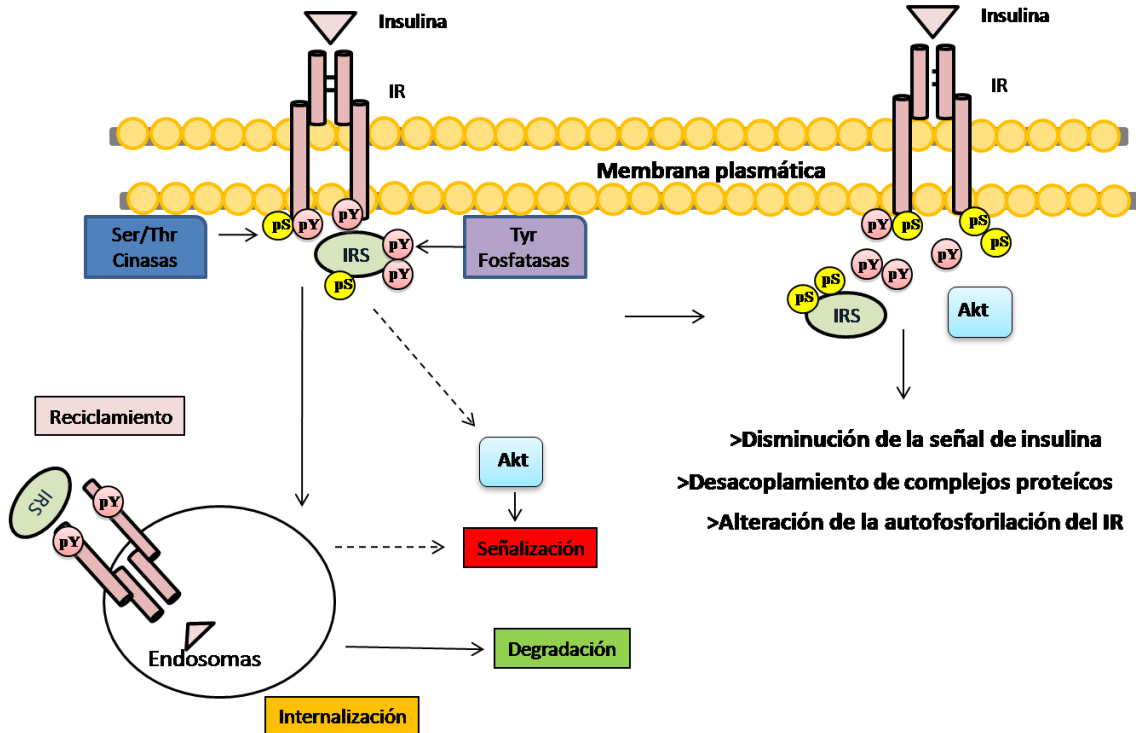


Figura 3. Mecanismos de regulación de la señal de insulina. La vía de señalización de insulina es modulada por diversos mecanismos como: La endocitosis y reciclamiento del IR, la desfosforilación en Tyr y la fosforilación en Ser en IR o IRS. Estos mecanismos regulan la señal de la insulina a nivel del IR ó de proteínas río abajo de éste, desacoplando la formación de complejos proteicos y alterando su actividad y por lo tanto disminuyendo la cascada de señalización (Modificado de Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

1.2.1 Internalización

A nivel del IR, uno de estos mecanismos de regulación es la internalización del receptor, mecanismo que controla el número de receptores en la membrana plasmática disponibles para la unión con su ligando y por lo tanto la activación de las distintas vías de señalización (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017). Se conoce que una vez que el IR se activa, el complejo IR-insulina puede ser internalizado para ser reciclado o ser degradado, mediante la inclusión en vesículas recubiertas de clatrina y/o caveolas que conducen al IR a endosomas primarios, en donde la insulina puede ser disociada por el pH ácido y posteriormente degradada por la insulina endosomal (Fagerholm y cols., 2009). Durante

este paso el IR puede ser desfosforilado por fosfatasa de Tyr y se recicla a la membrana plasmática (Romsicki y cols., 2004) o puede ser degradado por un mecanismo en donde se ha propuesto que participa la proteína APS y la ubiquitina ligasa c-CBL (Joazeiro y cols., 1999 y Posner y cols., 2003).

1.2.2 La Fosforilación en Ser/Thr

La fosforilación es la modificación pos-transduccional por la cual, las proteínas cinasas transfieren un γ -fosfato del ATP a los aminoácidos específicos en las proteínas, principalmente en residuos de Ser, Thr y Tyr. Cómo ya se mencionó la fosforilación del IR en Tyr es importante para activar su cascada de señalización; sin embargo, diversos estudios han mostrado que la fosforilación del IR e IRS en residuos de Ser/Thr reduce la señalización y puede ser desencadenante de la resistencia a insulina (Ugi y cols., 2004).

Después del estímulo con insulina, el IR e IRS-1 se fosforilan de manera notable, no únicamente en residuos de Tyr sino también en residuos de Ser/Thr. En este contexto, la principal cinasa que interviene en este tipo de fosforilación en el IR es la proteína cinasa C (PKC), la cual media la fosforilación en las regiones juxtamembranal, catalítica y C-terminal del receptor; sin embargo, aún se desconoce cómo afecta esta fosforilación la actividad de cinasa del IR, su autofosforilación y la cascada de señalización (Youngren, 2007). En el IRS-1, de un total de 232 residuos en la proteína, alrededor de 70 residuos son sitios potenciales de fosforilación de Ser/Thr. La fosforilación en residuos de Ser/Thr de IRS puede llevarlo a: a) desacoplarse del IR, lo que altera su capacidad de experimentar fosforilación en residuos de Tyr; b) su disociación de complejos intracelulares que lo mantienen en cercanía con el IR; c) su degradación o bien, d) convertirlas en proteínas inhibitoras de la actividad de cinasa del IR (Engelman y Settleman, 2006; Paz y cols., 1997; Zick, 2001; Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017).

1.2.3 Proteínas fosfatasa

En contraste de las cinasas, las proteínas fosfatasa son los efectores primarios de la desfosforilación, estas son enzimas que eliminan un grupo fosfato de residuos de Ser/Thr y /o Tyr de su sustrato, a través de hidrólisis de mono ésteres de ácido fosfórico en un ion fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre (Moorhead y cols., 2007). Diversas fosfatasa de serina pueden regular la señalización de insulina, por ejemplo, PP1, que modula positivamente al estimular la actividad de la sintasa de glucógeno (Armstrong y cols., 1998). Por otra parte, PP2A y PHLPP también participan, pero afectando la regulación de glucógeno hepático al activar a FoxO1 e inactivar Akt (Mistafa y cols., 2010; Gao y cols., 2005)

Debido a que la fosforilación en Tyr representa un mecanismo clave para la activación del IR e IRS, la desfosforilación de estos residuos por acción de proteínas fosfatasa de Tyr (PTPs por sus siglas en inglés) representa un componente indispensable en la regulación de la señalización de insulina (Youngren, 2007 y Faucherre y cols., 2008). En este aspecto, se ha visto que están involucradas de forma directa o indirecta las PTPs como LAR, PTP1B, SHP1 y SHP2 (Hashimito y cols., 1992; Frangioni y cols., 1992; Egawa y cols., 2001; Goldstein y cols., 2000; Dubois y cols., 2006; Kuhne y cols., 1994).

En particular se ha observado que LAR (Fosfatasa relacionada al antígeno común de leucocito) interactúa con el IR y lo desfosforila (Ahmad y cols., 1997). Por su parte, la fosfatasa de Tirosina 1B (PTP1B) es particularmente importante en la regulación del IR y es un regulador fisiológico de la homeostasis de la glucosa (Galic y cols., 2005). PTP1B también puede desfosforilar componentes más distales de estas vías de señalización como IRS1 (Goldstein, 2001). En los seres humanos, polimorfismos de la PTP1B se asocian con resistencia a la insulina, la obesidad, y otras características del síndrome metabólico (Kipfer y cols., 2004). Por otra parte, en mecanismos asociados con inflamación y el deterioro de la sensibilidad a insulina en obesidad, se ha encontrado que PTP α juega un papel crucial en la señalización de IL-1 β (Rajshankar y cols., 2013). En la señalización de PI3K-Akt, se conoce que participan como reguladores negativos las fosfatasa de lípidos PTEN (fosfatasa y homólogo de tensina) y SHIP2 (fosfatasa 2 de inositol 5 fosfato que contiene

dominio SH2) que interviene en la desfosforilación de PIP3 en las posiciones 3'y 5'respectivamente (Ogg y cols., 1998; Wada y cols., 1999; Lazar y cols., 2006; Sigal y cols., 2005). Por último, SHP1 y SHP2 también modulan la acción de insulina y la homeostasis de glucosa; SHP1 se ha visto que inhibe la incorporación de glucosa por reclutar el IR cuando se encuentra asociado al complejo Cdk2/SHP1/ β -catenina/CEACAM1 (Fiset y cols., 2011). SHP2, por su parte se ha visto que ocasiona efectos tanto positivos como negativos en las acciones de insulina (Matsuko y cols., 2010).

1.3 Mecanismos moleculares de la resistencia a insulina

La resistencia a la insulina es uno de los elementos más constantes en casos clínicos relacionados con el síndrome metabólico (Olivares-Reyes, 2012). Esta condición es generalmente referida como la reducción biológica de los efectos de la insulina (Biddinger y Kahn, 2006) y está relacionada estrechamente con el desarrollo de Diabetes Mellitus tipo II (DM2) y enfermedades cardiovasculares (Saltiel y Kahn, 2001).

En pacientes con DM2, la secreción de insulina por las células β -pancreáticas es por definición insuficiente para compensar la resistencia a la insulina vigente. De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, además de alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático. En el hígado, la disminución en la sensibilidad a la insulina conduce, por una parte, a la reducción en la captación y almacenamiento de la glucosa y, por otra, al incremento en la producción y liberación de glucosa y de lipoproteínas de muy baja densidad. También, puede conducir a la desregulación de la producción y secreción de adipocinas. (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017; Sjostrand y Eriksson, 2009).

A nivel celular, el término de resistencia a la insulina se define como una inadecuada señalización celular (Sykietis y Papavassiliou, 2001; Reaven, 2004). En algunos casos se debe a un defecto en la unión de la insulina al IR, o alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor y las actividades celulares de la

insulina, que afecta múltiples aspectos metabólicos y mitogénicos de la función de proteínas localizadas río abajo del mismo (**Figura 4**) (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017).

Diversos estudios en modelos animales y en humanos con resistencia han mostrado reducción de la señalización de la vía de IRS/PI3K/Akt activada por la insulina, y como resultado hay disminución en la captura de glucosa y su utilización por tejidos blanco de la insulina. Entre las alteraciones más comunes que contribuyen a un detrimento de las acciones de la insulina se han descrito: 1) disminución en el número de receptores de insulina y de su actividad de cinasa de tirosina; 2) aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr del IR e IRS, 3) disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y 4) defectos en la expresión y función del transportador de glucosa GLUT4 (**Figura 4**). De estas alteraciones el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel de las proteínas IRS se considera como un mecanismo clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Por ejemplo, en hígado, músculo y tejido adiposo de pacientes obesos (tejidos que tienen importante papel en el desarrollo de la resistencia a la insulina), se ha encontrado un aumento en el estado de fosforilación de residuos de Ser/Thr de las proteínas IRS, así como una disminución en su expresión de 54% (Sun y Liu, 2009). El aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr de IRS puede ser inducido por diferentes agentes, como: el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), AngII, ácidos grasos libres, aminoácidos, endotelina 1 e hiperinsulinemia. Estos agentes aumentan la actividad de proteínas cinasas que fosforilan a IRS en residuos de Ser/Thr, tales como PKC, mTOR, p70 S6K (cinasa S6K1), proteína cinasa A (PKA) y MAPKs (Gutiérrez-Rodelo y cols, 2017; Arellano-Plancarte y cols., 2010).

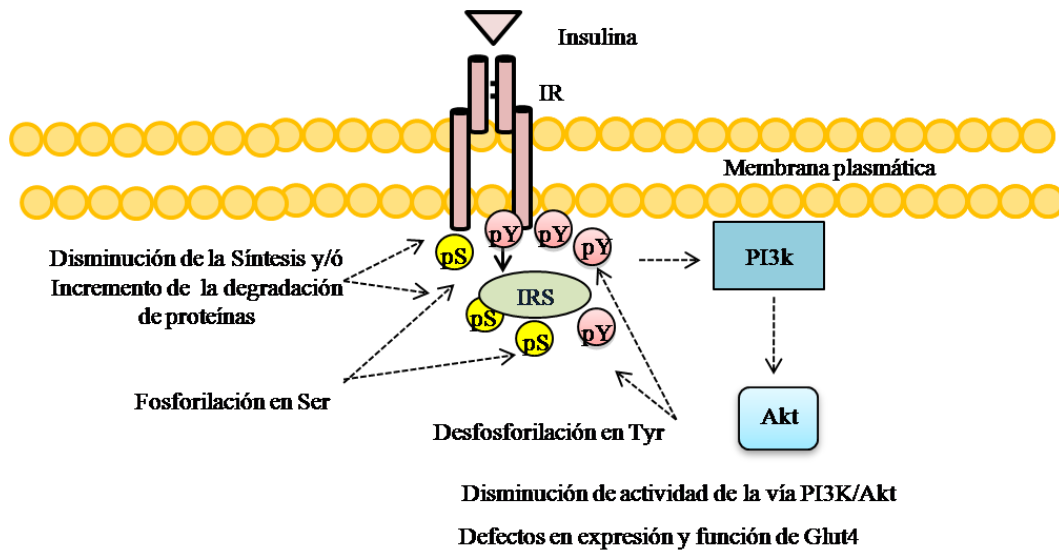


Figura 4. Mecanismos de resistencia a insulina. Las alteraciones más comunes que están implicadas en afectar la señalización a insulina y causar resistencia a insulina son: 1) disminución en el número de IR e IRS; 2) disminución de actividad de cinasa de tirosina del IR; 3) aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de IR e IRS, 4) disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y 5) defectos en la expresión y función del transportador de glucosa GLUT4 (Modificado de Olivares Reyes y Arellano Plancarte, 2008).

2. ANTECEDENTES

2. 1 Mecanismos de señalización de AngII y sus implicaciones en la vía de señalización de la insulina

El sistema renina-angiotensina (SRA) clásico tiene un papel importante en la regulación de la presión arterial (PA) por medio de la liberación de AngII y el equilibrio hidrosalino, a través de la liberación de aldosterona. Éste sistema se activa en respuesta a la disminución de la PA, como resultado de la restricción de sodio o hipovolemia, secretando renina, que se libera a la sangre circulante, iniciando una serie de pasos de síntesis e hidrólisis hasta conducir a la activación del receptor de AngII (ATR): 1) La proteasa renina liberada por las células yuxtglomerulares del riñón, hidroliza el enlace peptídico entre los residuos Leu-10 y Val-11 del angiotensinógeno (AGT), glucoproteína- β 2 plasmática de 453 aminoácidos (55-61 kDa) sintetizada en el hígado para producir el decapeptido AngI. Este decapeptido es hidrolizado en el dipéptido terminal His-9–Leu-10 por la enzima convertidora de

angiotensina (ECA), secretada por las células endoteliales de los pulmones y de los riñones, y la convierte en un octapéptido, la AngII. La AngII actúa a través de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) AT₁R y AT₂R (Than y cols., 2013).

Se ha puesto en evidencia que, además del SRA clásico, existe un SRA local en la mayoría de los órganos y tejidos. Este sistema local SRA se caracteriza por la presencia de sus componentes (AGT y las ECAs), por la síntesis local de AngII y otros péptidos derivados de la angiotensina, y por su unión a receptores específicos. Además de la participación de receptores de renina-prorenina, generando respuestas fisiológicas a nivel local, convirtiendo al SRA en un sistema paracrino y autocrino. Estos sistemas están regulados independientemente del SRA sistémico, pero pueden interactuar con él. Se han identificado SRA locales en el corazón, riñón, cerebro, páncreas, aparato reproductor, sistema linfático y el tejido adiposo. Algunas de las funciones locales del SRA son tan variadas como el crecimiento y el remodelado del corazón, la regulación de la presión arterial, la estimulación del apetito o la secreción hormonal pancreática (Lago y cols, 2011). De esta forma, la AngII puede ser hidrolizada por la ectoenzima ECA2 a los péptidos Ang 1-7, AngIII (Ang 2-8 heptapéptido) y la AngIV (Ang 3-8 hexapéptido), los cuales han demostrado ser biológicamente activos por unirse a receptores funcionales específicos, al igual que la AngII. Además, la angiotensina 1-7 al activar a su receptor, el GPCR Mas (Mas receptor) usualmente antagoniza las acciones de AngII (Ferrario y cols., 1991; Than y cols., 2013; Santos y cols., 2015) (**Figura 5**). Por consiguiente, el SRA es bastante complejo y que solamente, en la medida que se conozca más a profundidad cómo interactúan cada uno de sus componentes y las funciones que desempeñan, se podrán dilucidar mejores conductas preventivas y terapéuticas, no solo para la hipertensión arterial, sino también para toda una gama de afecciones en que este sistema tiene un papel fisiopatológico (Keidar y cols., 2007).

celulares críticos como el crecimiento, efectos proliferativos, anti-proliferativos y la migración celular (Arellano Plancarte y cols., 2010) (**Figura 6**).

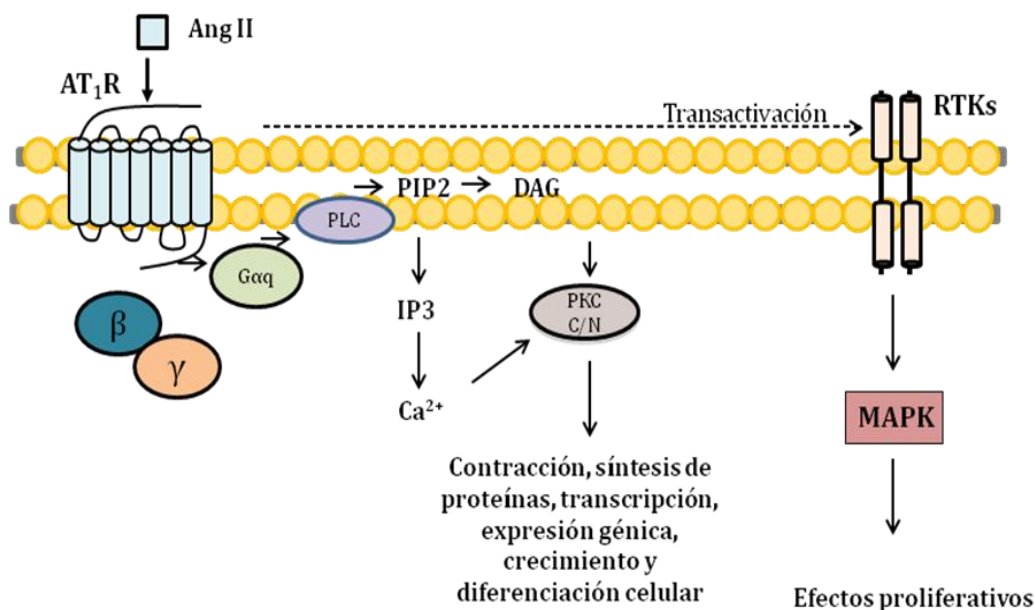


Figura 6. Vías de señalización de AngII. La activación del receptor AT₁ promueve la activación del trómero α - β - γ de la proteína Gq, que al ser activado se disocia en la subunidad- α y el dímero- β γ . La subunidad- α activa a la fosfolipasa C- β , la cual degrada fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en la membrana plasmática, generando DAG e inositol trisfosfato (IP₃). El IP₃ aumenta el calcio intracelular y junto con DAG puede activar diferentes isoformas clásicas y nuevas de PKC. Alternativamente, la AngII/AT₁R induce la activación de RTKs como los receptores de PDGF y EGF, así como proteínas río abajo como cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Modificado de Olivares-Reyes y cols., 2009).

Las acciones de AngII en la señalización de la insulina han sido descritas en células cardiovasculares. Existe evidencia experimental y clínica que sugiere que varias condiciones patológicas, como resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes producen una combinación de disfunciones endoteliales, las cuales disminuyen el papel anti-aterogénico del endotelio vascular (Kim y cols., 2006; Hadi y Suwaidi, 2007). En este sentido, la actividad de AngII en las células endoteliales, representa una contribución importante para regular funciones normales endoteliales y vasculares, ya que la resistencia

a la insulina ha sido considerada como un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades como la hipertensión y la aterosclerosis. Estudios clínicos y farmacológicos recientes han mostrado que la hiperactividad de RAS perjudica la señalización de la insulina y contribuye a la resistencia a la insulina. Se ha observado que, inhibidores de ECA (IECAs) y los antagonistas del AT₁R mejoran la sensibilidad a la insulina. En un trabajo donde se evaluó el efecto de ramipril (un IECA) en los eventos cardiovasculares en una población de hombres y mujeres, muchos de ellos con diabetes, se observó que los pacientes que recibieron ramipril mostraron una reducción del riesgo de accidente cerebrovascular, de infarto de miocardio y una reducción significativa en el desarrollo de DM2 en pacientes sin diabetes al inicio del estudio (Yusuf y cols., 2000). Por otra parte, utilizando ratas obesas Zucker, se encontró que con tratamiento a largo plazo con ibesartán (antagonista del AT₁R) aumenta la fosforilación en Tyr del IR, disminuye fosforilación de IR en Ser⁹⁹⁴, aumenta la fosforilación en Tyr de IRS-1-2 y aumenta la asociación entre el IRS y PI3K, aumentando también la fosforilación de Akt inducida por la insulina y disminuye la esteatosis hepática (Coba y cols., 2004; Muñoz y cols., 2006). Por otra parte, se ha estudiado que, en el corazón, una infusión intravenosa de AngII inhibe la activación de PI3K y Akt estimulada por insulina (Carvalho y cols., 2003). Además, se ha observado que en células vasculares la AngII interfiere con la señalización de insulina por afectar principalmente fosforilación en Tyr de IRS-1 inducida por insulina y su interacción con la subunidad p85 reguladora de PI3K (Andreozzi y cols., 2004). En este contexto, se ha propuesto que en células C9 de hígado de rata, la AngII inhibe la activación de Akt inducida por insulina y de su sustrato inmediato GSK-3 α/β , asociado con un incremento en la fosforilación la Ser⁶³⁶ y la Ser⁶³⁹ de IRS-1 mediado por la activación del receptor EGF, a través de la vía de PI3K/mTOR/S6K-1 (Arellano-Plancarte y cols., 2010).

Aunque en los estados de resistencia a la insulina, la acción de esta hormona también se ve afectada en el tejido adiposo, relativamente pocos estudios han explorado el papel de la AngII en el desarrollo de la resistencia a la insulina en este tejido.

2.2 Participación de AngII en resistencia a insulina en tejido adiposo

El tejido adiposo contiene todos los componentes del SRA (Cassis y cols., 2008). Se ha demostrado que los adipocitos liberan los péptidos de AGT ó angiotensinas que pueden ejercer efectos autocrinos y paracrinos para regular las funciones de los adipocitos, en donde AngII puede regular el crecimiento y diferenciación del adipocito, los componentes del SRA, el metabolismo de lípidos, la expresión y la liberación de adipocinas, y que promueve el estrés oxidativo (Cassis y cols, 2000). Se conoce, además, que los adipocitos expresan a los receptores AT₁, AT₂ y Mas, los cuales están implicados en la regulación autocrina del SRA local; sin embargo, los mecanismos de interacción entre estos receptores aún no están bien establecidos (Kalupahana y cols., 2012). Recientemente se ha revelado que la vía ECA-AngII-AT₁R y la vía ECA2-Ang (1-7)-MasR regulan diversas funciones de los adipocitos, pero de manera antagónica (Santos y cols., 2013). Por ejemplo, se ha descrito que la AngII/AT₁R inhibe la lipólisis y la incorporación de glucosa inducida por insulina, mientras que la vía de Ang (1-7)-MasR hace lo contrario (Oh y cols., 2012 and Liu y cols., 2012). Además, se ha estudiado que la vía de AngII/AT₁R induce estrés oxidativo en adipocitos, mientras que la interacción Ang (1-7)-MasR lo suprime (Liu y cols., 2012).

Además, el tejido adiposo es considerado como una fuente importante de AGT local y circulante, y podría participar por eso en la regulación de la PA sistémica. Estudios en humanos con obesidad e hipertensión, muestran un incremento de AngII en tejido adiposo, lo que sugiere que esta hormona puede estar implicada en la patogénesis de la obesidad y de la resistencia a la insulina (Achard, y cols., 2007; Engeli y cols., 2000). Además, el tejido adiposo expresa receptores de renina-prorenina que parecen estar involucrados en la regulación de la acumulación del tejido adiposo visceral. De esto se deduce que el SRA de este tejido puede ser importante en la fisiopatología del síndrome metabólico (Wu y cols., 2016).

Al respecto, los hallazgos relacionados a los mecanismos moleculares por los que AngII participa en resistencia a insulina en tejido adiposo, hasta el momento son contradictorios. Baba y cols., (1998) informaron que, en adipocitos derivados de tejido adiposo de humano

eliminado quirúrgicamente, el tratamiento de AngII no tuvo ningún efecto en la actividad de cinasa del IR (**Figura 7**).

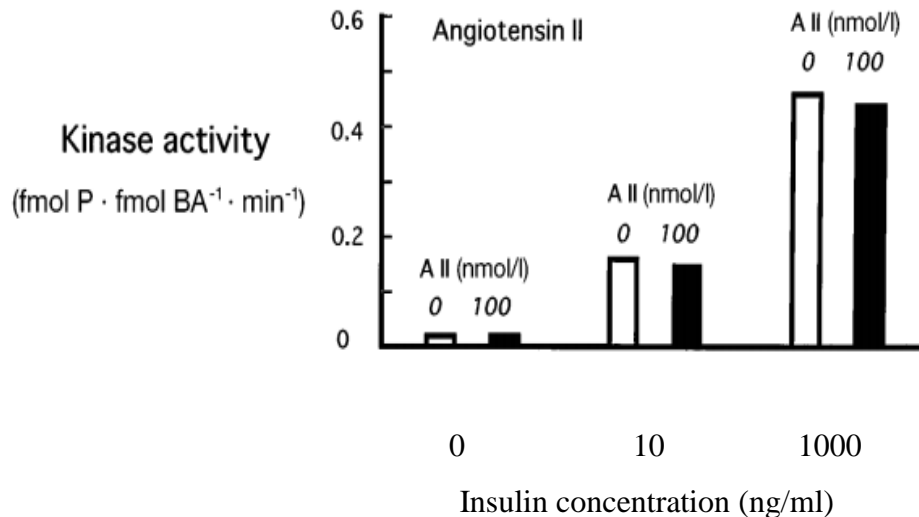


Figura7. Efecto de AngII en la actividad de cinasa del IR. En la imagen se muestra que AngII no afecta la actividad de cinasa del receptor de insulina inducida por insulina, en adipocitos aislados de humano (Baba y cols., 1998).

Por el contrario, Juan y cols (2005), reportaron que en adipocitos aislados de rata, el tratamiento con AngII incrementó la fosforilación en Tyr del IR, la fosforilación de Akt, y la incorporación de glucosa, estimulados con insulina, proporcionando pruebas de que la AngII puede potenciar las acciones de la insulina a través del AT₁R y sugiriendo que la desregulación de la sensibilidad a insulina por el efecto de AngII puede estar involucrada con el desarrollo de resistencia a insulina (**Figura 8**).

Por otra parte, estudios *in vivo* por el grupo de Ogihara y cols (2002) demostraron que en tejido adiposo aislado de epidídimo de rata, la infusión crónica de AngII promueve estrés oxidativo y resistencia a insulina por incrementar la fosforilación en Tyr de IR e IRS, además de incrementar la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ (**Figura 9**).

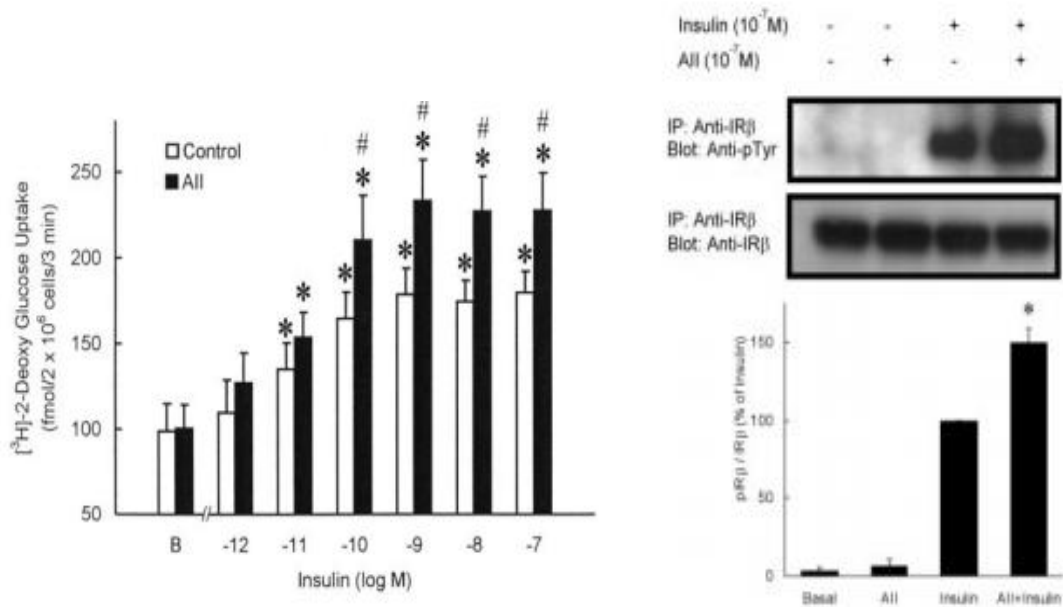


Figura 8. AngII promueve la incorporación de glucosa estimulada por insulina y la fosforilación en Tyr del IR. La imagen muestra que AngII en adipocitos de rata, promueve un incremento en la incorporación de glucosa (izquierda) y en la autofosforilación del IR (derecha) mediados por insulina (Juan y cols., 2005).

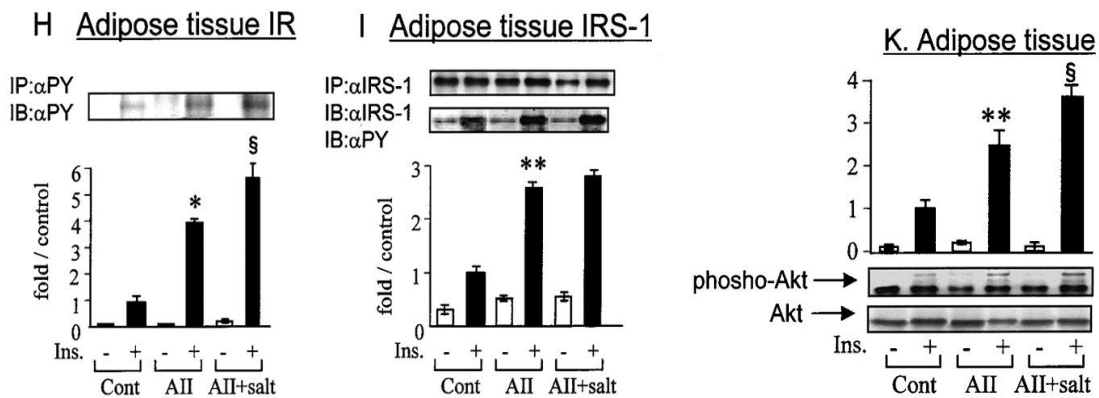


Figura 9. AngII promueve un incremento en la señalización de insulina. En tejido adiposo aislado de epidídimo de rata, la administración intravenosa de AngII por 12 días 100 ng/kg (dieta normal o alta en sal), incrementa la fosforilación en Tyr de IR (H), IRS-1 (I) y Ser de Akt (K) comparado con su control (Ogihara y cols., 2002).

Contrario a lo descrito, estudios en nuestro laboratorio, muestran que la AngII induce resistencia a la insulina en células adiposas 3T3-L1 por un mecanismo que disminuye el

estado activo del IR y de la consecuente disminución de la actividad de Akt y de la incorporación de glucosa inducida por insulina (**Figura 10**) (Gutiérrez, 2013).

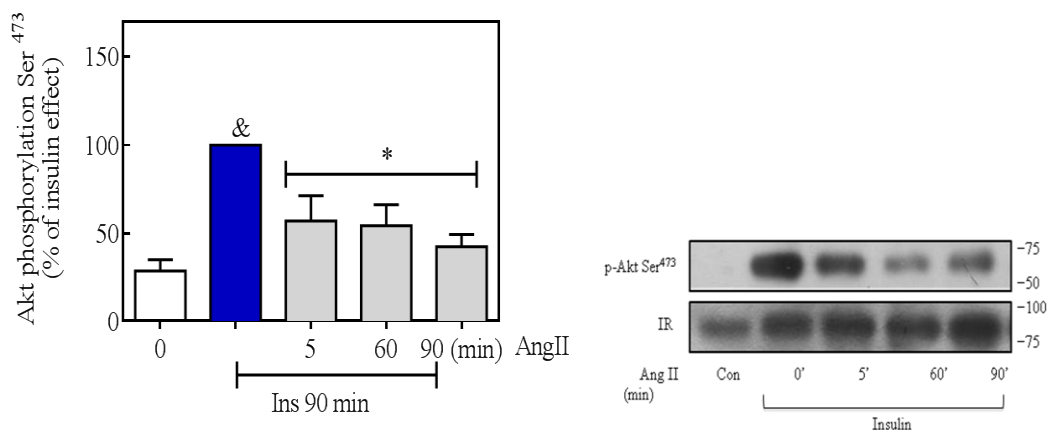


Figura 10. AngII reduce la fosforilación de la Ser⁴⁷³ de Akt inducida por insulina. Se estimularon las células con 100 nM de AngII durante 5, 60, y 90 min y se incubó con 100 nM de insulina por 90 min. Se observa que AngII disminuye la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³ inducido por insulina (Gutiérrez, 2013).

2.3 Fosforilación en Ser del IR promueve resistencia a insulina

Se conoce que la fosforilación en Ser del IR y/o IRS ha sido implicada como un mecanismo potencial en la resistencia a insulina (Harig, 1991; Ugi y cols., 2004). Existe evidencia de que el aumento en la fosforilación de Ser/Thr del IR altera su autofosforilación en respuesta a la insulina y este mecanismo se define como una forma de regulación negativa en esta vía de señalización. En este contexto, diversos agentes han sido relacionados con inducir fosforilación en Ser del IR. Por ejemplo, se ha visto que las catecolaminas, al unirse a sus receptores β -adrenérgicos, inician un proceso de señalización que promueve la activación de la adenilato ciclasa, el incremento intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) y la activación de la PKA (Walsh y Van, 1994). Se ha sugerido que la PKA fosforila directamente al IR inhibiendo su actividad de cinasa de Tyr y así induce resistencia a insulina; esta hipótesis es soportada por el hallazgo de que la elevación intracelular de AMPC incrementa la fosforilación en Ser del receptor en células intactas y

disminuye su habilidad para funcionar como cinasa de Tyr estimulada por insulina (Haring y cols 1994, Stadtmayer y cols., 1986).

Por otra parte, los ésteres de forbol provocan efectos antagónicos en las acciones de insulina por activar diferentes isoformas de PKC. La activación de la PKC mediada por ésteres de forbol estimula la fosforilación en Ser/Thr del IR en células intactas (Tacayama y cols., 1984; Hachiya y cols., 1987) inhibiendo la autofosforilación del receptor estimulado por insulina (Tacayama y cols., 1984).

Durante el trabajo de maestría, se evaluó el efecto de la insulina en la fosforilación en Ser del IR en las células adiposas 3T3-L1, demostrando que este mecanismo de autorregulación negativa está presente en nuestro modelo de estudio (**Figura 11a; círculos azules**). De manera interesante, también observamos que la AngII es capaz de inducir a la fosforilación en Ser del receptor de insulina (**Figura 11a; círculos negros**). Para tener una caracterización general de las cinasas que pueden estar participando en las acciones de la AngII en un modelo de células adiposas, se utilizó el inhibidor bisindolilmaleimida (BIM), observando que el BIM, revierte el efecto de la AngII en la fosforilación en serina del IR y la fosforilación de Akt inducida por insulina, sugiriendo la participación de la PKC en las acciones de la AngII en células adiposas 3T3-L1 (**Figura 11b**).

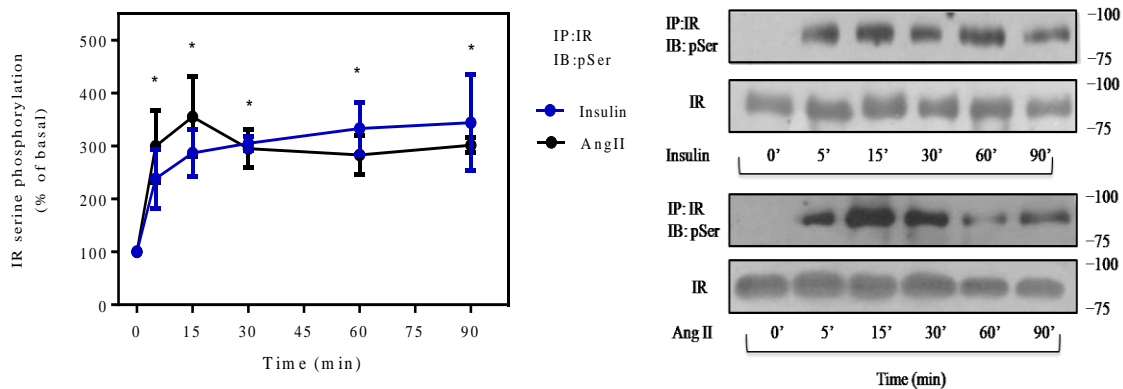


Figura 11a. Insulina y AngII promueven la fosforilación en Ser de IR. Se estimularon las células 3T3-L1 con 100 nM de insulina (círculos azules) ó AngII (círculos negros) durante 5, 15, 30, 60 y 90 min. Se observa que ambas hormonas promueven un efecto dependiente del tiempo en la fosforilación en residuos de serina del IR (Gutiérrez, 2013).

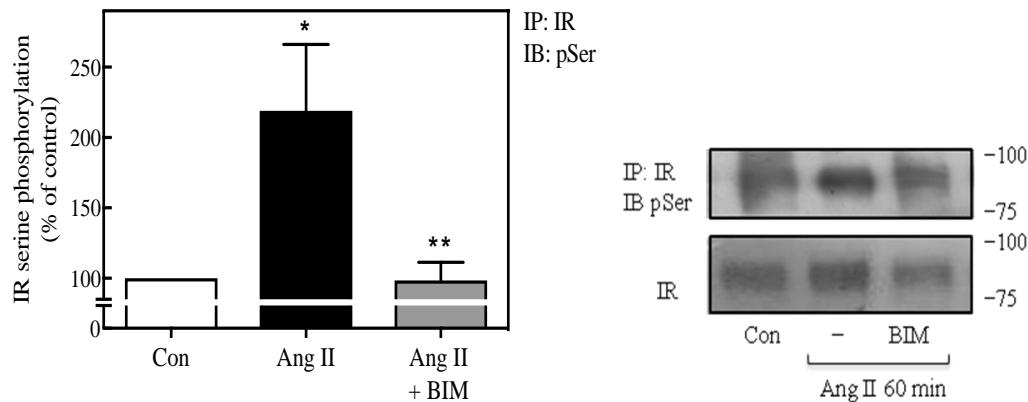


Figura 11b. El inhibidor de PKC BIM, previene la fosforilación en Ser de IR promovida por AngII. Se estimularon las células con 2 μ M de BIM 30 min más AngII 100 nM durante 60 min ó AngII sola durante 60 min. Se observa que el inhibidor de PKC previene el efecto de AngII en la fosforilación en residuos de serina del IR (Gutiérrez, 2013).

En este sentido, se conoce que la fosforilación en residuos de Ser/Thr de IRS está implicada en mecanismos de atenuación de la señal de insulina que desacopla la unión del IRS de proteínas efectoras de la vía de insulina como lo es la PI3K (Youngren, 2007; Ugi y cols., 2004). Actualmente se sabe que, en la mayoría de los casos, la fosforilación de estos residuos en IRS-1 e IRS-2 están regulados por mecanismos complejos que involucran la participación de cinasas estimuladas por insulina, que incluyen PKC atípicas (ζ y λ), Akt, SIK2, mTor, S6K, ERK 1/2 y ROCK1 con efectos positivos y negativos en la sensibilidad a insulina (Capps, 2012). Sin embargo, además de insulina, se ha estudiado que el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr de IRS puede ser inducido por diferentes agentes. Al respecto, en células de músculo liso de aorta, se demostró que la AngII inhibe la asociación entre IRS y la subunidad p85 de PI3K estimulada por insulina en 30-50%, de forma dependiente de la concentración; este efecto inhibitorio de la AngII en IRS/PI3K se bloqueó con un antagonista del receptor AT₁ (Folli y cols., 1997).

Con estos antecedentes, se decidió evaluar durante el trabajo de maestría la fosforilación en Ser de IRS inducida por insulina y por AngII. Se encontró que la insulina a partir de 5 min induce la fosforilación en Ser de IRS (**Figura 12**; círculos azules), así mismo, se observó que la AngII no promueve la fosforilación en residuos de Ser del IRS (**Figura 12**; círculos negros). Con estos resultados se sugiere que el mecanismo por el que la AngII participa en

la regulación de la vía de señalización de insulina en adipocitos, podría estar involucrando directamente en la regulación del IR, al promover la fosforilación en Ser del mismo y no en IRS (Gutiérrez, 2013).

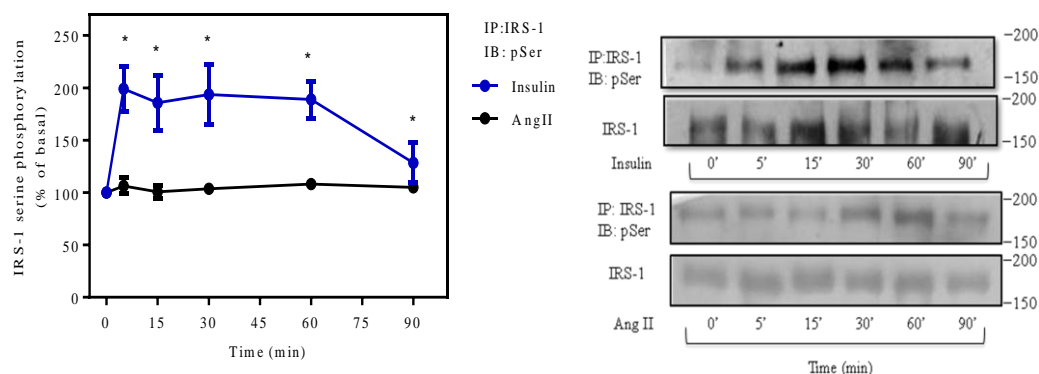


Figura 12. Efecto de insulina y AngII en la fosforilación en Ser de IRS. Se observa que sólo insulina tiene un efecto en promover fosforilación en residuos totales de Ser del IRS-1 (Gutiérrez, 2013).

2.4 AngII-PKC y resistencia a insulina

Algunas de las moléculas de señalización implicadas en las acciones metabólicas y mitogénicas de la insulina, también se han propuesto como componentes importantes tanto en la inhibición de la retroalimentación de la señal de insulina como en la resistencia a la insulina celular.

En este contexto, la PKC está involucrada en funciones clave de la intercomunicación entre las vías de señalización (Masatoshi y cols., 2002). Se han descubierto hasta 12 miembros de la familia de PKC en células de mamífero. El descubrimiento inicial de la enzima como una enzima activada por calcio, por Nishizuka y cols., (2012), fue seguida por el hallazgo de que la PKC era el blanco principal del metabolito lipídico DAG (Inoue y cols., 1997; Kishimoto y cols., 1980).

Las isoformas de PKC de mamíferos se han subdividido en tres subfamilias distintas de la siguiente manera: PKC convencionales ó clásicas (PKCc) que incluyen las isoformas α , β I,

β II, y γ ; PKC nuevas (PKCn), que incluyen a δ , ϵ , η y θ y PKC atípicas (PKCa), que comprenden a ζ y λ . Las cPKCs α , β I, β II, y γ fueron las primeras descritas y se activan *in vitro e in vivo* por fosfatidilserina (PS) de manera dependiente de calcio. Además, se unen a y son activadas por DAG, lo que aumenta la especificidad de la enzima para PS y calcio (Newton, 1995). Las PKCn también son activadas por DAG y requieren PS como cofactor, pero han perdido el requerimiento de calcio, esto debido a la ausencia de un dominio C2 clásico. Tanto las PKCs atípicas zeta y lambda/iota, así como PKC μ no responden a DAG o calcio, aunque aparentemente todavía requieren a PS como cofactor. Todas las PKC tienen un dominio de pseudosustrato N-terminal que confiere auto inhibición en la enzima nativa. Este dominio se parece mucho al motivo sustrato de reconocimiento de la PKC, excepto que los residuos de Ser/Thr se reemplazan por una alanina. El dominio pseudosustrato se une al sitio de unión al sustrato en la proteína inactiva. La activación por agonistas de fosfolipasas tipo C (PLC) $-\beta$, $-\gamma$ y subtipos- δ da como resultado la hidrólisis de fosfolípidos de inositol de la membrana plasmática. Esto lleva a la generación de 1,2-sn-diacilglicerol (DAG) y fosfatos de inositol solubles (por ejemplo, InsP, Ins-1,4-P2 o Ins-1,4,5-P3). De estos últimos, el Ins-1,4,5-P3 es el responsable de estimular la liberación de calcio de almacenes intracelulares. La generación de DAG o el estímulo con ésteres de forbol exógenos como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), promueve que estos se unan al dominio C1 terminal de PKC, liberándola de su auto inhibición y conduciendo a la activación y a la fosforilación de sustratos. El dominio C1 de las PKCc comprende un motivo rico en cisteína, capaz de unir dos iones de zinc. A pesar de esto, la interacción DAG/PMA/PKC tiene una estequiometría de 1: 1 (Mosior y Newton, 1995; Mosior y Newton, 1996); se ha estudiado que las tres subfamilias de PKC pueden ser activadas por insulina (Schmitz y Trevor, 2008).

La obesidad y estados de resistencia a insulina se han asociado con la acumulación intramolecular de lípidos, y la deposición de lípidos con un incremento en los niveles de DAG, que se conoce activa a isoformas de PKC clásicas y nuevas (Schmitz, 2002; Bossenmaier y cols., 1997; Strack y cols., 2000; Li y cols., 2000; Hulver y Dohm, 2004). En ese contexto, AngII, a través de la vía AT₁R/Gq/PLC, lleva a la producción de DAG. Se conoce que las PKC clásicas están implicadas en el transporte de glucosa estimulado por

ésteres de forbol en adipocitos 3T3-L1 (Nishizuka, 1992). Además, se ha observado que AngII y la activación de PKC por ester de forbol, inhiben la activación de Akt/eNOS en células endoteliales (Yasuhiro y cols., 2012). Por otra parte, la AngII también induce la fosforilación en Ser de IRS-1 por acción de ERK1/2 y PKC en las Ser³¹² y Ser⁶¹⁶, lo que lleva a una disminución en la activación de PI3K y de Akt (Youngren, 2007).

Estudios en nuestro laboratorio, indican que la cinasa de serina PKC está involucrado en las acciones inhibitorias de AngII previamente observadas en la señalización de insulina, ya que cuando se expusieron los adipocitos 3T3-L1 al inhibidor de PKC BIM (1 μ M), se encontró que: este inhibidor de PKC inhibe el efecto de AngII en la activación de IR, Akt y captación de glucosa inducidas por insulina (**Figura 13**) (Gutiérrez, 2013).

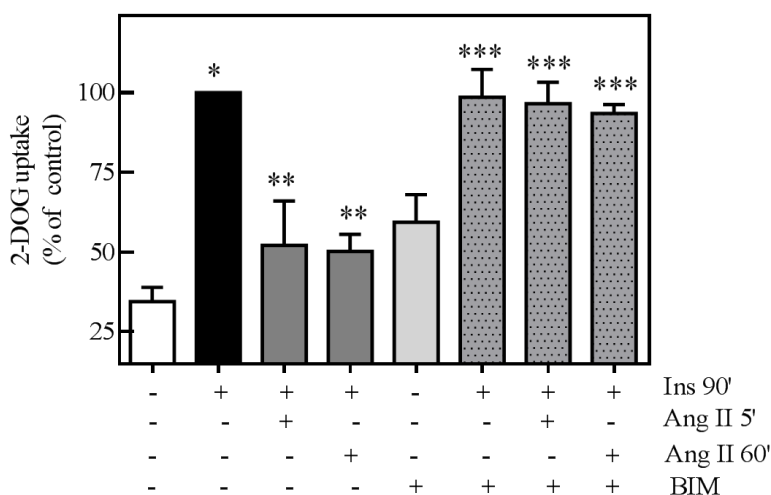


Figura 13. PKC participa en la regulación inducida por AngII en la señalización de insulina en células adiposas 3T3-L1. Los adipocitos fueron tratados con el inhibidor de PKC, BIM (1 μ M por 30 min), se estimularon con o sin AngII (100 nM por 60 min) y se estimularon con o sin insulina (100 nM por 90 min). Posteriormente se determinó la incorporación de glucosa. Se observa que el inhibidor de PKC, previene el efecto de AngII para reducir el efecto estimulado por insulina para incorporar glucosa en este modelo (Gutiérrez, 2013).

2.5 AngII, PTP1B y la resistencia a insulina

Debido a que la conformación activa del IR se mantiene por la fosforilación en Tyr, la desfosforilación del IR por proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs) es uno de los principales mecanismos responsables de la inactivación del IR (Youngren, 2007). Al respecto, se ha observado que la desfosforilación del IR por la PTP1B, induce la disminución de la incorporación de glucosa en tejido muscular y adiposo y alteraciones a nivel metabólico (Cheng y cols., 2002).

PTP1B comenzó a llamar la atención cuando se encontró que ratones deficientes de esta proteína eran resistentes a la obesidad inducida por dieta y eran hipersensibles a insulina (Elchebly y cols., 1999). Esta enzima fue aislada de placenta de humano por Charbonneau y cols. (1989) como una proteína de 50 kDa; después de su transcripción se produce una proteína de 435 aminoácidos, de ellos 114 se han implicado en controlar su localización y función (Flint y cols., 1993).

Como el resto de los miembros de la familia de las PTPs, el dominio catalítico de PTP1B tiene 10 motivos conservados. El número 9 representa el motivo catalítico [I/V] HCXXGXXR [S/T] (Tonks, 2003). PTP1B contiene dominios de interacción que participan en definir su localización, estabilidad y función. PTP1B además de su dominio catalítico orientado hacia el citosol, contiene dos dominios ricos en prolina y un dominio de anclaje al retículo endoplasmático (RE) que la mantiene del lado citoplasmático y permite el acceso a blancos intracelulares (Haj y cols., 2002; Tonks, 2003). En el *loop*-PTP o motivo 9 de PTP1B, se encuentra la cisteína 215 en humano, responsable del ataque nucleofílico del sustrato fosforilado; el segundo paso corresponde a una reacción llevada a cabo por el *loop* WDP (motivo 8), que permite que el sitio activo funcione en un estado de conformación abierto o cerrado. En el estado abierto, el *loop* se mueve a un lado y permite que el pocket catalítico tenga acceso a los sustratos; al unirse, el *loop* WDP regresa a su posición y permite que el pocket catalítico acerque un aspartato en la proximidad para la catálisis. El último paso involucra al *loop* Q (motivo 10), donde el ácido glutámico 262 y el ácido aspártico 181 (localizado en el *loop* WDP) actúan para hidrolizar el intermediario cisteinil-

fosfato, a través de la coordinación de una molécula de agua y liberando al fosfato del sitio activo (Tonks, 2003).

PTP1B es la PTP mejor caracterizada y actualmente se ha comenzado a estudiar como un blanco terapéutico (Feldhammer y cols., 2013). La organización de los genes de humano y ratón es idéntica, excepto por un exón adicional en el 3' de humano que está ausente en ratón (10 exones en humano, 9 en ratón) (Forsell y cols., 2000). Este locus se ha encontrado amplificado (incremento en número de copias en el fragmento de ADN) en cáncer de seno y se asocia con mal pronóstico (Tanner y cols., 1996). Además, este locus se asocia a DM2 (Bento JL., 2004), grasa corporal (Dong y cols., 2003) e ingesta calórica (Collaku y cols., 2004).

Se conoce que la actividad de PTP1B puede ser modulada negativamente por la fosforilación de proteínas como PKC, Akt y otras proteínas cinasas de Ser/Thr (Flint y cols., 1993; Ravichandran y cols., 2001). Se ha identificado en células NIH-3T3-IR que la fosforilación en el residuo Ser⁵⁰ por Akt activada por insulina, modula negativamente la habilidad de PTP1B de defosforilar blancos importantes como el IR (Ravichandran y cols. 2001). Por otra parte, se ha estudiado en células COS7 que los residuos de Tyr⁶⁶, Tyr¹⁵², y/o Tyr¹⁵³ de PTP1B son los principales sitios de fosforilación estimulados por insulina, lo que promueve su asociación con el IR (Bandyopadhyay y cols., 1997) (**Figura 14**).

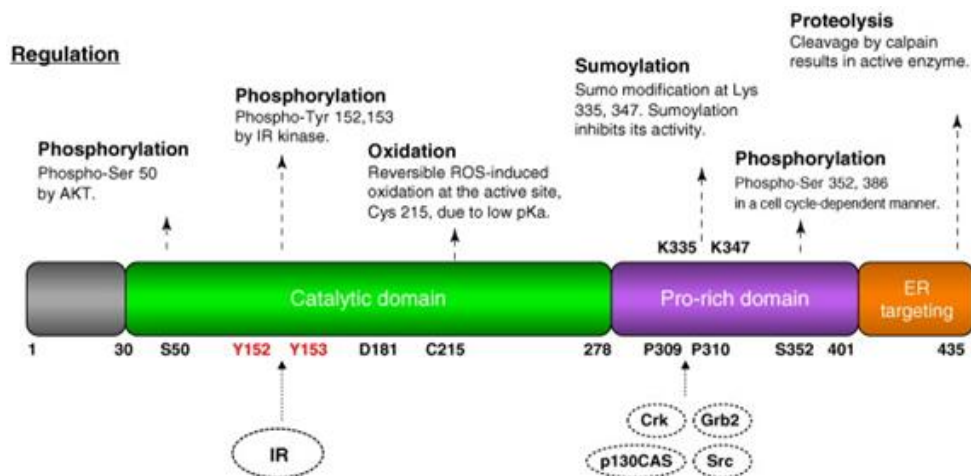


Figura 14. Representación de la estructura de PTP1B. Se muestran los sitios de regulación de la actividad de PTP1B y las enzimas que participan (Yip y cols, 2010).

Se ha estudiado que la PTP1B se asocia al IR en células intactas, lo que sugiere que puede funcionar como un regulador de las acciones de la insulina *in vivo* (Seely y cols., 1996). Mediante el análisis de la estructura de cristal de PTP1B y el IR, se demostró que la PTP1B forma un complejo con el dominio de cinasa de Tyr fosforilado del IR. En ese cristal PTP1B se une al lado opuesto del dominio de cinasa del IR (Shiqing y cols., 2005).

De manera interesante, la eliminación del gen de PTP1B está relacionada en un aumento en la sensibilidad a la insulina, esto debido a un incremento en el estado de fosforilación en residuos de Tyr del receptor (Cheng y cols., 2002). De esta forma, la inhibición de la PTP1B resulta ser un atractivo blanco para el diseño de drogas que incrementen la sensibilidad a la insulina (Gutiérrez-Rodelo y cols., 2017).

Adicionalmente, trabajos con hepatocitos de ratones adultos con deficiencia de PTP1B aumentan la sensibilidad a la insulina que afecta, específicamente, la vía de señalización mediada por la insulina Akt/Foxo1, la cual controla la inhibición de las enzimas gluconeogénicas (Valverde y Gonzales, 2011). Por otra parte, células vasculares de músculo liso transfectadas con oligonucleótidos anti sentido de PTP1B disminuyeron esos efectos, además mostraron que AngII induce la activación de PTP1B en estas células por una vía dependiente de PKA/JAK2 (Ketsawatsomkron y cols., 2010).

En este sentido, se ha observado que la AngII induce la activación de PTP1B en células de músculo liso vascular (VSMC) y se sugiere que este efecto podría tener una participación central en la resistencia a insulina en tejido vascular, ya que se ha observado que PTP1B activada por AngII en VSMC bloquea el mecanismo de insulina para fosforilar en Tyr al IR (Marrero y cols., 2004).

En el trabajo de maestría, se observó que estímulos con AngII disminuyeron la fosforilación del IR en Tyr promovida por insulina (**Figura 15**), sugiriendo la participación de una fosfatasa de Tyr, por lo que se evaluó si PTP1B estaba involucrada en este efecto. Al respecto se observó que tanto estímulos de insulina como de AngII promovieron la

formación de complejos del IR con la PTP1B, en las inmunodetecciones que se evaluaron (Figura 16).

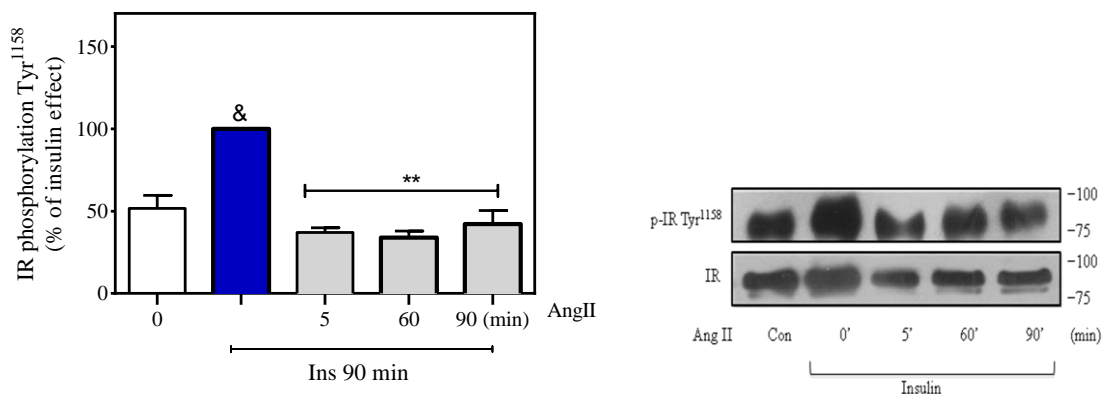


Figura 15. Efecto de la AngII en la fosforilación de IR Tyr¹¹⁵⁸ inducida por insulina. Se observa que AngII a los 5, 60 y 90 min promueve una reducción en la fosforilación mediada por insulina en la fosforilación de IR Tyr¹¹⁵⁸ (Gutiérrez, 2013).

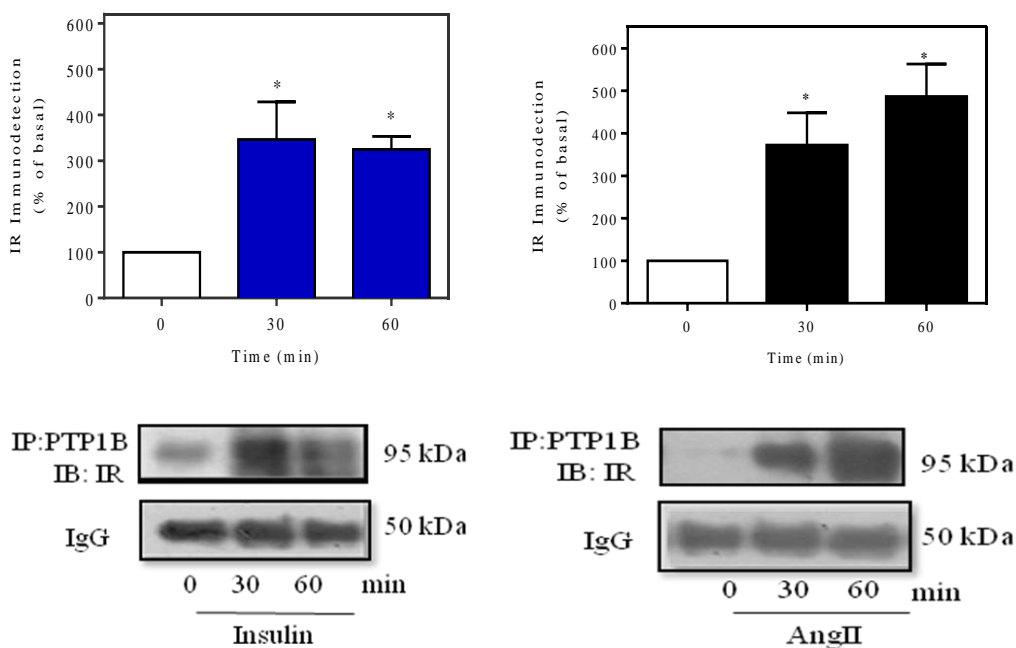


Figura 16. Inmunoprecipitación de PTP1B con el IR. Se estimularon las células con 100 nM de insulina (izquierda) o AngII (derecha) durante 30 y 60 min. Se muestra que ambas hormonas promueven la asociación del IR con PTP1B (Gutiérrez, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios clínicos y farmacológicos han mostrado que la AngII induce resistencia a insulina. Se ha observado que en células vasculares la AngII interfiere con la señalización de insulina por afectar, principalmente, la fosforilación en residuos de Tyr del IRS-1 inducida por insulina y su interacción con PI3K (Folli y cols., 1997). Adicionalmente, en células endoteliales la AngII conduce a un aumento de la fosforilación en Ser de IRS-1 en las Ser³¹² y Ser⁶¹⁶ (Andreozzi y cols., 2004). Al respecto, en tejido adiposo se han realizado diversos trabajos en este tema y hace falta esclarecer los mecanismos moleculares por los que AngII induce resistencia a insulina. En el trabajo de maestría titulado “Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de las acciones de insulina por la AngII en células adiposas” (Gutiérrez, 2013), se encontró que en las células adiposas 3T3-L1 la AngII disminuye la vía de señalización de la insulina a nivel de la fosforilación del IR, la fosforilación de Akt y la incorporación de glucosa inducidos por insulina. En este sentido, se estudiaron posibles mecanismos por los que AngII induce sus acciones, observándose que la AngII induce la fosforilación en Ser del IR en función del tiempo de estímulo. Por otra parte, mediante el uso de inhibidores de cinasas se encontró que AngII media estos efectos a través de la activación de la PKC. Además, se identificó a la fosfatasa PTP1B en el lisado total de células 3T3-L1 y a través de estímulos con AngII se encontró una asociación entre el IR y la PTP1B a diferentes tiempos de estímulo. Lo anterior sugiere que existe una relación de los mecanismos de fosforilación en residuos de Ser (a través de PKC) y desfosforilación en residuos de Tyr (mediado por PTP1B) en los efectos de AngII en la vía de señalización de insulina.

4. HIPÓTESIS

“La AngII promueve la desensibilización de la vía de señalización de insulina en las células adiposas 3T3-L1 mediante mecanismos que involucran: 1) la activación de PKC que promueve la fosforilación en Ser del IR y 2) la activación de la PTP1B que desfosforila al IR en Tyr (Figura 17).

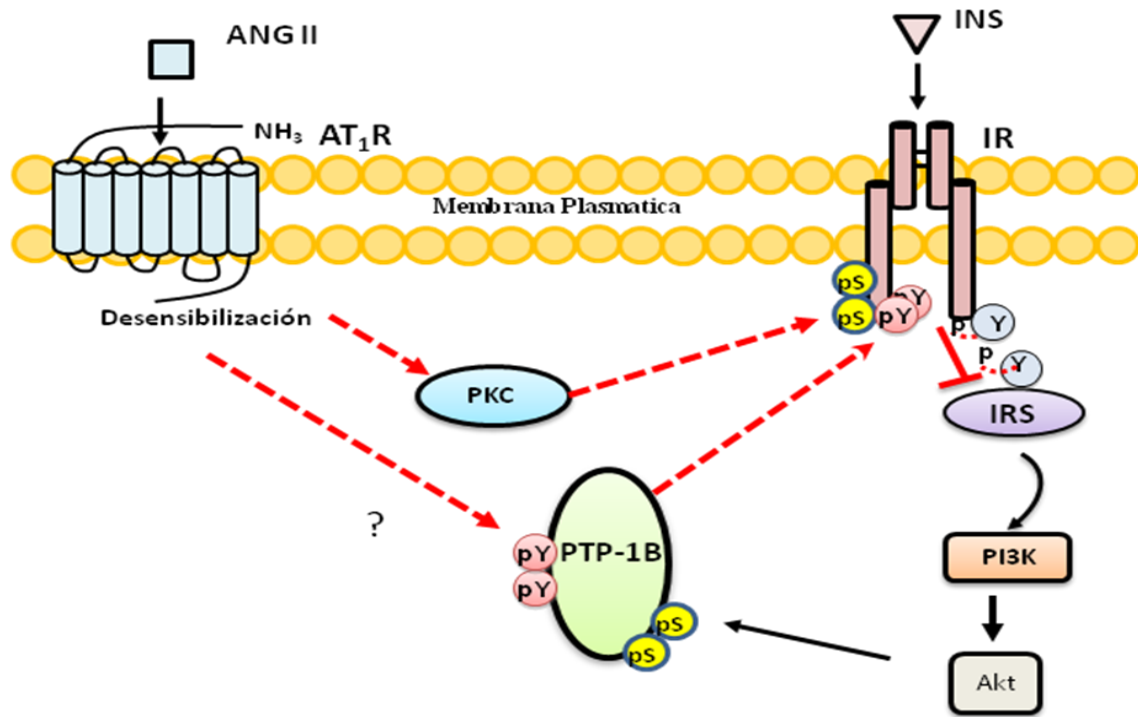


Figura 17. La hipótesis. “AngII induce la resistencia a insulina en las células adiposas 3T3-L1 a través de un mecanismo que involucra la fosforilación en residuos de Ser de IR inducida por PKC y este efecto se asocia a la activación de la PTP1B, lo cual promueve la desfosforilación en Tyr del IR y la desensibilización de la señal de insulina”.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el o los mecanismos moleculares por los que AngII induce resistencia a la insulina en células adiposas 3T3-L1.

Debido a que se planeó estudiar mecanismos distintos involucrados con la resistencia a insulina inducida por AngII en una forma individual y posteriormente hacer una asociación de los mismos, este proyecto se ha dividido en 2 etapas experimentales principales (ver **Figura 18**): 1) en la primera etapa se estudió el papel de AngII como mediadora de la activación de PKC para fosforilar en Ser al IR y de esta forma llevar a la desensibilización de la vía de señalización de insulina; 2) en la segunda etapa se planeó evaluar la participación de PTP1B en la desfosforilación del IR mediado por AngII y la relación de este proceso con la fosforilación en Ser promovido por PKC en células 3T3-L1.

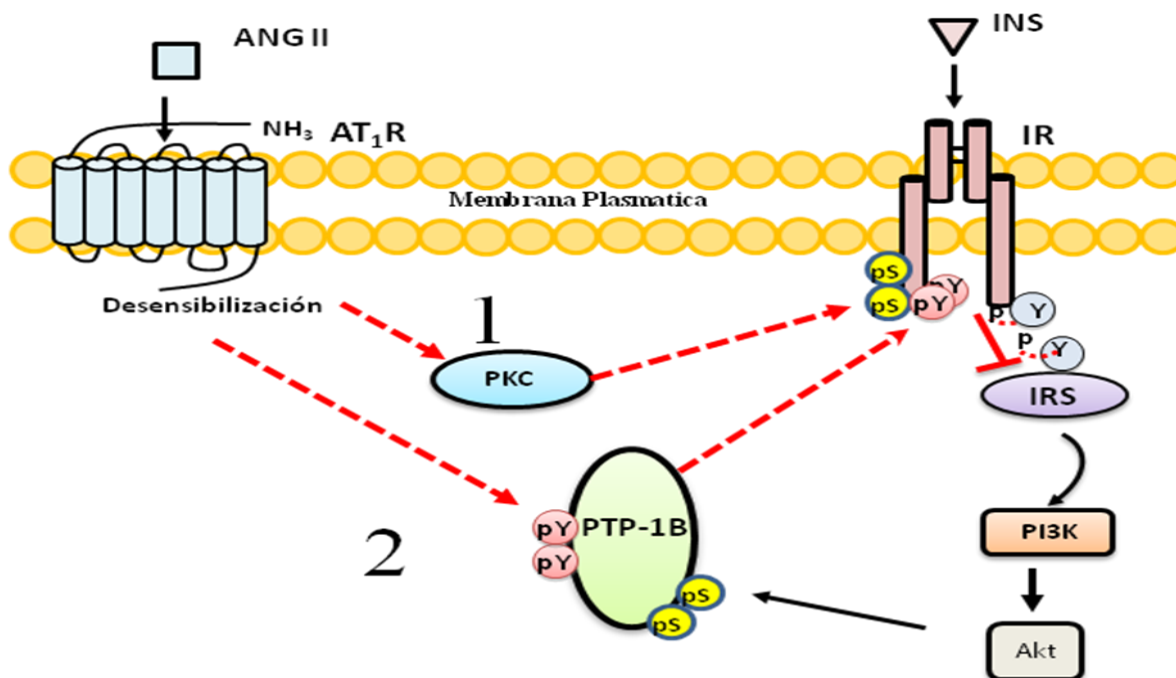


Figura 18 Etapa 1. En este trabajo se estudiará en células 3T3-L1 la participación de la cinasa PKC como una proteína involucrada en la fosforilación en Ser del IR por acción de AngII y los mecanismos que llevan a la activación de esta cinasa (número 1). **Etapa 2.** Se estudiará si AngII a través de afectar la vía de señalización de insulina, influye en que PTP1B no pueda ser regulada negativamente y esto conduzca a que PTP1B este activa y desfosforile al IR para promover desensibilización (número 2).

ETAPA I

Evaluar el papel de la PKC en la fosforilación en Ser del IR inducida por AngII en las células 3T3-L1.

5. 1 Objetivos particulares: Etapa 1

1) Determinar si la fosforilación en Ser del IR inducida por Ang II es mediada por PKC. Para ello, después de estimular a las células con AngII, el IR será inmunoprecipitado y posteriormente por ensayos de Western Blot (WB) se determinará si éste es fosforilado por PKC, empleando para ello un anticuerpo que detecta a una secuencia consenso de fosforilación por PKC: (R/K) X (S*)(Hyd)(R/K).

2) Con el propósito de identificar cuáles isoformas de PKC son activadas por AngII en células adiposas 3T3-L1, se realizarán cursos temporales y se evaluará la fosforilación de las isoformas de PKC α , β I, β II, δ y ϵ , las cuales se expresan de forma endógena en las células 3T3-L1 y cuya activación por AngII ha sido previamente demostrada en otros modelos de estudio.

3) Para determinar si AngII promueve la fosforilación del IR por acción directa de PKC se evaluará la interacción PKC/IR inducida por AngII. Para ello, se realizarán estímulos con AngII y se realizarán inmunoprecipitaciones del IR y WB para identificar las isoformas correspondientes.

ETAPA II

Se ha observado que PTP1B es regulada negativamente por Akt, por lo que, en este trabajo se estudiará si la AngII a través de afectar la vía de señalización de insulina, influye en que PTP1B no pueda ser regulada negativamente y esto conduzca a que PTP1B este activa y desfosfore al IR en residuos de tirosina y lleve a la consecuente desensibilización de la vía de señalización de insulina (**Figura 16, número 2**).

5. 2 Objetivos particulares: Etapa 2

1) Para evaluar si se revierte la resistencia a insulina inducida por AngII a nivel del IR, IRS, Akt e incorporación de glucosa se hará uso del inhibidor de la PTP1B: 3-(3,5-

Dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide.

2) Determinar si la AngII regula a la PTP1B a través de provocar cambios en el estado de fosforilación de residuos específicos que participan en la activación de la fosfatasa (Tyr¹⁵² y Ser⁵⁰), así como identificar las cinasas involucradas en esa regulación utilizando inhibidores.

3) Para evaluar la pérdida de la función de esta fosfatasa en la desfosforilación del IR y en la fosforilación en Ser del mismo, se realizarán ensayos de silenciamiento genético (RNAs de interferencia (siRNA)) de PTP1B.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular y protocolo de diferenciación de células 3T3-L1

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio la línea celular 3T3-L1, obtenida de la compañía American Type Culture Collection (ATCC), que son células de embrión de ratón que se diferencian de fibroblastos a adipocitos. Las células se utilizaron del pasaje 1 al pasaje 10, y se cultivaron en cajas de 10 cm² en medio Dulbecco Modified Eagles médium (DMEM) con penicilina y estreptomina (GIBCO) al 2%, suplementado con suero de ternera (CBS) de Thermo scientific, al 10% en una atmosfera al 5% de CO₂ y a una temperatura de 37° C.

Después de alcanzar la confluencia y de dos días de postconfluencia se inició con el proceso de diferenciación. Se cambió de medio (DMEM/CBS) a DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, dexametasona 0.25µM (glucocorticoide que sirve para promover el proceso de diferenciación) (Sigma-Aldrich), 3-isobutil-1-metilxantina a una concentración de 0.5 mM (inhibe la fosfodiesterasa de AMPc) (Sigma-Aldrich), insulina humana 1µg/µl (la cual induce el proceso de diferenciación) (Sigma-Aldrich) y rosiglitazona 2 µM (agonista del receptor del factor activado por proliferadores peroxisomales gamma, y se emplea como un agente adicional de proliferación) (Molekula

Group), por dos días; posteriormente se cambió de medio con insulina de humano (Sigma-Aldrich) 1µg/µl durante dos días con el fin de acelerar el proceso de diferenciación; después de dos días se retiró el medio y se colocó DMEM solo con SFB 10%. Las células se mantuvieron en este medio y se utilizaron del día 10 al 14 de diferenciación cuando estas poseen la morfología definida de adipocitos (Zebisch y cols., 2012).

6.2 Detección de proteínas mediante Western Blot

Para la separación, la identificación de proteínas y sus modificaciones post-trasducionales, se utilizó el ensayo de Western Blot, para ello, las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se sembraron y diferenciaron en cajas de 6 o 12 pozos; se le cambió a medio sin FBS por 4 hr antes del experimento y posteriormente se procedió a realizar los estímulos de acuerdo con el diseño experimental, empleando diferentes estímulos y tiempos con los reactivos correspondientes (**Tabla 1**).

Reactivo	Concentración y tiempo utilizados
Insulina bovina (Sigma-Aldrich)	100 nM, cursos temporales desde 5 hasta 90 min
AngII (Calbiochem)	100 nM, cursos temporales desde 5 hasta 90 min
Inhibidor de PKC Gö6850 (BIM) (Calbiochem)	2 µM, 30 min
Inhibidor de PKC Gö6976 (Sigma-Aldrich)	100 nM ,30 min
Inhibidor de PTP1B (Calbiochem)	100 µM, 200 µM, cursos temporales desde 5 hasta 180 min
Inhibidor de Jak2 (Tyrphostin AG490 SIGMA)	10 µM, 30 min
Inhibidor de Akt (A6730, Sigma-Aldrich)	100 nM, 30 min
Antagonista del receptor AT1 (Dup 753 ó Losartan, Donado)	10 µM, 30 min

Tabla 1. Reactivos empleados en los experimentos en las células 3T3-L1. Se indican los reactivos utilizados para realizar los experimentos en las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos y los tiempos y concentraciones en que se emplearon.

Una vez terminados los estímulos, se removió el medio de cultivo, se lavaron los pozos con buffer de fosfatos (PBS) frío (NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM pH 7.4) y las células se lisaron con buffer laemli 1X (2% SDS, 10% glicerol, 0.3% β mercaptoetanol, 0.003% azul de bromofenol y agua, pH 6.8). Posteriormente, las muestras se sonicaron dando pulsos de 40 kHz durante 10-20 seg/muestra (Sonics Vibra Cell, Ultrasonic Processor), se calentaron a 99 °C por 5 min (Termomixer Comfort Eppendorf) y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min (MiniSpin Plus Eppendorf). Los sobrenadantes se cargaron en geles de poliacrilamida al 6, 8, 10, y 12% con el fin de tener un mejor patrón de separación de la proteína a identificar, en un sistema Miniprotean 3 cell, con buffer de corrida Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (Quality Biological, Inc.) a 120 V. Las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) con un poro de 0.2μM (Poly Screen, Perkin Elmer™) en buffer de transferencia semiseca (Tris Base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%) en una cámara Trans-Blot SD, Transfer Cell, Biorad a 15 V durante 1 hora o en buffer de transferencia húmeda (Tris Base 20 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% y metanol 20%) (Para proteínas de menos de 90 kDa) durante una hora y media a 4°. Las membranas de PVDF se incubaron con diferentes anticuerpos primarios durante toda la noche o por dos hr, con leche sin grasa (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) o albumina de suero bovino (BSA) (Jackson ImmunoResearch) al 3%. Al término de la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con buffer TBS-Tween 0.1%. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) por una hora a temperatura ambiente seguido por otro ciclo de tres lavados (TBS-Tween 0.1%.) de 10 min cada uno. Como un control de eficiencia de transferencia y para corregir las diferencias de cargas, se detectó actina como un control de carga y se detectó además PKC total de las isoformas α, β, δ y ε. También se identificaron PTP1B, Akt, IRβ e IRS como controles de carga (**tabla 2**). Los anticuerpos adheridos se detectaron utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences) y la señal se cuantificó con un densitómetro GS-800 (Calibrated Densitometer/BIORAD).

6.3 Protocolo de inmunoprecipitación

Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos fueron estimulados de acuerdo con cada diseño experimental particular, una vez terminados los estímulos, se removió el medio de cultivo, se lavaron los pozos con buffer de fosfatos (PBS) frío (NaCl 137 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) y las células se lisaron con el buffer respectivo de acuerdo al tipo de ensayo a realizar; para la identificación de asociaciones proteína-proteína, las células fueron lisadas en condiciones de baja astringencia (buffer de lisis: Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, ortovanadato 2mM, NaF 1mM, Tritón 1%, Deoxicolato de Na 0.23%, EDTA 1mM e inhibidor de proteasas). En cambio, para los ensayos de inmunoprecipitación relacionados con la evaluación de modificaciones postraduccionales específicas de una proteína aislada, las células fueron lisadas en condiciones de alta astringencia (buffer RIPA: NP40 0.5%, SDS 0.1% 25 mM NaCl, 50 mM HEPES, 10% glicerol, 2 mM EDTA, pH 8.0 e inhibidor de proteasas). Posteriormente, se realizó un preclareado mediante la incubación del lisado (500µg de proteína total) durante 1 hora, con 10µl de una suspensión de perlas de A-G agarosa (Santa Cruz Biotechnology) al 50% con buffer de lisis o RIPA, se centrifugó y el precipitado formado se desechó, para reducir la unión inespecífica. A continuación, el lisado se incubó con 20µl de una suspensión de perlas A-G Agarosa más 3µl del anticuerpo de la proteína a inmunoprecipitar durante toda la noche a 4°C. El complejo de unión se lavó cinco veces en buffer de lisis y las proteínas se separaron por SDS PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF por electrotransferencia a 15V durante 1 hora 45 min. Las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C con 5% de leche descremada en TBS Tween al 0.05%, se incubaron por 24 hr a 4°C con los anticuerpos primarios y con los anticuerpos secundarios correspondientes por dos hrs a temperatura ambiente (**Tabla 2**), seguido por el revelado con agentes quimioluminiscentes.

Anticuerpo empleado	Tipo de electrotransferencia	Condiciones del uso de anticuerpo
Anti-p-IR-Tyr ¹¹⁵⁸ (INVITROGENE)	Húmeda	Bloqueo BSA 3 % en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) por 2 hrs, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-p-IR-Tyr ^{1162/63} (Santa Cruz Biotechnology)	Húmeda	Bloqueo BSA 3 % en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) por 2 hrs, posteriormente anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-p-Jak2-Tyr ^{1007/8} (Abcam)	Húmeda	Bloqueo BSA 3 % en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) por 2 hrs, posteriormente anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-p-IRS-Tyr ⁶³² (Santa Cruz Biotechnology)	Húmeda	Bloqueo BSA 3 % en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) por 2 hrs, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-p-IRS- Ser ⁶¹² (Cell Signaling Technology, Inc.)	Húmeda	Bloqueo BSA 3 % en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) por 2 hrs, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-p-PKC α Ser ⁶⁵⁷ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:5000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-p-PKC β II Thr ⁶⁴¹ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:5000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-p-PKC δ Ser ⁶⁷⁶ (Transduction laboratories)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:5000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:6000) durante una hora

Anti-p-PKCεSer ⁷²⁹ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:5000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-pAkt-Ser ⁴⁷³ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:5000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-pPTP1B-Ser ⁵⁰ (Abcam)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:6000) durante una hora
Anti-pPTP1B-Tyr ¹⁵² (Abcam)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-GFP protein (Cell signaling)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:5000) durante una hora
Anti-fosfoserina clona 4A4 (Millipore)	Semiseca (Ver procedimiento de Inmunoprecipitación)	Bloqueo BSA 5% en TBST 0.05 %, incubación anticuerpo (1:2000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:2000
Anti-pSustrato-PKC (Ser) (Cell signaling)	Semiseca (Ver procedimiento de Inmunoprecipitación)	Bloqueo BSA 5% en TBST 0.05 %, incubación anticuerpo (1:2000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:2000
Anti-βactina (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:10000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
Anti-Akt Total (1/2/3) (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000

Total Anti-IR β C-19 (Santa Cruz Biotechnology)	Húmeda	Bloqueo BSA 3% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) dos hr, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante una hora a una dilución de 1:6000
IRS-1 (Santa Cruz Biotechnology)	Húmeda	Bloqueo BSA 3% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:3000) dos hr, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante una hora a una dilución de 1:6000
PKC α (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
PKC β I (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
PKC β II (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormene anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
PKC δ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormene anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
PKC ϵ (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000
Anti-PTP1B Total (Santa Cruz Biotechnology)	Semiseca	Bloqueo leche 5% en TBST 0.1 %, incubación anticuerpo (1:6000) toda la noche, posteriormente anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP durante dos hrs a una dilución de 1:6000

Tabla 2. Condiciones de uso de los anticuerpos para su identificación por Western Blot. Se indican las características de los anticuerpos utilizados para la identificación de las proteínas fosforiladas o totales y las condiciones en que se utilizaron.

6.4 Técnica de disminución de la expresión de la fosfatasa PTP1B (uso de un inhibidor y de siRNAs)

Para identificar la participación de la PTP1B, se utilizaron dos metodologías, por una parte, para inhibir la actividad de la PTP1B se utilizó el inhibidor selectivo $C_{26}H_{19}B_{r2}N_3O_7S_3$, no competitivo, que inhibe la actividad de la PTP1B por prevenir el cierre del *loop* WDP.

Por otra parte, para evaluar la pérdida de la función de la PTP1B, se emplearon siRNAs de esta proteína y se transfectaron a las células 3T3-L1 diferenciadas por electroporación y el manual de Cell line Nucleofector Lit L VCA 1005 de Lonza.

Para ello, las células se contaron, sembraron y diferenciaron durante 10 días; la transfección transitoria con siRNA de la PTP1B se llevó a cabo utilizando el equipo Nucleofector de Lonza™, empleando las secuencias: PTP1B-siRNA (AAA GGA GAU CGA CAA GGC UGG- SignalSilence® PTP1B siRNA I #13348 Cell signaling) o control-siRNA (AAG GGC GTC GAT CCT AAC CGG SignalSilence® Control siRNA (Unconjugated) #6568 Cell signaling) (Rondinone y cols., 2002); el procedimiento de transfección fue el siguiente:

- 1.- Se prepararon cajas de 6 pozos adicionando el polímero poli-lisina y posteriormente se adicionó medio sin suero.
- 2.- Las células diferenciadas fueron lavadas y disgregadas con tripsina (3 min a 37°C), se detuvo la reacción con medio DMEM sin suero, se centrifugaron (30 xg, 10 min) y contaron y se removió el sobrenadante.
3. Se suspendió el pellet celular con la solución 4D nucleofector, y se adicionaron los sustratos (100 nM para siRNA PTP1B (1 µl) o 100 nM control (1µl) o 1 µg de GFP (2µl), posteriormente 82 µl de nucleofector solution -18 µl de Suplemento, 1 millón de células y un volumen final 100 µl.
4. La mezcla se transfirió a nucleocuvetas y se incorporó al equipo nucleofector para transfectar las células utilizando el Programa CM137.

5. Se removió la cubeta, se adicionó medio sin suero (400 μ l) y se sembraron las células en las cajas previamente listas con poli-lisina.

6.5 Análisis de datos

Por cada experimento se realizaron al menos tres repeticiones. Para cuantificar los Western Blot se analizó la densidad de las bandas utilizando el programa QuantityOne 1-D Analysis Software 2000 (Biorad). Para determinar las diferencias estadísticas se utilizó el programa GradPadPrism 6.0 en donde se realizaron pruebas de ANOVA y *post-hoc* de Dunnett. Además, para algunas gráficas se utilizó el *test* de Bonferroni para comparaciones múltiples. En todos los casos se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

ETAPA 1

1) La PKC fosforila en residuos de Ser al IR

Existe una gran variedad de reportes de que el IR es susceptible de ser fosforilado por la PKC (Cortright y cols., 2000; Letiges y cols., 2002; Ravichandran y cols., 2001; Pillay y cols., 1996; Lewis y cols., 1994). Al respecto, en diversos estudios se ha evaluado el papel de PKC en la regulación de la activación del IR mediante el uso de esteroides de forbol, que activan a isoformas de PKC dependientes de Ca^{2+} y/o DAG (clásicas y nuevas), y se ha observado que un aumento en la fosforilación en Ser del receptor de insulina lleva a una actividad disminuida del receptor y por ende de la vía de señalización; en este sentido, se ha demostrado la participación de PKC, en la fosforilación del IR de las regiones juxtamembranal (residuos Ser⁹⁶⁷ y Ser⁹⁶⁸), catalítica (residuos Ser¹⁰⁰⁶, Ser¹⁰³⁵ y Ser¹⁰³⁷) y carboxilo terminal (residuos Ser¹²⁸⁸, Ser¹³⁰⁵, Ser¹³⁰⁶, Ser¹³²¹, Ser¹³²⁷ y Thr¹³⁴⁸) (Youngren, 2007). Aunque no es claro el papel de la fosforilación de cada uno de estos residuos en el estado de autofosforilación del IR o en su actividad de cinasa, varios de estos sitios se encuentran en cercana proximidad a los sitios de autofosforilación del IR o se encuentran dentro del sitio catalítico y podrían, por tanto, alterar la conformación del IR o el acceso a residuos de Tyr clave en su activación (Youngren, 2007).

En este trabajo se evaluó el papel de PKC en la fosforilación en Ser del IR inducida por AngII, para ello se empleó un anticuerpo que reconoce una secuencia sustrato de fosforilación de PKC que se encuentra en el IR (de acuerdo con materiales y métodos). En la **Figura 19** se muestra que tras estimular a las células con AngII a diferentes tiempos de estímulo, se incrementó la fosforilación en Ser del IR con respecto al control de $\approx 200\%$ desde 5 min de estímulo con AngII, alcanzando su efecto máximo a los 15 min, el cual se mantiene hasta los 90 min.

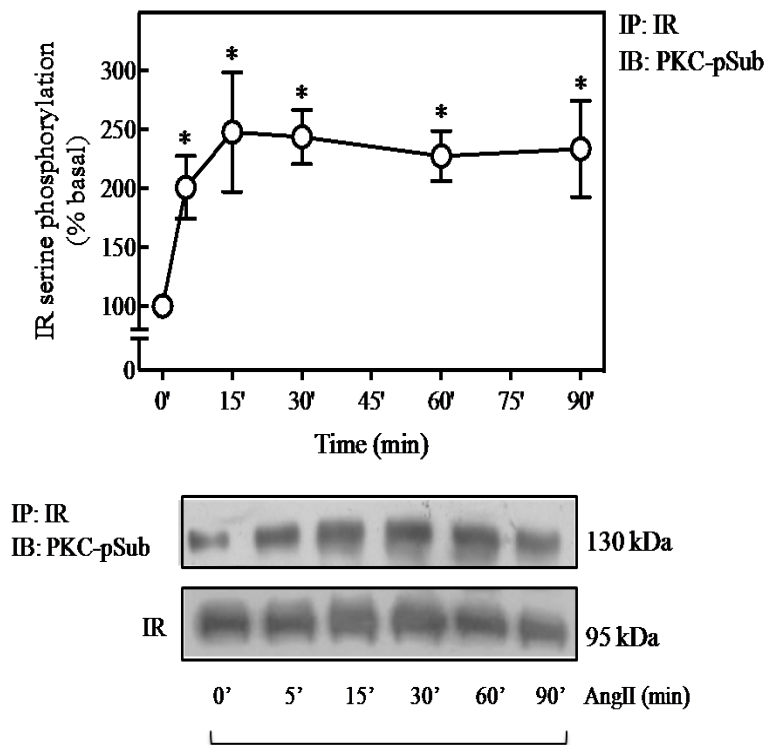


Figura 19. Efecto de la AngII en la fosforilación en Ser del IR por PKC. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de AngII por 5, 15, 30, 60 y 90 min. En el lisado total, se inmunoprecipitó al IR y se evaluó la fosforilación en Ser por PKC utilizando el anticuerpo pSustrato de PKC (R/K) X (S*) (Hyd) (R/K) como se describió en material y métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR β . La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. * $p < 0.05$ vs control.

Además, para obtener más evidencia de la implicación de PKC en la regulación del IR, se realizó un análisis *in silico* de los sitios de fosforilación en Ser del IR de ratón utilizando el número de identificación de uniprot <http://www.uniprot.org/> P15208 (INSR_MOUSE) y posteriormente el código FASTA en el sitio http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder; este análisis nos permitió encontrar que de una longitud total de 1,372 residuos, existen 610 fosforilaciones en Ser, de las cuales 147 se encuentran en las subunidades β del IR (localizadas del lado citoplasmático cuando el IR está en la membrana plasmática) y a su vez, de estos se reconocen un total de 54 posibles residuos sustratos de PKC (**Figura 20**). Respecto a estos sitios, se reconocen como cercanos del sitio con actividad de cinsasa del IR, los residuos 1069-1072, 1191-1194,1340-1342,1197-1199, 1054-1056,1107-1109 y 1162-1164, los cuales podrían estar directamente relacionados con la actividad del IR y su capacidad de auto-fosforilarse en residuos de Tyr..

No. de residuos de la secuencia completa	Aminoácidos	Motivo, residuos fosforilados en rojo
794-796	KES	(R/K)X (pS/pT)
501-503	KFS	(R/K)X (pS/pT)
1069-1072	KGFT	(R/K)XX (pS/pT)
191-194	KGKT	(R/K)XX (pS/pT)
1012-1014	KIT	(R/K)X (pS/pT)
681-684	KLPS	(R/K)XX (pS/pT)
645-648	KPPS	(R/K)XX (pS/pT)
586-589	KPWT	(R/K)XX (pS/pT)
750-753	KRRS	(R/K)XX (pS/pT)
1342-1344	KRT	(R/K)X (pS/pT)
571-574	KSQT	(R/K)XX (pS/pT)
716-719	KTDS	(R/K)XX (pS/pT)
916-918	RATS	(R/K)X (pS/pT)
916-919	RATS	(R/K)XX (pS/pT)
823-825	RCS	(R/K)X (pS/pT)
208-211	RCWT	(R/K)XX (pS/pT)
74-77	RDLS	(R/K)XX (pS/pT)
358-361	RGCT	(R/K)XX (pS/pT)
416-419	RGET	(R/K)XX (pS/pT)
904-907	RGSLS	(R/K)XX(pS/pT)X(pS/pT)
110-112	RGS	(R/K)X (pS/pT)
141-143	RGS	(R/K)X (pS/pT)
141-145	RGSVR	((R/K)X(pS/pT)X(pS/pT)
803-806	RHFT	(R/K)X(pS/pT)
731-733	RKT	(R/K)X(pS/pT)
1254-1256	RLT	(R/K)X(pS/pT)
294-296	RNS	(R/K)X(pS/pT)
294-298	RPSRK	(R/K)X(pS/pT)X(pS/pT)
746-748	RPS	(R/K)X (pS/pT)
746-750	RPSRK	(R/K)X(pS/pT)X(pS/pT)
1270-1272	RPT	(R/K)X (pS/pT)

398-400	RRS	(R/K)X (pS/pT)
751-753	RRS	(R/K)X (pS/pT)
605-607	RRT	(R/K)X (pS/pT)
131-1323	RSS	(R/K)X (pS/pT)
506-508	RTS	(R/K)X (pS/pT)
685-688	RTWS	(R/K)XX (pS/pT)
1362-1365	RVLT	(R/K)XX (pS/pT)
1191-1194	RWMS	(R/K)XX (pS/pT)
831-833	SAR	(R/K)X (pS/pT)
729-731	SFR	(R/K)X (pS/pT)
1340-1342	SIK	(R/K)X (pS/pT)
98-100	SLR	(R/K)X (pS/pT)
1197-1199	SLR	(R/K)X (pS/pT)
1054-1056	SLR	(R/K)X (pS/pT)
1107-1109	SLR	(R/K)X (pS/pT)
696-698	SQK	(R/K)X (pS/pT)
296-298	SRK	(R/K)X (pS/pT)
748-750	SRK	(R/K)X (pS/pT)
891-893	SRK	(R/K)X (pS/pT)
143-145	SVR	(R/K)X (pS/pT)
912-914	SVR	(R/K)X (pS/pT)
877-879	SYR	(R/K)X (pS/pT)
189-191	TAK	(R/K)X (pS/pT)
1162-1164	TVK	(R/K)X (pS/pT)

Figura 20. Identificación de sitios de fosforilación en el IR por PKC. Se muestran la posición y secuencia de un total de 54 residuos del IR que son sustratos de fosforilación por PKC, de acuerdo con una secuencia consenso de fosforilación en pS/T (UniProtKB - P15208 (INSR_MOUSE) encontrados en un análisis *in silico*.

2) AngII activa isoformas clásicas y nuevas de PKC en células 3T3-L1

En nuestro modelo de estudio las células 3T3-L1, se ha encontrado que en preparaciones celulares de membrana y citosólicas contienen PKCs convencionales (α , β_I , β_{II} , and γ), nuevas (δ , ϵ , η , θ) y atípicas (ζ y λ) (Moscat y cols., 1997), además se ha observado que isoformas convencionales en estas células participan en el transporte de glucosa estimulado por esteres de forbol (Masatoshi y cols., 2000).

En ese orden de ideas, se realizó una selección de isoformas de PKC, a partir de los efectos observados con BIM (Gutiérrez, 2013), así como la expresión de estas en las células 3T3-L1 y se decidió evaluar si AngII es capaz de inducir la activación de PKC α , β_I , β_{II} , δ y ϵ , y por otra parte si AngII promueve la asociación de esas isoformas de PKC con el IR.

Al respecto, se ha estudiado que para tener su actividad como cinasa de serina, las isoformas de PKC convencionales PKC α , PKC β I, PKC β II y nuevas PKC δ y PKC ϵ requieren de una serie de modificaciones post-trasduccionales, en relación a esto, diferentes estudios estructurales y bioquímicos indican que PKC presenta tres fosforilaciones importantes; la primera, una trans-fosforilación en el *loop* de activación que la vuelve catalíticamente competente para auto-fosforilarse; la segunda, una autofosforilación subsecuente en el carboxilo terminal que mantiene la competencia catalítica; la tercera, otra autofosforilación en el carboxilo terminal que regula la localización de la enzima (Keranen y cols., 1995). Se ha determinado que la fosforilación de estos sitios puede depender de la cinasa PDK1, la cual fosforila a PKC α y PKC β II en el *loop* de activación de la enzima y esa fosforilación es seguida de una autofosforilación de dos sitios dentro del carboxilo terminal que corresponden a la Thr⁶³⁸ y Ser⁶⁵⁷ en PKC α y Thr⁶⁴¹ y Ser⁶⁶⁰ en PKC β II (Keranen LM y cols., 1995; Dorit y Kazanietz, 1999). Además, se ha encontrado que la fosforilación de los residuos Thr⁵⁰⁵/Ser⁶⁴³ de PKC δ está asociada con un incremento en la actividad de la enzima (Markou y cols., 2006). Así mismo en PKC ϵ el residuo Thr⁵⁶⁶ en el *loop* de activación, es fosforilado por PDK1, lo que promueve la autofosforilación en el residuo Thr⁷¹⁰ y a su vez, la autofosforilación en la Ser⁷²⁹ en el carboxilo terminal (Newton, 2001). La fosforilación en PKC ϵ en la Ser⁷²⁹ se ha propuesto como residuo importante en la modulación de la enzima y que participa en su actividad y localización (England y Rumsby, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, en esta tesis experimental, se estudió la fosforilación de las isoformas α , β I, β II, δ y ϵ por medio de estímulos a diferentes tiempos con AngII. En la **Figura 21 (círculos azules)**, se muestra el efecto cuando se evaluó la fosforilación de PKC α Ser⁶⁵⁷, en donde se encontró que AngII provocó la fosforilación de esta isoforma desde los 15 min de estímulo (≈ 400 % con respecto al control $p < 0.05$) teniendo su efecto máximo entre los 60 y 90 min de estímulo con AngII, con una tendencia a disminuir a los 90 min (≈ 300 % con respecto al control $p > 0.05$). Así mismo, se analizó la fosforilación de PKC β I Thr⁶⁴¹ (**Figura 21, cuadrados naranja**), observando un incremento desde los 5 min

de estímulo con AngII, llegando a su efecto máximo a los 30 min ($\approx 300\%$ con respecto al control $p > 0.05$) y manteniéndose hasta los 90 min.

Además, también estudiamos la fosforilación de la isoforma PKC β II (**Figura 21, triángulos morados hacia arriba**), mediante ensayos de inmunoprecipitación, se encontró que AngII promueve la fosforilación en Ser de PKC β II desde los 5 min, alcanzando efectos máximos a los 60 min ($\approx 300\%$ con respecto al control $p > 0.05$) y el efecto permanece el resto del curso temporal. De la misma forma se evaluó si AngII promovía la fosforilación de PKC δ Ser⁶⁴³ (**Figura 21, triángulos verdes hacia abajo**) y se encontró un efecto similar, teniendo la máxima fosforilación a los 30 min de estímulo con AngII ($\approx 300\%$ con respecto al control $p < 0.05$), disminuyendo a los 60 min ($\approx 300\%$ con respecto al control $p > 0.05$), efecto que se mantuvo hasta los 90 min de estímulo. Se analizó, además, si AngII a diferentes tiempos tenía efecto en la fosforilación de PKC ϵ ^{Ser729} (**Figura 21, diamantes rojos**), encontrando un incremento en la fosforilación con respecto al tiempo teniendo efecto desde 15 min de estímulo con AngII ($\approx 400\%$ con respecto al control $p < 0.05$), aumentando a los 30 min de estímulo ($\approx 600\%$ con respecto al control $p < 0.05$) y teniendo un efecto máximo a los 90 min ($\approx 800\%$ con respecto al control $p > 0.05$).

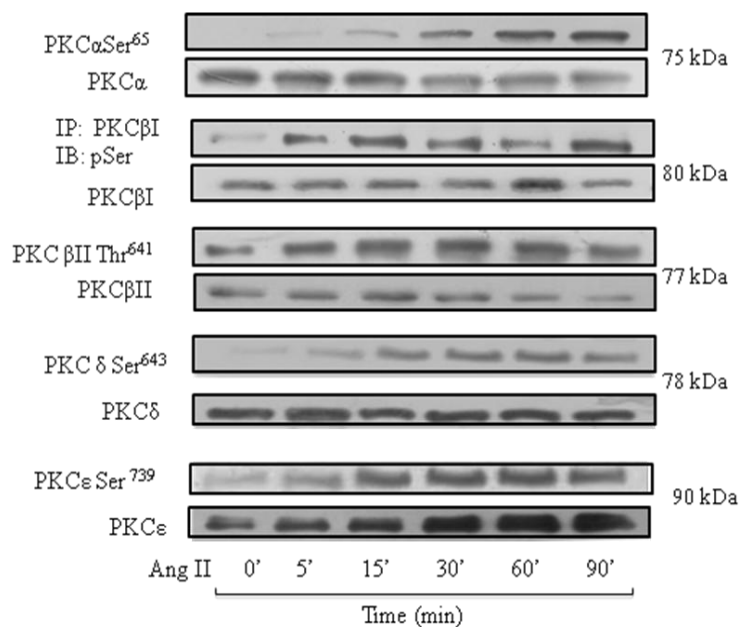
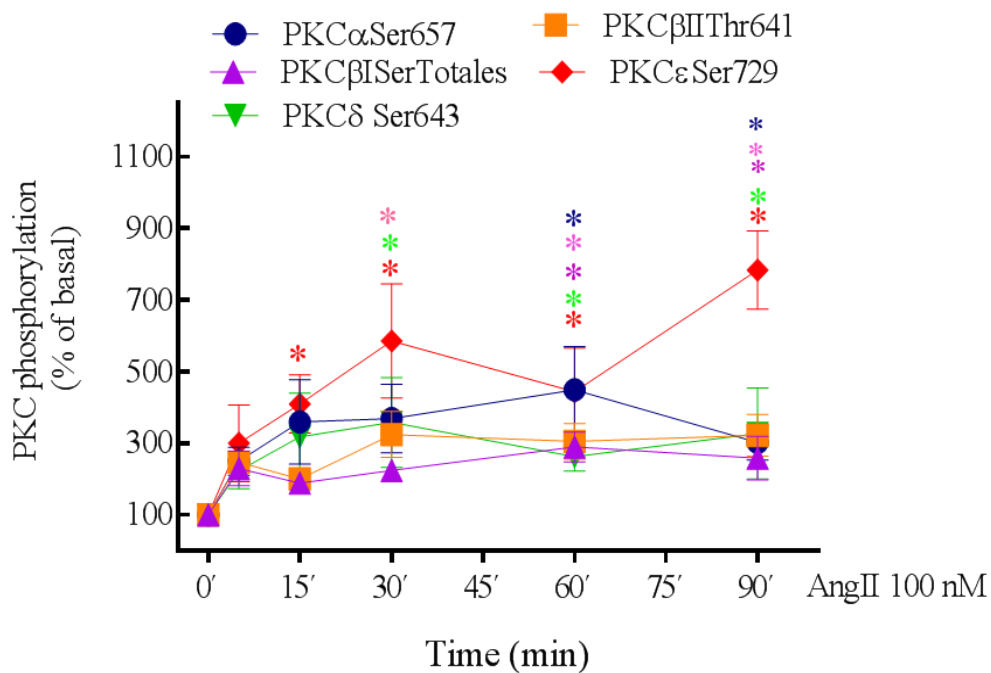


Figura 21. Efecto de la AngII en la fosforilación de diferentes isoformas de PKC. Las células se estimularon con 100 nM de AngII por 5, 15, 30, 60 y 90 min. La fosforilación de PKCαSer⁶⁵⁷, PKCβIpSer, PKCβIIThr⁶⁴¹, PKCδSer⁶⁴³, PKCεSer⁷²⁹ se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando los anticuerpos anti-PKCα, βI, δ y ε. La gráfica representa los datos obtenidos de al menos tres experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * p<0.05 vs control.

3) AngII conduce a la asociación de isoformas clásicas de PKC con el IR

Existe evidencia experimental que sugiere la interacción del IR con PKC y se propone que este complejo está involucrado en la regulación de la actividad del IR (Braiman L y cols., 2001). Por lo tanto, se investigó si AngII podría conducir a la formación del complejo IR/PKC; al respecto se evaluó en nuestro modelo si existía asociación del IR con las isoformas de PKC α , β I, β II, δ y ϵ a 60 min de estímulo de AngII (**Figura 22**). Se encontró que el estímulo con AngII promueve una asociación de las isoformas de PKC α (\approx 230% con respecto al control), PKC β I (\approx 160% con respecto al control), PKC β II (\approx 350% con respecto al control) y PKC δ (\approx 100% con respecto al control) con el IR a los 60 min de estímulo, lo que sugiere que estas isoformas podrían estar relacionadas con los efectos de AngII en la regulación de la señal de insulina a nivel del IR. Para analizar si el efecto observado de la asociación del IR con las diferentes isoformas de PKC depende de la activación del receptor AT₁, se decidió realizar un experimento utilizando el mismo esquema experimental de la **Figura 22** empleando el antagonista específico del AT₁R Losartan (Dup753), observándose que la formación del complejo IR-PKC β II se previene con este fármaco, proponiendo que esta interacción depende de la activación del receptor AT₁ (disminución al valor del control) (**Figura 23**).

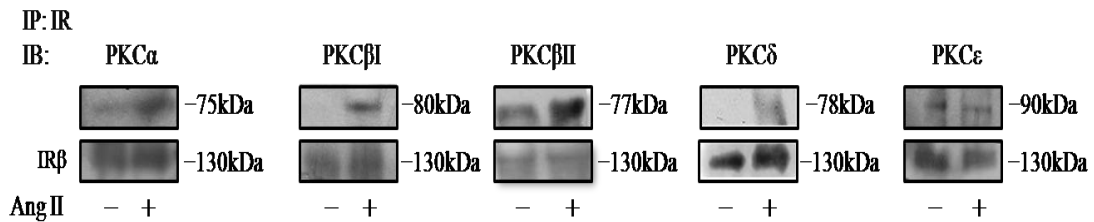
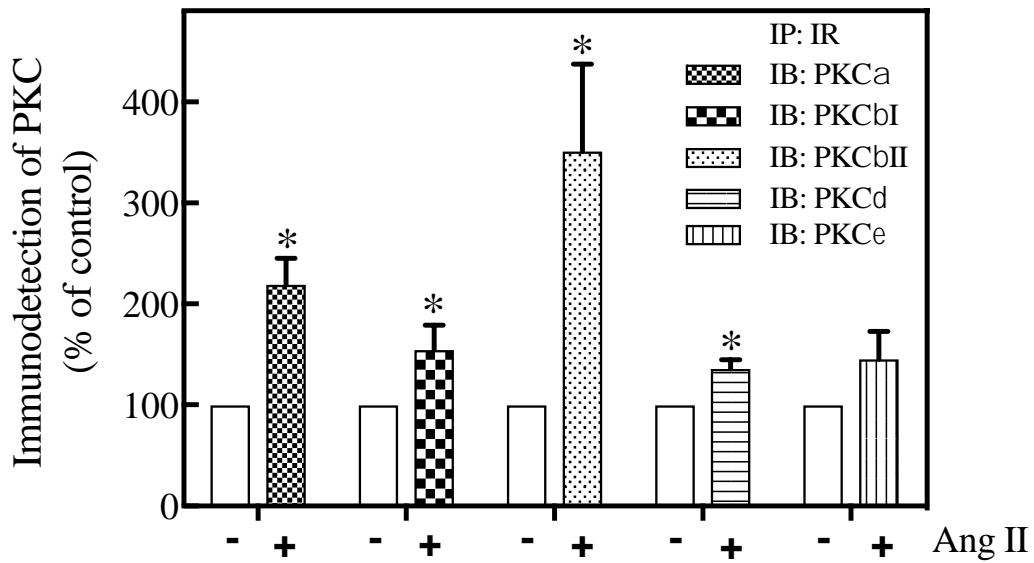


Figura 22. Estímulos de AngII para la inmunoprecipitación de IR con PKC. Se estimularon las células con 100 nM de AngII durante 60 min y se identificaron las isoformas PKC α , β I, β II, δ y ϵ mediante Western Blot en precipitados de IR como se indica en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada identificando la señal de IR β como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * $p < 0.05$ vs control.

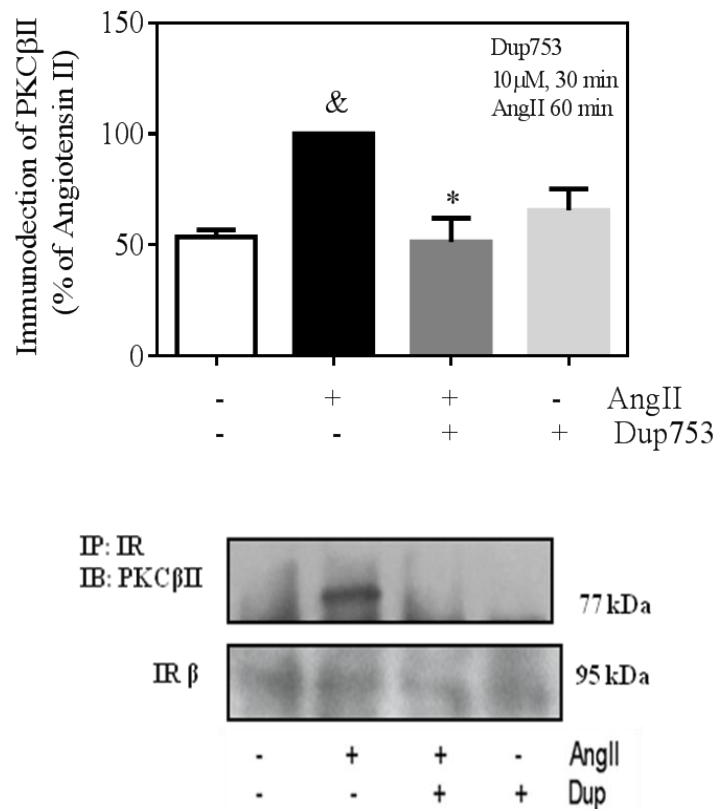


Figura 23. La interacción IR/PKCβII depende de la activación del receptor AT₁. Las células se pre-estimularon con 10 μM de Dup753 durante 30 min y posteriormente fueron estimuladas con o sin 100 nM de AngII durante 60 min. Mediante Western Blot se identificó la PKCβII en precipitados de IR como se indica en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada identificando la señal de IRβ como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de cinco experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & p< 0.05 vs control, * vs AngII II..

ETAPA 2

1) AngII participa en los mecanismos de regulación y activación de PTP1B

a) Fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B

Se ha demostrado que la activación de la PTP1B puede ser modulada por insulina a través de incrementar la fosforilación en las Tyr¹⁵² y Tyr¹⁵³, fosforilación que se ha asociado con conducir a la interacción directa entre esta fosfatasa y el IR para inducir la desfosforilación en Tyr (Bandyopadhyay y cols., 1997; Shrikrishna y cols. 2001). Para estudiar estos mecanismos de regulación y activación de la fosfatasa PTP1B se realizaron cursos temporales con insulina para evaluar la fosforilación en la Tyr¹⁵² de PTP1B. Observamos que a partir de los 5 min de estímulo con insulina se incrementó la fosforilación de este residuo, la cual aumenta a los 15 y 30 min en donde se observó su efecto máximo ($\approx 400\%$ con respecto al control) y este se mantuvo hasta los 90 min del estímulo ($\approx 300\%$ respecto al control) (**Figura 24**).

Estudiando los posibles mecanismos por los cuales la AngII participa en la regulación y/o activación de la PTP1B, durante la tesis de maestría (Gutiérrez, 2013) se demostró que la AngII es capaz de promover la asociación directa entre el IR y PTP1B (**Figura 16**), efecto que también se observó con el estímulo de insulina (**Figura 16**). Lo anterior permite proponer que la AngII podría promover la asociación de la PTP1B con el IR a través de la fosforilación de la fosfatasa en la Tyr¹⁵². En base a estos antecedentes, se decidió evaluar el efecto de la AngII en la fosforilación de la Tyr¹⁵² de la PTP1B en células adiposas 3T3-L1 (**Figura 25**).

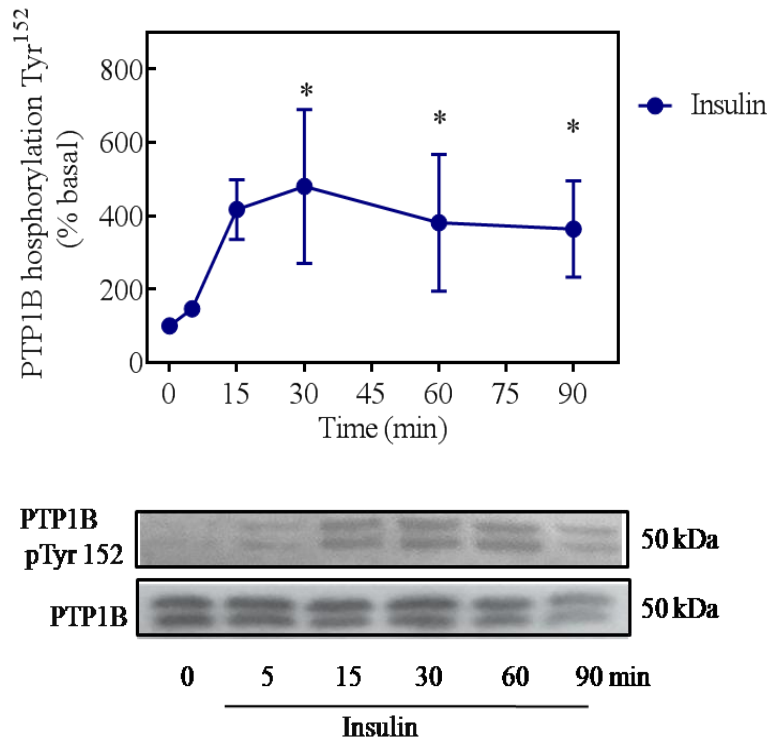


Figura 24. Efecto de insulina en la fosforilación de PTP1B Tyr¹⁵². Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de insulina por 5, 15, 30, 60 y 90 min. La fosforilación de la Tyr¹⁵² de PTP1B se evaluó de acuerdo con como describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando un anticuerpo anti-PTP1B como control de carga. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y fueron expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * $p < 0.05$ vs el control.

Como se observa en la **Figura 25**, la AngII provocó la fosforilación de la PTP1B en la Tyr¹⁵² en función del tiempo de estímulo teniendo efecto desde los 5 min y alcanzando el máximo a partir de los 30 min ($\approx 500\%$ respecto al control), manteniéndose así por el resto del curso temporal, hasta los 90 min y mostrando una cinética mayor que la de insulina, la cual muestra un efecto más lento (**Figura 25**). Con estos datos se sugiere que la AngII es capaz de activar a la PTP1B mediante su fosforilación en la Tyr¹⁵² y que esto se relaciona con la asociación previamente observada con el IR.

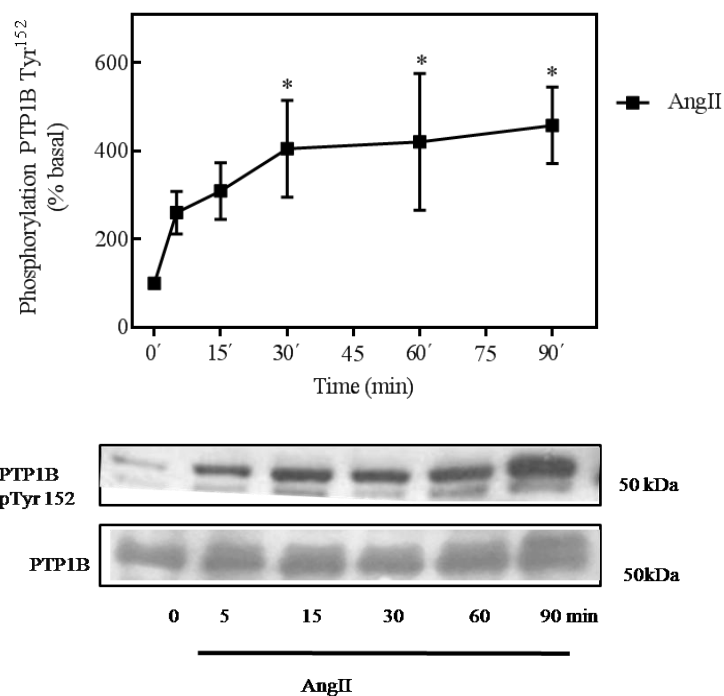


Figura 25. AngII incrementa la fosforilación de PTP1B Tyr¹⁵² en función del tiempo de estímulo. Las células 3T3-L1 se estimularon con 100 nM de AngII por 5, 15, 30, 60 y 90 min. La fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * $p < 0.05$ vs el control.

b) Fosforilación en Ser⁵⁰ de PTP1B

Por otra parte, se ha observado que en la línea celular COS-7 (células con morfología similar a fibroblastos, derivadas de tejido de riñón de mono) la insulina puede regular la actividad catalítica de la PTP1B de forma negativa, al incrementar la fosforilación en la Ser⁵⁰ de esta fosfatasa (Ravichandran y cols., 2001). Al respecto, se evaluó en nuestro modelo, si tanto insulina como AngII tenían efecto en la regulación negativa de PTP1B. En la **Figura 26**, se observa que el estímulo con insulina, a lo largo del curso temporal incrementa la fosforilación en la Ser⁵⁰ de PTP1B, efecto que alcanza su máximo valor y es

estadísticamente significativo a partir de 30 min ($\approx 200\%$ comparado con el control), manteniéndose este incremento hasta los 90 min de estímulo (**Figura 26, círculos azules**).

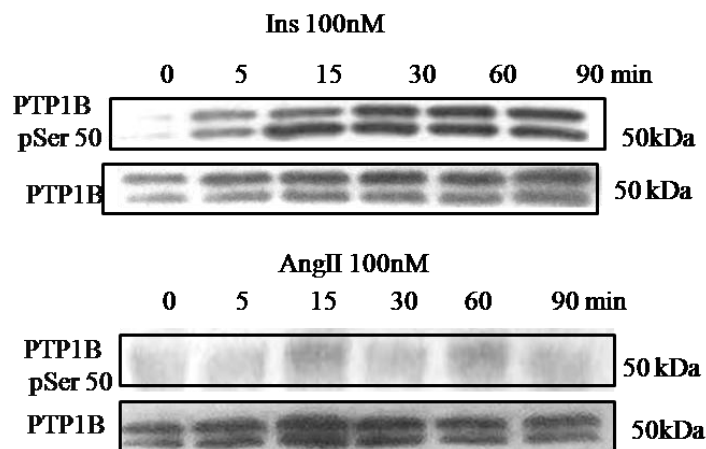
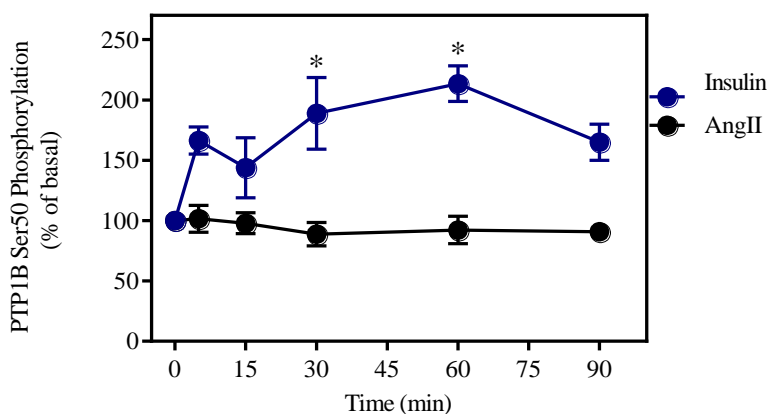


Figura 26. AngII no tiene efecto en la fosforilación de PTP1B en la Ser⁵⁰. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de insulina (círculos azules) ó AngII (círculos negros) por 5, 15, 30, 60 y 90 min. La fosforilación en Ser⁵⁰ de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de tres y seis experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. * $p < 0.05$ vs el control.

Sin embargo, cuando se evaluó el estímulo de AngII durante el mismo periodo de tiempo en la fosforilación de la Ser⁵⁰ de PTP1B, se encontró que esta hormona no incrementa de forma significativa este efecto con respecto a la fosforilación basal (**Figura 26, círculos negros**).

Teniendo en cuenta que el objetivo del estudio es evaluar el papel de AngII en las acciones de insulina, se determinó si el pre-estímulo con AngII modificaba la respuesta de insulina en la regulación de PTP1B en ambos residuos, Tyr¹⁵² y Ser⁵⁰.

Como se observa en la **Figura 27**, el pre-estímulo por 5, 60 o 90 min con AngII incrementó la fosforilación inducida por insulina en la Tyr¹⁵² de PTP1B hasta en 50% comparado con el estímulo de insulina sola, sugiriendo que la AngII regula positivamente la actividad de PTP1B estimulada por esta hormona.

Al evaluar la fosforilación de la Ser⁵⁰ de PTP1B, se encontró un efecto contrario al observado con la Tyr¹⁵² en la **Figura 28**; los pre-estímulos con AngII previenen el efecto causado por la insulina en la fosforilación de la Ser⁵⁰ de PTP1B. Por lo anterior nuestros resultados sugieren que la AngII suprime la regulación negativa de la PTP1B inducida por insulina.

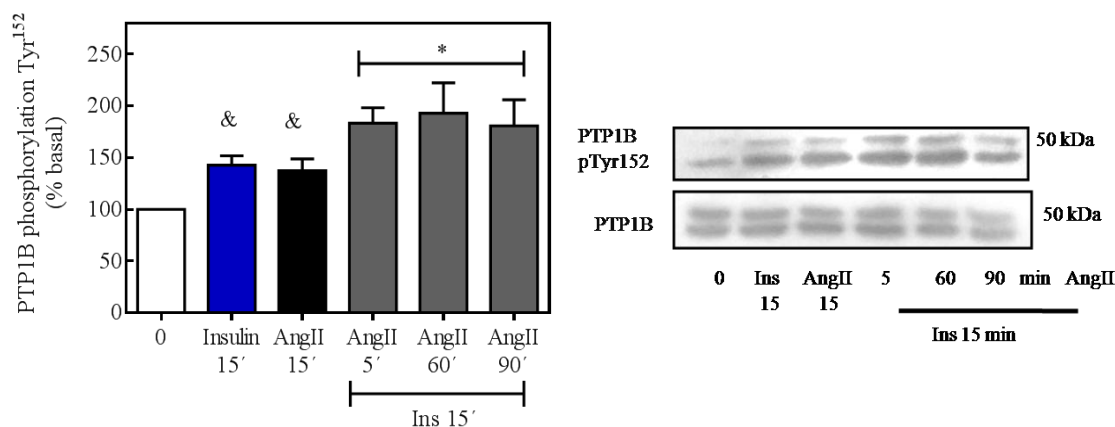


Figura 27. AngII incrementa la fosforilación de PTP1B Tyr¹⁵² inducida por insulina. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de insulina o 100 nM de AngII por 15 min; o fueron pre-estimuladas con AngII por 5, 60 y 90 min y posteriormente estimuladas con insulina por 15 min. La fosforilación en la Tyr¹⁵² de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de cinco experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs estímulo con insulina.

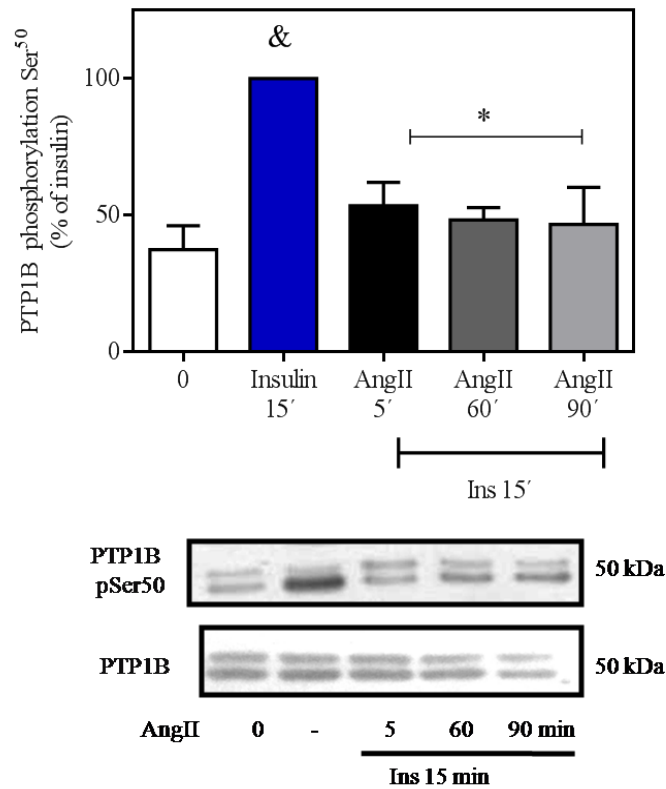


Figura 28. AngII provoca una disminución en la fosforilación de PTP1B en la Ser⁵⁰ inducida por insulina. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de insulina ó 100 nM de AngII por 15 min; o fueron pre estimuladas con AngII por 5, 60 y 90 min y posteriormente estimuladas con insulina por 15 min. La fosforilación en Ser⁵⁰ PTP1B se evaluó como se describió en Material y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de cinco experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs estímulo con insulina.

2) La activación de PTP1B es regulada por AngII e insulina y mediado por Akt y Jak2

Con el fin de conocer mejor los mecanismos de regulación de PTP1B, se decidió identificar las cinasas involucradas en la fosforilación de los sitios de Tyr¹⁵² y Ser⁵⁰. Previos reportes han indicado que la cinasa Akt posee un motivo de reconocimiento de sustrato RXXRXXS/T, que de forma interesante está contenido en la secuencia de la PTP1B en donde se localiza la Ser⁵⁰ (RYRDVS⁵⁰) (Ravichandran y cols., 2001). Adicionalmente, se conoce

que la fosforilación de este residuo regula negativamente la actividad catalítica de esta fosfatasa para desfosforilar al IR (Ravichandran y cols., 2001).

Con estos antecedentes se evaluó el efecto de insulina y AngII en la fosforilación de Ser⁵⁰, utilizando un inhibidor de Akt (**Figura 29**).

Como se observa en la **Figura 29**, el inhibidor de Akt previene el efecto de insulina en el incremento en la fosforilación en el residuo de Ser⁵⁰ de PTP1B, hasta llegar a los niveles basales de fosforilación ($\approx 50\%$ del efecto máximo de insulina); con el estímulo de AngII no se observa efecto en las células cuando se estimula también con el inhibidor de Akt. Estos resultados sugieren que AngII no regula directamente la fosforilación de Ser⁵⁰ de PTP1B, sin embargo participa de forma indirecta, al contribuir a la disminución en la fosforilación Akt dependiente de insulina (**Figura 28**).

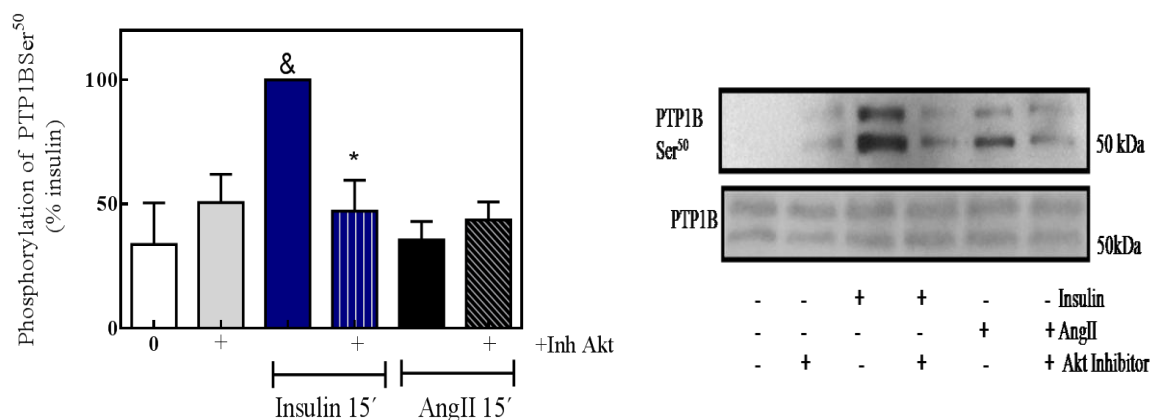


Figura 29. Akt está involucrada en la fosforilación de PTP1B en la Ser⁵⁰ inducido por insulina. Las células 3T3-L1 se estimularon con inhibidor de Akt 100 nM por 30 min, con 100 nM de insulina ó AngII por 15 min y se determinó la fosforilación en Ser⁵⁰ PTP1B como se menciona en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs control,* $p < 0.05$ vs estímulo con insulina

Se hizo un análisis *in silico* utilizando los sitios http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder y <http://www.uniprot.org/uniprot/P35821.fasta> (**Figura 30**), en donde se encontró que la

PTP1B es sustrato de fosforilación de Jak2, en el motivo de fosforilación que contiene a la Tyr¹⁵². Al respecto se conoce que AngII puede activar a la proteína Jak2 por provocar su fosforilación en la Tyr^{1007/8} (Velloso y cols., 2006), por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto de AngII en el estado de fosforilación de Jak2.

PhosphoMotif Finder - Results

Your query protein contains 12 Tyrosine kinase / phosphatase motifs described in the literature and are underlined below.

```
MEMEKEFEEDKAGNWAAYQDIrHEASDFPCKVAKLPNKNRNRYRDVSPFDHSRIKLHQEDNDYIINASLIKMEEAQRSYLLTQGPLENTCGHFWMVWEQKSRGVVML
NRIMEKGSILKCAQYWPQQEEKEMVFDDTGLKLTLSEDVKSYYTVRQLELENLTTKETREILHFHYTWPDFGVPESFASFLNFKVRESGSLSLEHGPIVVHCSAGIG
RSGTFCLADTCLLLMDKRRKDPSSVDIKKVLLEMRRFRMGLIQTDQLRFSYLAVIEGAKFIMGDSSVQQMKELSREDLDLPEHVPPPPRPKRTLEPHNGKELFSS
HQWVSEETCGDEDSLAREEGRAQSSAMHSVSSMSPDTEVRRRMVGGGLQSAQASVPTEEELSSTEEHRAHWPSHWKPFLVNVCMATLLATGAYLCYRVCPH
```

Sort by

Position in query protein	Sequence in query protein	Corresponding motif described in the literature (phosphorylated residues in red)	Features of motif described in the literature	Link to original article describing the motif	
1	20 - 23	YQDI	pYXX(L/I/V)	JAK2 kinase substrate motif	PubMed
2	46 - 49	YRDV	pYXX(L/I/V)	JAK2 kinase substrate motif	PubMed
3	63 - 66	DNDY	[E/D]XXpY	ALK kinase substrate motif	PubMed
4	64 - 67	NDYI	X(E/D)pYX	EGFR kinase substrate motif	PubMed
5	64 - 67	NDYI	X(E/D)pY(I/L/V)	EGFR kinase substrate motif	PubMed
6	65 - 66	DY	[E/D/Y]pY	TC-PTP phosphatase substrate motif	PubMed
7	147 - 155	EDVKSYYTV	[E/D]X(L/I/V)XpYXX(L/I/V)	SHP1 phosphatase substrate motif	PubMed
8	152 - 153	YY	[E/D/Y]pY	TC-PTP phosphatase substrate motif	PubMed
9	152 - 155	YYTV	pYXX(L/I/V)	JAK2 kinase substrate motif	PubMed
10	153 - 154	YT	pY(A/G/S/T/E/D)	Src kinase substrate motif	PubMed
11	176 - 177	YT	pY(A/G/S/T/E/D)	Src kinase substrate motif	PubMed
12	271 - 274	YLAV	pYXX(L/I/V)	JAK2 kinase substrate motif	PubMed

Secuencia de PTP1B

Figura 30. Identificación de sitios de fosforilación en PTP1B. Se muestran la posición y secuencia de un total de 12 residuos de PTP1B que se fosforilan en tirosina, en donde el motivo YYTV de la posición 152-155 es sustrato de fosforilación por Jak2 UniProtKB - Q62120 (JAK2_MOUSE).

Como se muestra en la **Figura 31**, la AngII promueve un efecto dependiente del tiempo de estímulo en la fosforilación de la Tyr^{1007/8} de la cinasa JAK2, observándose que ésta

incrementa desde los 5 min de estímulo con AngII ($\approx 300\%$ comparado con el control), efecto que se mantuvo hasta los 60 min y posteriormente comienza a disminuir a partir de los 90 min.

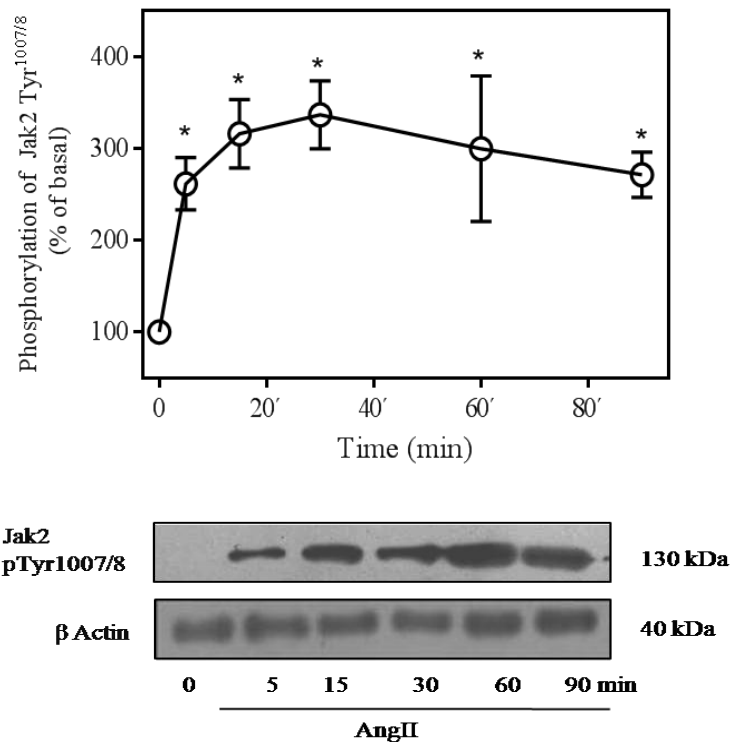


Figura 31. Efecto de AngII en la fosforilación de Jak2 Tyr^{1007/8}. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de AngII por 5, 15, 30, 60 y 90 min. La fosforilación en Tyr^{1007/8} de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-β Actina. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. * $p < 0.05$ vs el ontrol.

Para estudiar si la cinasa Jak2 está relacionada con la regulación de la PTP1B dependiente de AngII, se realizaron experimentos utilizando un inhibidor de Jak2; al evaluar la fosforilación en la Tyr¹⁵² de PTP1B, se encontró que, por una parte, ambas hormonas promueven un efecto en la fosforilación del residuo de Tyr¹⁵² de PTP1B de acuerdo a lo observado en las **Figuras 24 y 25**; sin embargo, al utilizar el inhibidor de la cinasa Jak2 previo al estímulo con ambas hormonas, se observó que se previene el efecto de AngII para incrementar esta fosforilación, efecto que no se observó con insulina. Por lo anterior,

nuestros datos sugieren que la AngII, a través de Jak2, activa a la PTP1B por fosforilación en la Tyr¹⁵² (Figura 32).

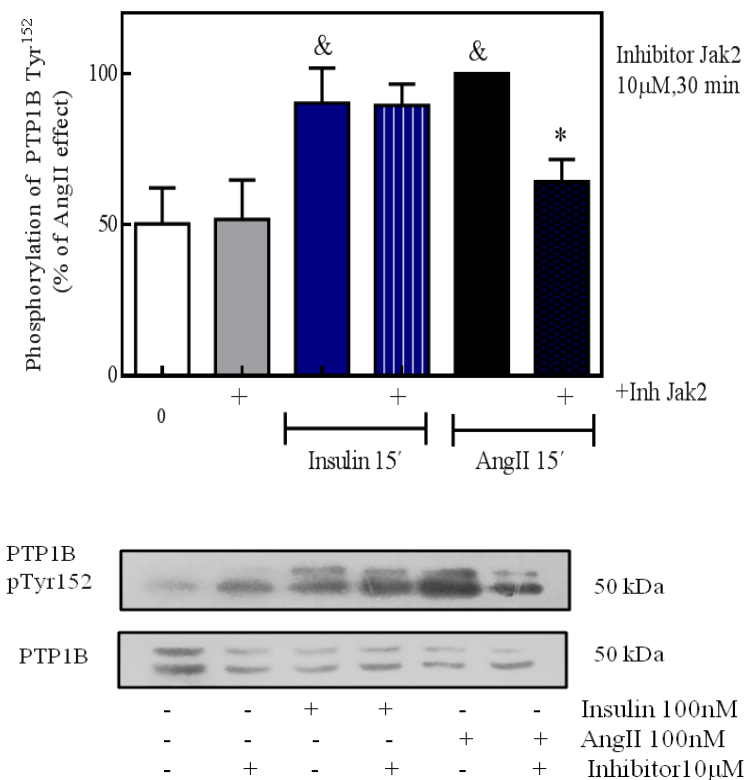


Figura 32. El inhibidor de Jak2 previene la fosforilación de PTP1B Tyr¹⁵² inducida por AngII. Lisados totales de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Las células se estimularon con el inhibidor de Jak2 10 μ M por 60 min, 100 nM de insulina o AngII por 15 min, inhibidor de Jak2 más Insulina o más AngII. La fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs estímulo con AngII.

3) La disminución en la actividad y expresión de PTP1B reduce el efecto de AngII en la señalización de insulina

a) Uso de un inhibidor específico de PTP1B

A continuación, se evaluó el efecto de la reducción de la función catalítica de PTP1B con dos aproximaciones experimentales: se utilizó un inhibidor permeable, selectivo, no competitivo y reversible de la PTP1B ($C_{26}H_{19}Br_2N_3O_7S_3$), y en la otra, se empleó un RNA interferente (siRNA) de la fosfatasa (ver Materiales y Métodos). En ambos casos se evaluó la vía de señalización de insulina a nivel de la fosforilación del IR en las Tyr¹¹⁵⁸, Tyr^{1162/63} y en Akt en la Ser⁴⁷³.

Para lo anterior, se desarrollaron cursos temporales (0.5 a 3 hrs) y cursos de concentración-respuesta (5 μ M a 200 μ M) con el inhibidor de PTP1B en la fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ inducida por insulina, por ser de las principales proteínas afectadas río abajo del IR (**Figuras 33 y 34**). Los resultados mostraron un incremento gradual en la fosforilación de Ser⁴⁷³ de Akt a partir de la media hora con estímulo previo con el inhibidor de PTP1B, observado un efecto máximo ~ 400%, comparado con insulina a las 2 y 3 horas (utilizando una concentración de 200 μ M) (**Figura 33**). De la misma forma, se observa un incremento dependiente de la concentración del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de este residuo, observando un efecto significativo a 200 μ M durante 2 horas de estimulación (**Figura 34**); de esos resultados, se realizó un análisis de transformación no lineal, con ayuda del programa GraphPad Prism, y obtuvimos que la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del inhibidor de PTP1B es de 100 μ M; así, decidimos que las condiciones para el resto de los ensayos fuera de 3 horas y una concentración de 200 μ M.

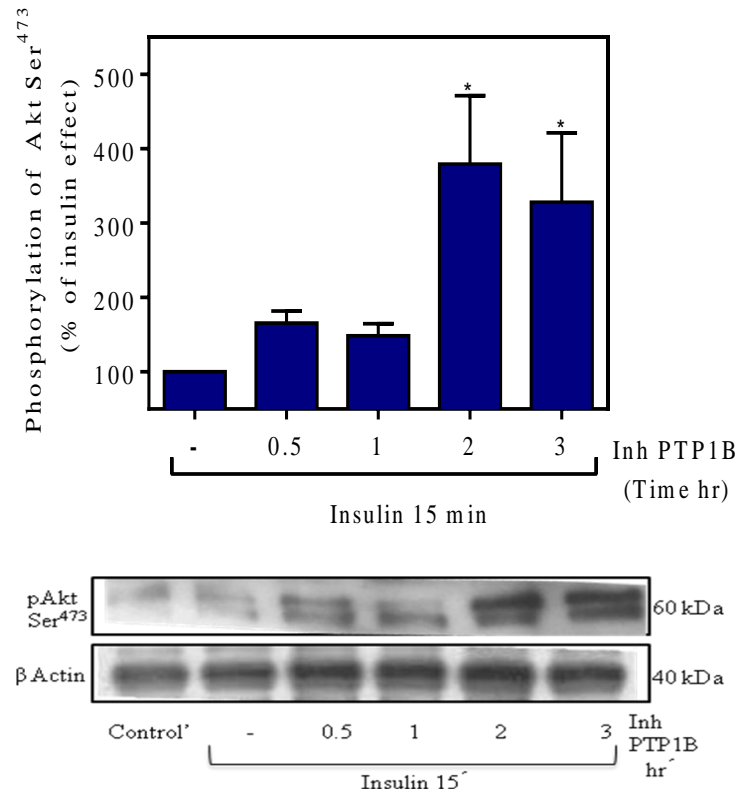


Figura 33. El inhibidor de PTP1B a diferentes tiempos incrementa la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³ inducida por insulina. Lisados totales de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Las células se estimularon con el inhibidor de PTP1B ($C_{26}H_{19}Br_2N_3O_7S_3$) 200 μ M por 0.5, 1, 2 y 3 hrs y 100 nM de insulina 15 min. La fosforilación en Ser⁴⁷³ de Akt se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti- β actina. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * $p < 0.05$ vs estímulo con insulina.

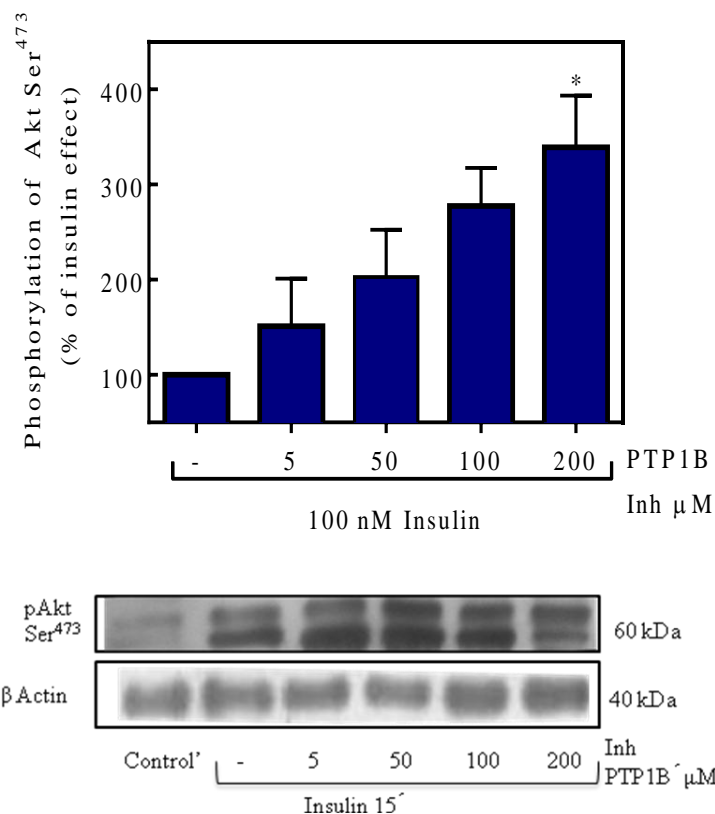


Figura 34. El inhibidor de PTP1B a diferentes concentraciones incrementa la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³ inducida por insulina. Lisados totales de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. Las células se estimularon con el inhibidor de PTP1B (C₂₆H₁₉Br₂N₃O₇S₃) 3 hrs con 5, 50, 100 y 200 μM y 100 nM de insulina 15 min. La fosforilación en Ser⁴⁷³ de Akt se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-β actina. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. * p< 0.05 vs estímulo con insulina.

Se evaluó el efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación del residuo Tyr¹⁵² que está fosforilado si PTP1B está activa (**Figura 35**). Como se observa en la **Figura 35**, al estimular a las células con insulina por 15 min se promueve la fosforilación de la Tyr¹⁵² de PTP1B, resultado consistente a lo observado en la **Figura 24**. Sin embargo, cuando se pre-estimulan las células con el inhibidor de PTP1B a 200 μM y a diferentes tiempos y posteriormente se estimulan con insulina, se reduce el efecto observado en la fosforilación de Tyr¹⁵² de PTP1B conforme al tiempo de estímulo con el inhibidor, observándose una

disminución del 25% desde los 60 min y alcanzando su efecto máximo a los 180 min, reduciendo el efecto de insulina del 40 %.

Previamente mostramos que la AngII redujo la fosforilación en la Tyr¹¹⁵⁸ del IR inducida por insulina (**Figura 15**); adicionalmente, se evaluó el efecto de la Ang II en la fosforilación de otro residuo importante para la actividad catalítica del IR, la Tyr^{1162/63}. Como se observa en la **Figura 36**, pre-estímulos por 5, 30 y 60 min con 100 nM de AngII redujeron el efecto de la insulina en la fosforilación de este residuo (del 50% del efecto con respecto al estímulo con insulina) desde los primeros 5 min, disminuyendo la fosforilación de este residuo a niveles por debajo del basal, y manteniéndose el efecto a los 30 y 90 min de estímulo con AngII. Al evaluar el efecto del inhibidor de la PTP1B (200 µM por 180 min) previo al pre-estimulo con AngII, se encontró que este inhibidor previene el efecto de la AngII para disminuir la fosforilación en la Tyr^{1162/63} del IR inducida por insulina (**Figura 37**).

De forma interesante, el inhibidor de la PTP1B, no previene el efecto de la AngII en disminuir la fosforilación en la Tyr¹¹⁵⁸ dependiente de insulina (**Figura 38**). Sin embargo, evaluando río abajo de la cascada de señalización, el inhibidor de PTP1B previno el efecto inducido por la AngII en la fosforilación de Akt en la Ser⁴⁷³ inducido por insulina (**Figura 39**), involucrando directamente a la fosfatasa PTP1B en el efecto que tiene AngII para promover resistencia a insulina en las células adiposas 3T3-L1.

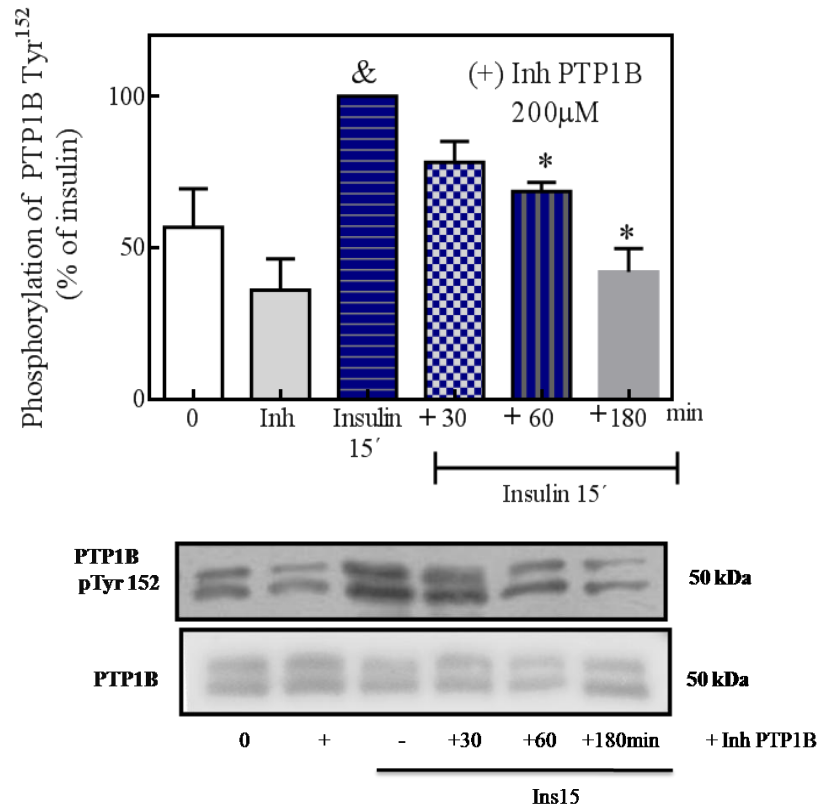


Figura 35. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de PTP1B Tyr¹⁵². Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de insulina por 15 min o con 200 μM del inhibidor de PTP1B (C₂₆H₁₉Br₂N₃O₇S₃) por 30, 60 o 180 min y posteriormente se estimularon con insulina 15 min. La fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-PTP1B. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & p<0.05 vs a 0 y * p<0.05 vs insulina.

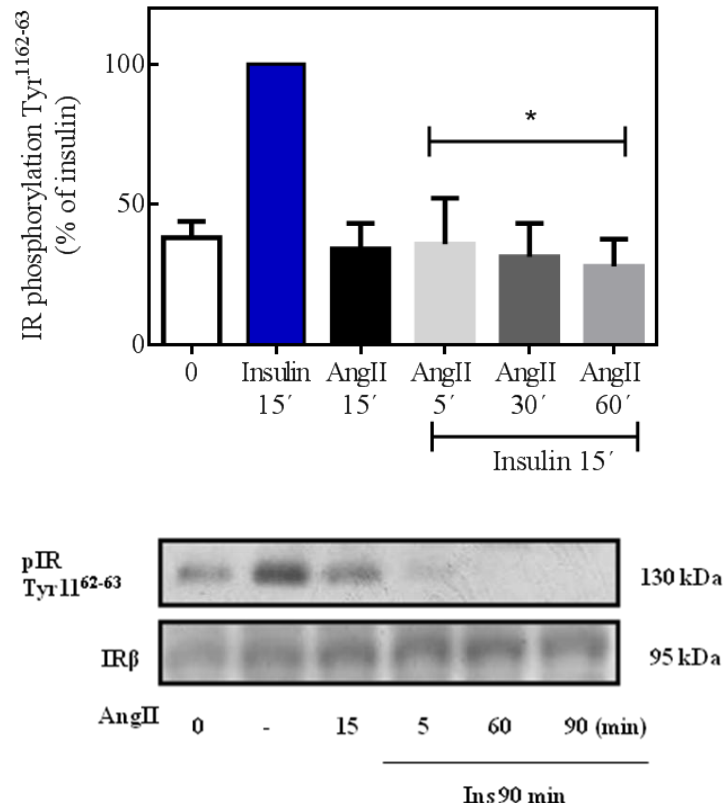


Figura 36. Efecto de la AngII en la fosforilación de IR^{Tyr^{1162/63}} inducida por insulina. Células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 100 nM de AngII durante 5, 60, y 90 min o se incubó con 100 nM de insulina por 90 min ó AngII 15 min, se determinó la fosforilación de IR^{Tyr^{1162/63}} de acuerdo con Materiales y Métodos. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. & $p < 0.05$ vs a 0 y * $p < 0.05$ vs insulina.

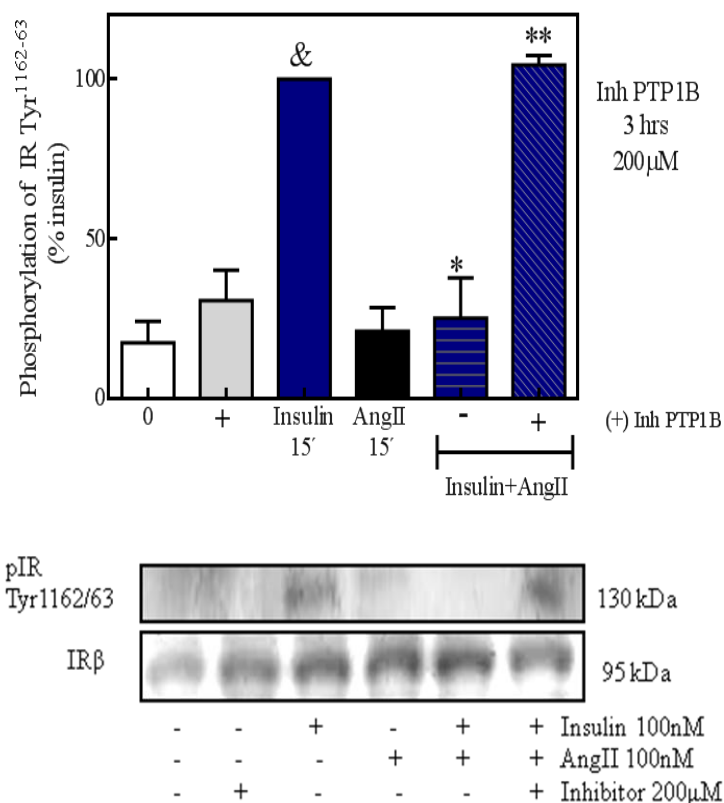


Figura 37. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de IR Tyr^{1162/63}. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 200 μM del inhibidor de PTP1B (C₂₆H₁₉Br₂N₃O₇S₃) por 3 hr, 100 nM de insulina por 15 min o 100 nM de AngII 15 min, AngII 15 min más insulina 15 min, inhibidor de PTP1B más AngII 15 min más insulina 15 min. La fosforilación en Tyr^{1162/63} de IR se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. & p<0.05 vs el control, * p<0.05 vs insulina, ** p<0.05 insulina más AngII.

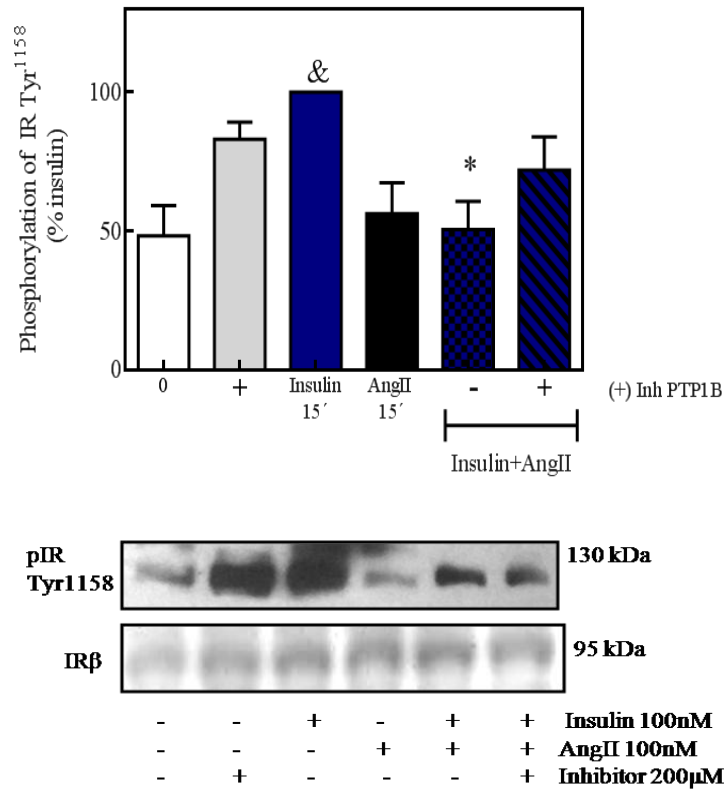


Figura 38. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de IR Tyr¹¹⁵⁸. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 200 μM del inhibidor de PTP1B (C₂₆H₁₉Br₂N₃O₇S₃) por 3 hr, 100 nM de insulina por 15 min o 100 nM de AngII 15 min; AngII 15 min más insulina 15 min; inhibidor de PTP1B más AngII 15 min más insulina 15 min. La fosforilación en Tyr¹¹⁵⁸ de IR se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR. La gráfica representa los datos obtenidos de cinco experimentos independientes y son expresados como el promedio ± el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. & p<0.05 vs 0 y * p<0.05 vs insulina.

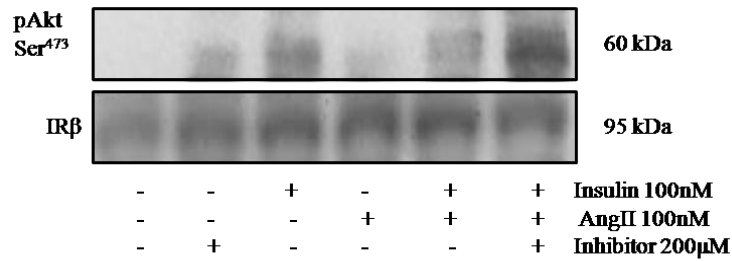
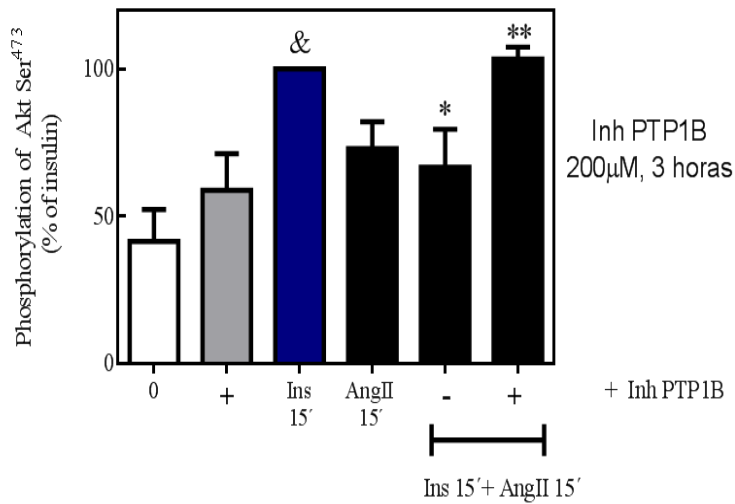


Figura 39. Efecto del inhibidor de PTP1B en la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se estimularon con 200 μ M del inhibidor de PTP1B (C₂₆H₁₉Br₂N₃O₇S₃) por 3 hr, 100 nM de insulina por 15 min, 100 nM de AngII 15 min; AngII 15 min más insulina 15 min; inhibidor de PTP1B más AngII 15 min más insulina 15 min. La fosforilación en Ser⁴⁷³ de Akt se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. & p<0.05 vs control, * p<0.05 vs insulina, ** p<0.05 vs insulina más AngII.

b) Uso de siRNA de interferencia de PTP1B

Hasta el momento habíamos observado que la reducción de la actividad de PTP1B con un inhibidor previno el efecto de AngII en la señalización de insulina en la fosforilación del IR en la Tyr^{1162/63} y Akt en la Ser⁴⁷³ (**Figuras 37 y 39**). Para evaluar cual era el efecto en la reducción endógena de la expresión de PTP1B, las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos, fueron transfectadas por electroporación (ver Materiales y Métodos) con un siRNA de la fosfatasa PTP1B, utilizando un siRNA control negativo (unconjugated siRNA) y un control positivo de transfección (proteína verde fluorescente GFP). Como se muestra en la **Figura 40**, se realizó un ensayo para evaluar la expresión de PTP1B después de la transfección del siRNA. Encontramos que hay una reducción significativa del 65 % en la expresión de PTP1B comparada con expresión endógena de las células y se observó reducción de 12.33% en las células transfectadas con el control negativo, efecto que podría deberse a la propia técnica. Así mismo, se evaluó la expresión de la proteína GFP y como se muestra en la **Figura 40**, únicamente se observó la banda correspondiente al peso de GFP en el extracto de células transfectadas con el plásmido correspondiente. Una vez determinadas las condiciones de transfección y con los controles adecuados, procedimos a la evaluación con diferentes estímulos de AngII e insulina, respectivamente, en la fosforilación del IR y Akt.

Posteriormente se determinó el efecto de la reducción de la expresión de PTP1B un curso temporal de pre-estímulos con Ang II (5, 30 y 60 min) y un estímulo único de insulina por 15 min en la fosforilación del IR en Tyr¹¹⁵⁸; donde observamos que todos los tiempos de pre-estimulo con AngII, la disminución de la PTP1B propició que AngII no disminuyera la fosforilación del IR promovido por insulina (**Figura 41-B**), el resultado observado es muy claro comparado con el control, en donde las células transfectadas con el siRNA control, AngII si disminuye la fosforilación del IR Tyr¹¹⁵⁸ de forma significativa (**Figura 41-A**).

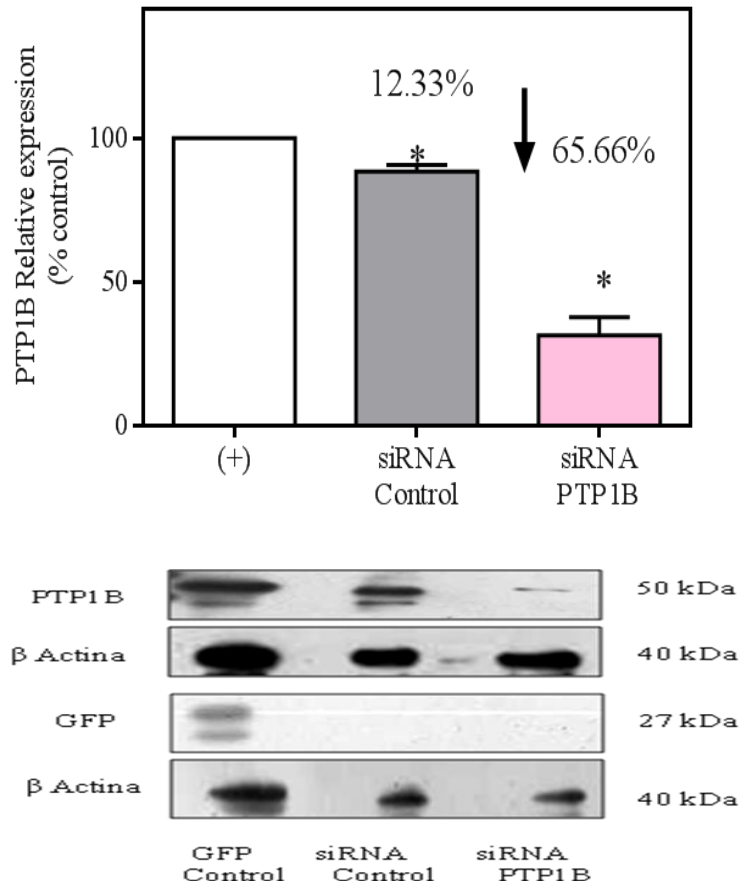


Figura 40. Evaluación de la expresión de PTP1B en células 3T3-L1 transfectadas con SiRNA de PTP1B. Los adipocitos (1×10^6 células) se transfectaron por electroporación con 100 nM del plásmido de GFP (+), 100 nM del siRNA control o 100 nM de siRNA de PTP1B. A partir del lisado total de las células 3T3.L1 se evaluó mediante Western Blot la expresión de PTP1B y GFP, además se evaluó β -actina como control de carga. Se muestran Blots representativos. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$ vs el control.

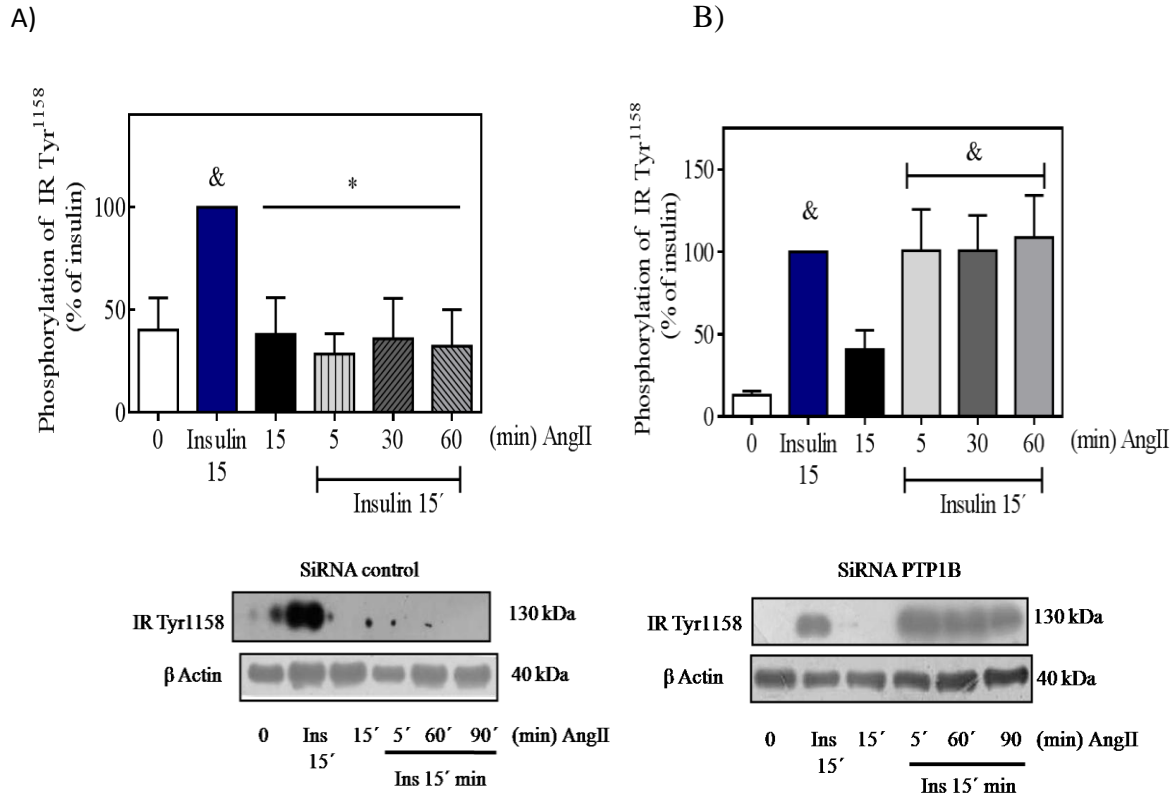


Figura 41. Efecto del siRNA control en la fosforilación del IR Tyr¹¹⁵⁸. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se transfectaron con (A) siRNA control-no conjugado o (B) con siRNA de PTP1B, de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos, se estimularon por diferentes tiempos con AngII 100 nM (5, 30 y 60 min) y posteriormente con 100 nM de insulina por 15 min. La fosforilación en IR Tyr¹¹⁵⁸ se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la grafica. & $p < 0.05$ vs el control, * $p < 0.05$ vs insulina.

Así mismo, se determinó el efecto del siRNA de PTP1B en la fosforilación del IR en la Tyr^{1162/63} comparado con el siRNA control, mediante el esquema experimental de pre-estímulos con AngII (5, 30 y 60 min) y un estímulo único de insulina por 15 min; en estas condiciones observamos, con diferentes estímulos de AngII, que en las células transfectadas con el siRNA control (**Figura 42-A**), hubo reducción significativa del IR en la fosforilación de la Tyr^{1162/63}, efecto que se previno en todos los tiempos de estímulo con AngII en las células transfectadas con el siRNA de PTP1B (**Figura 42-B**).

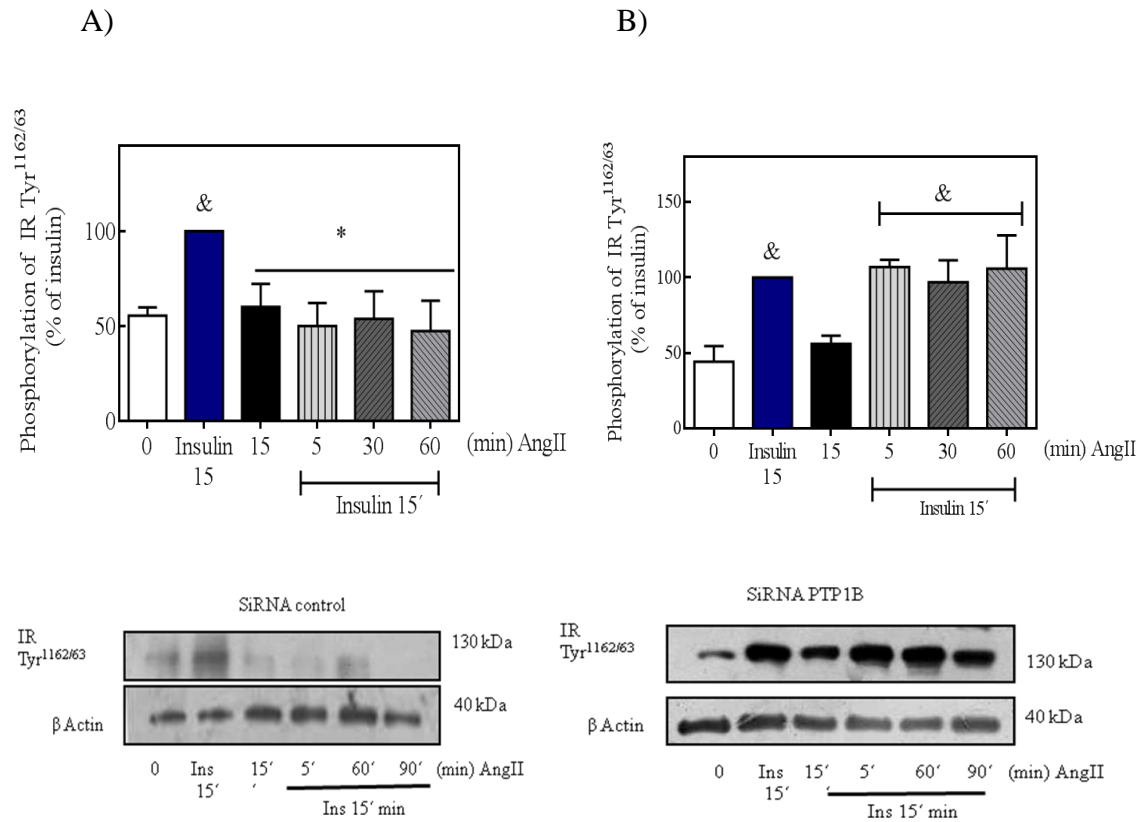


Figura 42. Efecto del siRNA control de PTP1B en la fosforilación del IR Tyr^{1162/63}. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se transfectaron con A) siRNA control-no conjugado o con B) siRNA de PTP1B, de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos, se estimularon por diferentes tiempos con AngII 100 nM (5, 30 y 60 min) y posteriormente con 100 nM de insulina por 15 min. La fosforilación en IR Tyr^{1162/63} se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti-IR. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs el control, * $p < 0.05$ vs insulina.

Además de evaluar el efecto del siRNA de PTP1B en la regulación del IR por Ang II, se determinó la fosforilación de la Ser⁴⁷³ de Akt, mediante un esquema experimental similar. En el experimento con el siRNA control, observamos una clara reducción de la fosforilación de Ser⁴⁷³ de Akt inducido por insulina (50% de reducción vs insulina en 30 y 60 min), promovido por pre-estímulos con AngII (**Figura 43-A**). En células 3T3-L1

transfectadas con el siRNA de PTP1B AngII no tuvo efecto en disminuir la fosforilación de la Ser⁴⁷³ de Akt estimulada con insulina (**Figura 43-B**), efecto muy similar en todos los tiempos de pre-estímulo con AngII.

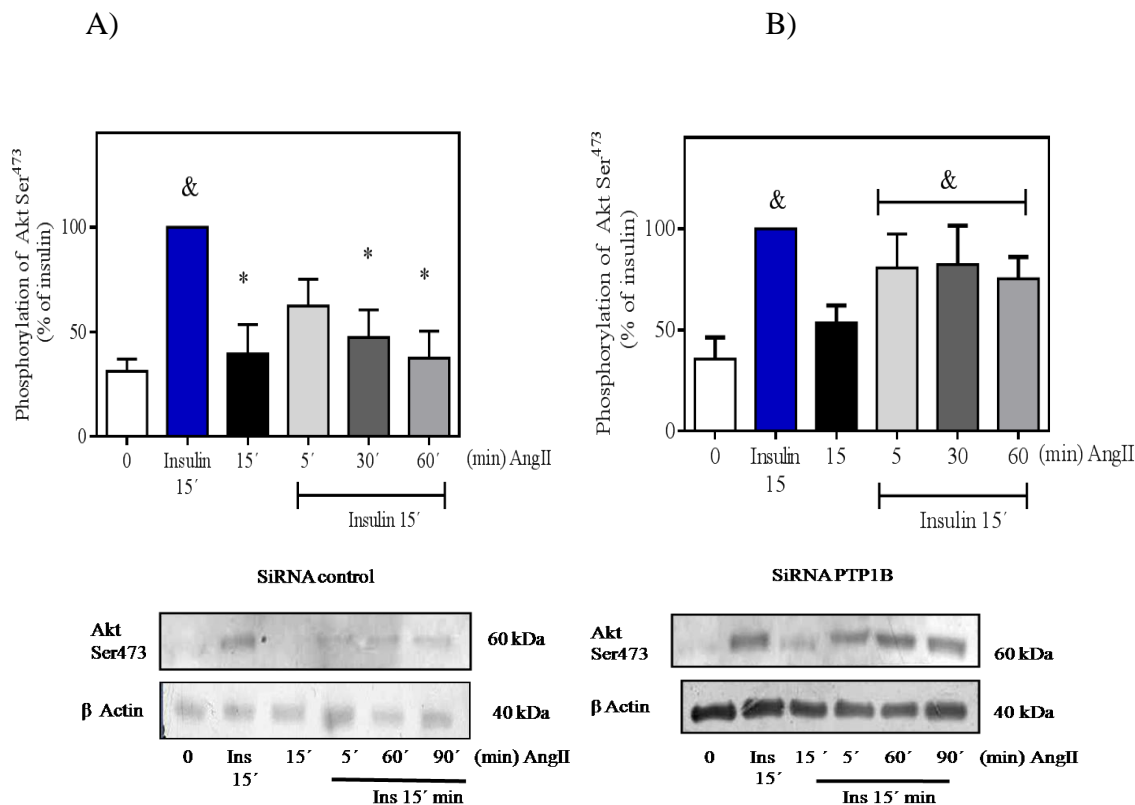


Figura 43. Efecto del siRNA control en la fosforilación de Akt Ser⁴⁷³. Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se transfectaron con A) siRNA control-no conjugado o B) siRNA de PTP1B (Materiales y Métodos), se estimularon por diferentes tiempos con AngII 100 nM (5, 30 y 60 min) y posteriormente con 100 nM de insulina por 15 min. La fosforilación en Akt Ser⁴⁷³ se evaluó como se describió en Materiales y Métodos. La cantidad de proteína total fue determinada utilizando el anticuerpo anti- β Actina. La gráfica representa los datos obtenidos de tres experimentos independientes y son expresados como el promedio \pm el error estándar. Se muestra un Blot representativo de la gráfica. & $p < 0.05$ vs el control, * $p < 0.05$ vs insulina.

8. DISCUSIÓN

Las vías de señalización que comparten la insulina y la AngII son particularmente importantes, debido al significado de estas hormonas y sus mecanismos de acción en el desarrollo de patologías como la hipertensión, la resistencia a la insulina, la aterosclerosis, entre otras. La mayoría de los mecanismos que participan en esta regulación se han estudiado en modelos de células vasculares. Sin embargo, aunque estas células tienen un papel importante en el desarrollo de la hipertensión y la resistencia a la insulina, hay muchas evidencias de que el tejido adiposo, como órgano endocrino, también contribuye de forma importante en el desarrollo de estas enfermedades.

Al respecto, diversas investigaciones han demostrado que el tejido adiposo expresa un sistema de renina angiotensina local (Engeli y cols., 2000; Cassis y cols., 2008). En el presente estudio, se empleó el modelo celular de adipocitos 3T3-L1 para investigar el efecto de AngII en la señalización de insulina. Este modelo celular expresa de forma endógena los receptores para AngII, AT₁R y para insulina, IR y se ha reportado que es útil para estudiar las vías de señalización de la insulina, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares (Mallow y cols., 2000; Thatcher y cols., 2009). Los resultados aquí presentes son importantes en la comprensión de las funciones de AngII en el tejido adiposo. También es relevante destacar que otros estudios no habían observado un efecto regulador de AngII a nivel del propio IR, a través de la activación de PKC para regular la señalización de insulina.

En el trabajo de maestría, observamos que la AngII promueve la fosforilación total de Ser del IR de manera dependiente del tiempo, y no hubo efecto a nivel del IRS-1. Estos hallazgos difieren a lo encontrado en células VCMSs, donde el pretratamiento con AngII aumenta la fosforilación en Ser del IR y del IRS-1, aunque AngII no tuvo efecto en la fosforilación de Tyr de IR, pero redujo la fosforilación de Tyr del IRS en 50% (Folli y cols., 1997). También en maestría, se demostró que en adipocitos 3T3-L1, la fosforilación en serinas inducida por AngII es dependiente de PKC, ya que la inhibición por BIM previno este efecto después de estimular con Ang II. Al respecto, encontramos que el IR es

un sustrato de fosforilación de PKC después estimular con AngII (**Figura 19**) y en un análisis *in vitro*, identificamos que en el IR hay 54 posibles residuos blanco de PKC (**Figura 20**), los cuales corresponden a sitios muy próximos a los residuos de Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁶³ en el dominio de cinasa del IR; sin embargo, es necesario estudiar con otros enfoques la relevancia de estos sitios y su relación directa con el efecto de AngII. En ese sentido se han identificado diversos residuos de Ser en el IR como sitios de fosforilación, de acuerdo a Ullrich (1985), e incluyen a las Ser^{955/56} (Feener y cols. 1993; Liu y Roth 1994a), ^{1023/25} (Liu & Roth, 1994b), Ser^{1293/94} (Lewis y cols. 1990a), Ser¹³⁰⁹ (Al-Hasani y cols. 1997), Ser¹³¹⁵ (Coghlan y cols., 1994; Feener y cols., 1994) y Ser^{1177/78/82} (Bossenmaier y cols., 2000). Además, el residuo Thr¹³³⁶ es el principal sitio blanco de fosforilación por PKC (Lewis y cols., 1990b).

Al respecto, en 1986 Bollag GE y colaboradores observaron en preparaciones purificadas del IR y de PKC, que activadores de PKC como ésteres de forbol, calcio y diacilglicerol, disminuyen la actividad intrínseca de cinasa de tirosina del IR, sin afectar la unión de insulina a su receptor, al fosforilar al IR por acción directa de PKC (Bollag y cols., 1986); también se estudió en células de hepatoma de Fao, que la incubación con ésteres de forbol, durante 1, 30 y 60 min estimuló la fosforilación *de novo* en residuos de serina y disminuyó la fosforilación estimulada por insulina en la subunidad- β del IR, y que con el tratamiento de fosfatasa alcalina la fosforilación estimulada por insulina regresó casi al nivel de control (Takayama y cols., 1988). Aunque no evaluamos residuos específicos de Ser / Thr en el IR, nuestros resultados hacen notar la relevancia del papel de la fosforilación en Ser del IR inducida por AngII por activación de PKC en células 3T3-L1.

Por otra parte, se conoce que, en resistencia a la insulina, la acumulación de lípidos intracelulares incrementa los valores de DAG lo que, a su vez, promueve la posibilidad del aumento en la activación de isoformas clásicas y nuevas de PKC (Standaert y cols., 1996; Ishizuka y cols., 1989). Además, se ha estudiado que la activación de isoformas específicas de PKC puede variar de acuerdo al patrón de distribución celular, requerimientos de cofactores y respuestas fisiológicas específicas. Por ejemplo, después de estimular receptores que activan a la fosfolipasa C, se ha observado en diferentes sistemas la translocación de PKCs a la membrana plasmática de forma selectiva (Dekker y Parker.,

1994); este movimiento involucra a proteínas que interactúan con PKC y las secuestran a diversos compartimentos celulares (Jaken S y Parker PJ, 2000). En ese sentido, imágenes de fluorescencia en VSMCs revelan que PKC α se acumula en la membrana durante la estimulación de esos receptores, mientras PKC ϵ tarda más tiempo en translocarse, mostrando que cada isoforma puede tener un patrón diverso de translocación y por lo tanto, influir en su activación (Johannes CL y cols., 2002), lo que soporta la idea de que más de una isoforma puede participar e interferir con la señalización de insulina.

En células 3T3-L1 se expresan PKCs clásicas, nuevas y atípicas, de las cuales se ha observado que PKC α , β y ζ participan en el transporte de glucosa estimulado por insulina en estas células (Bandyopadhyay G y cols., 1997). En este trabajo se observó la fosforilación dependiente del tiempo mediada por AngII de las isoformas PKC α , β I, β II, δ y ϵ (**Figura 21**), evidenciando su activación en estas células. También se observó que AngII estimuló la interacción de IR con isoformas clásicas de PKC α , β I, β II y δ (**Figura 22**). De forma similar, en otros modelos se ha indicado la participación de estas PKCs en la regulación del IR; varios laboratorios han mostrado que la activación de PKC α con PMA (Takayama y cols., 1987) o en cultivos con alta glucosa (Berti y cols., 1994) puede producir resistencia a la insulina al fosforilar en Ser al IR. Además, en ratones *knockout* de PKC α se mejora la señalización de insulina en músculo y tejido adiposo (Letiges y cols., 2002). Así mismo, se ha estudiado que la activación de PKC δ participa en la resistencia a insulina inducida por dieta en ratas obesas Zucker (Greena y cols., 2014). Por otra parte, estudios en hígado de ratas obesas se encontró que, la fosforilación en Ser⁹⁹⁴ del IR promovida por las PKC α , β I y ζ aumentó notablemente; sin embargo, no se detectó fosforilación en ese residuo en receptores de insulina aislados del músculo esquelético de estos animales (Coba y cols., 2004). Por otra parte, un informe reciente indica que la fosforilación de la Thr¹¹⁶⁰ en IR por PKC ϵ parece ser importante para la resistencia a la insulina hepática inducida por lípidos *in vivo*. El residuo de Thr¹¹⁶⁰ ha sido relacionado con el deterioro de la actividad enzimática del IR desestabilizando la configuración activa del receptor (Petersen, y cols., 2017).

Sin embargo, nuestros resultados muestran una asociación significativa del IR con PKC β II promovido por AngII, comparada con el resto de las isoformas (**Figura 22**), lo que es consistente con otros trabajos; en estudios clínicos, se ha encontrado que el IR aislado de

músculo de pacientes obesos con resistencia a insulina y pacientes con diabetes gestacional, el tratamiento con fosfatasa alcalina incrementa la actividad de cinasa del IR por desfosforilar los residuos de Ser/Thr fosforilados por PKC (Shao y cols., 2000; Itani y cols., 2000), principalmente por PKC β (Itani y cols., 2000; Cortright R y cols., 2000). Además, se ha demostrado que PKC β I y β II regulan la actividad del IR por fosforilar los sitios Ser¹⁰⁰⁶, Ser¹⁰³⁵ y Ser¹⁰³⁷ (Bossenmaier y cols., 1997; Strack y cols., 2000).

Así mismo, se ha encontrado en adipocitos 3T3-L1, en condiciones de alta glucosa o estimulados con PMA, que el IR interactúa con las isoformas de PKC β I, y β II, siendo mayor la disminución en la actividad de cinasa de tirosina del IR con PKC β II, debido a que esta isoforma interactúa con el dominio catalítico en lugar del dominio regulador del IR (Pillay y cols., 2004). Al respecto, se encontró que AngII o la activación de PKC β II está involucrada en la inhibición de la fosforilación de Tyr del IR en células endoteliales (Park y cols., 2013).

En resumen, aunque se requieren estudios más específicos para identificar el papel de estas isoformas, así como de las serinas fosforiladas en el IR en los que participan regulando las acciones de insulina, se sugiere que la isoforma PKC β II, es la efectora de las acciones de AngII para regular a IR al fosforilar residuos de Ser, en adipocitos 3T3-L1.

En la etapa número 2, investigamos el efecto de AngII en reducir la fosforilación en Tyr del IR, ya que los resultados con el inhibidor de PKC, BIM, en la captación de glucosa sugieren que AngII está alterando la señalización de insulina por más de un mecanismo, por ejemplo, por la activación de PTPs. Como se mencionó, AngII conduce a una reducción del efecto inducido por insulina en la fosforilación en Tyr¹¹⁵⁸ (**Figura 15**) y Tyr^{1162/63} (**Figura 34**); se observó, además, que AngII estimuló la asociación de PTP1B con el IR (**Figura 16**). En este orden de ideas, la unión de insulina al IR promueve la autofosforilación de las Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ en el dominio de cinasa y causa un cambio conformacional en el *loop* de activación para la unión de ATP y de sus sustratos proteicos (Hubbard y cols., 1997). Por ello, evaluamos el efecto de AngII en la fosforilación inducida por insulina de estos residuos del IR. En los resultados con el inhibidor de PTP1B en la fosforilación de Tyr¹¹⁵⁸ en IR, se muestra que, el inhibidor no tuvo efecto en el provocado por AngII

(Figura 38), sin embargo, cuando se evaluó la fosforilación en Ser⁴⁷³ Akt y Tyr^{1162/1163} del IR inducidas por insulina (Figura 39 y 37), el inhibidor sí previno el efecto de AngII. En este sentido, estos resultados podrían explicarse así: la respuesta con el inhibidor tendió a prevenir el efecto de AngII en la reducción de la fosforilación inducida por insulina, sin embargo, el estímulo podría mostrar la suma de los mecanismos regulatorios de ambas hormonas, lo que no permite que el análisis estadístico refleje el valor neto de esta respuesta. Por otra parte, ese inhibidor es alostérico (inactiva a la fosfatasa al no permitir el cierre del *loop* WDP, importante para que inicie su actividad catalítica) (Tlantian y cols., 2016), por lo que el efecto en un residuo podría ser por la conformación de la fosfatasa PTP1B más el inhibidor, permitiendo el acceso de solo ciertos sustratos. Al discutir si el efecto es debido a si PTP1B tiene sustratos de desfosforilación específicos, Zhang y cols., (1993), mostraron que las PTPs tienen afinidad por sustratos de desfosforilación con más de una Tyr fosforilada contigua, con constantes de especificidad K_{cat}/K_M (constante catalítica/ constante de Michaelis-Menten) para los fosfopéptidos óptimos de 3-4 órdenes de magnitud mayor que para la fosfotirosinas solas en un péptido sustrato (Zhang, y cols., 1993). De forma interesante, en un trabajo donde se generaron péptidos-mono, bi y tri fosforilados con la secuencia DITYETDYRKGKGLL del IR y se probaron como sustratos de PTP1B, los ensayos de desfosforilación por fluorometría, exhiben afinidad de PTP1B por sustratos bi y trifosforilados con K_M s de 14 y 8 micromolar, respectivamente, comparado con monofosforilados (K_M mayor de 100 micromolar) (Salmeen y cols., 2000). Lo anterior sugiere una explicación a la respuesta observada con el inhibidor de PTP1B en la Tyr¹¹⁵⁸ comparado con Tyr^{1162/63} del IR. Una explicación alternativa sería lo mostrado por Salmeen y cols., quienes indicaron que la Tyr¹¹⁵⁸ no determina la interacción de PTP1B con el IR. Por otra parte, la interacción específica de PTP1B en la secuencia del IR, muestra que el IR se une al sitio catalítico de PTP1B en donde estos residuos están en contacto de forma directa con la fosfatasa, de esta forma, la Tyr¹¹⁶² interactúa con PTP1B directamente en su segmento de activación y la Tyr¹¹⁶³ está cerca del sitio de reconocimiento de pTyr en PTP1B (Salmeen y cols., 2000). Además, esta interacción es específica para PTP1B, ya que comparaciones con secuencias de otras PTPs como TCPTP u otros receptores, como el EGFR difieren en el mecanismo (White y cols. 1988; Jia y cols. 1995). En un estudio en células GH4 (línea celular de Neoplasia de la glándula pituitaria de la rata) el tratamiento

de insulina incrementa la expresión del gen de prolactina a través del IR endógeno; sin embargo, cuando las células se transfectan con el IR con el dominio de cinasa mutado (K1030R), no se incrementa la expresión de prolactina. En ese estudio, la mutación en la Tyr¹¹⁵⁸ no reduce la expresión de prolactina inducida por insulina, mientras la mutación de Tyr^{1162/63} reduce la expresión en un 50%, y la triple mutación ocasiona la inactivación del IR. Lo anterior sugiere que la fosforilación del IR es un evento en cadena y complejo y resulta difícil determinar que residuo es determinante para su función (Jacob y cols., 2002).

Es posible que al usar el inhibidor de PTP1B, el resultado que se observa en el Western Blot, refleje solo la recuperación de los sustratos de PTP1B que son desfosforilados con mayor afinidad. A pesar de que la respuesta de AngII es clara para afectar la fosforilación de los tres residuos de tirosina del IR (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³) es probable que la reducción de la fosforilación de Tyr¹¹⁵⁸, sea consecuencia de la desfosforilación de Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³ o sea efectuado por otra fosfatasa de tirosina como la fosfatasa LAR (Lee y cols., 1992), ya que esta fosfatasa desfosforila la Tyr¹¹⁵⁸ del IR con aunque con una cinética más lenta (Lee y cols., 1992). Sin embargo, no existen evidencias que indiquen una relación entre la fosfatasa LAR y su activación promovida por AngII en tejido adiposo, por lo que podría quedar abierta esa posibilidad y la relación con otras fosfatasas de tirosina, en futuros acercamientos experimentales.

Por otra parte, los mecanismos de regulación de PTP1B en tejido adiposo no han sido esclarecidos. Debido a que PTP1B es un regulador fisiológico de la señalización de insulina y el balance energético, su papel en tejido adiposo requiere más investigación. En este sentido, a pesar de la discrepancia de los efectos del inhibidor de PTP1B, evidenciamos de forma directa el papel de la fosfatasa PTP1B en la respuesta de AngII en la señalización de insulina cuando se reduce su expresión con siRNA, evidenciando una mejora en la señalización de insulina a nivel de Akt Ser⁴⁷³, y mostrando que PTP1B sí participa en la desfosforilación de los tres residuos de Tyr del IR estudiados, la Tyr¹¹⁵⁸ y Tyr^{1162/63}, ya que se recupera por completo su fosforilación en los adipocitos transfectados. Sin embargo, en ratones con obesidad inducida por dieta y deficientes de PTP1B (homocigotos), se mejora la incorporación de glucosa estimulada por insulina y la sensibilidad a insulina en el

músculo esquelético, pero en tejido adiposo no se mejoran los efectos perjudiciales de la obesidad en ese modelo (Klaman y cols., 2000). Además, en trabajos donde ratones con depleción de PTP1B específicos de tejido adiposo (Adip-cre PTP1B^(-/-), aP2), no hubo efectos benéficos en la regular vías de señalización reguladoras la homeostasis de glucosa (PI3K, Akt), metabolismo de lípidos o secreción de adipocinas en adipocitos y se menciona que PTP1B parece no ser regulador negativo del IR (Mao y cols., 2009; Wang y cols., 2010; Bakke y cols., 2013; Song y cols., 2013; Owen y cols., 2012). Lo anterior sugiere que el efecto observado depende de un estímulo desensibilizador de insulina, ya que en otros modelos de ratones *knockout* específicos de PTP1B de tejido adiposo, al ser alimentados con dieta alta en grasa, disminuye la fosforilación del IR y Akt, adicional al incremento en la expresión de genes lipogénicos; además, tienen intolerancia a glucosa, disminución de sensibilidad a leptina y adipocitos más grandes (Mao y cols., 2009; Wang y cols., 2010; Bakke y cols., 2013; Song y cols., 2013; Owen y cols., 2012). En este sentido, se ha observado que en animales obesos con resistencia a insulina se incrementan la expresión y actividad de PTP1B (Tagami y cols., 2002; Gonzalez y cols., 2012). Así mismo, la pre-incubación de las VSMC con oligonucleótidos anti-sentido que suprimen la expresión de PTP1B, promueve que AngII no altere la fosforilación inducida por insulina del IRS-1 (Marrero y cols., 2003). Estas evidencias indican que, hay un efecto muy importante de PTP1B pero únicamente en condiciones de resistencia a la insulina y no *per se* por la expresión de esta fosfatasa en modelos sensibles a insulina, aunque es indudable su participación como un factor importante en la adipogénesis y diferenciación en tejido adiposo (Matsuko y cols., 2011).

Por otra parte, PTP1B interactúa con diversas proteínas incluyendo el IR (Bandyopadhyay y cols., 1997; Seely y cols., 1996), el receptor de EGF (Tiganis y cols., 1998), y los componentes de la vía de JAK-STAT (Gu y cols., 2003; Myers y cols., 2001). Además, PTP1B es regulada por fosforilación en respuesta a estímulos con EGF, PDGF e insulina (Bandyopadhyay y cols., 1997; Chernoff, 1997 y cols., 2001; Iliuk y cols., 2010; Ol sen y cols., 2006; Rigbolt y cols., 2011), aunque aún se desconoce el efecto de cada uno de estos sitios de fosforilación. Por ejemplo, el EGF promueve la fosforilación en Tyr⁶⁶ de PTP1B, aunque, las consecuencias de esta fosforilación aún no son claras (Liu y Chernoff, 1997;

Nemoto y cols., 2014). Por su parte se ha estudiado en células COS7 que los residuos Tyr⁶⁶, Tyr¹⁵² y/o Tyr¹⁵³ de PTP1B cuando están fosforilados, son los principales sitios de fosforilación estimulados por insulina y estos promueven su asociación con el IR (Bandyopadhyay G, y cols., 1997); además, se ha demostrado que la fosforilación en las Tyr¹⁵² y Tyr¹⁵³ de PTP1B contribuye a la interacción del amino terminal de ésta fosfatasa con el IR y que, alterar la fosforilación de los mismos, o mutarlos, podría afectar la habilidad de PTP1B para regular negativamente la señalización de insulina (Shrikrishna D y cols., 2000). En este sentido, nosotros observamos que, en estas células, no solo insulina, sino también AngII estimula la asociación del IR con PTP1B y provoca cambios en el estado de fosforilación de esta fosfatasa dependiente del tiempo de estímulo. Al respecto, nuestros resultados muestran que hay un incremento en la fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B, alcanzando efectos máximos después de 30 min de estímulo tanto con insulina como con AngII, con lo que sugerimos que ambas hormonas, promueven la activación de PTP1B en nuestro modelo celular. Al respecto, en adipocitos y músculo de ratón que fueron estimulados con insulina *in vivo* se observó un incremento transitorio en la fosforilación en tirosinas totales de PTP1B, teniendo un máximo en los 15 min y como resultado una disminución en la actividad de PTP1B de 50-70% (Tao y Cols., 2001). Al respecto, en los resultados mostrados por Tao y colaboradores, es posible que intervengan factores de regulación distintos por ser ensayos *in vivo* y es probable que no todos los residuos fosforilados en Tyr se relacionan directamente con la activación de PTP1B; sin embargo, consideramos que sería de mucha utilidad evaluar la actividad enzimática de PTP1B para poder discutir si el efecto que evaluamos de la fosforilación en la Tyr¹⁵² también se refleja en la capacidad de la fosfatasa para desfosforilar al IR.

En nuestro trabajo, evaluamos el efecto de AngII en la fosforilación de Ser⁵⁰, otro residuo implicado en los mecanismos de regulación de PTP1B ya que cuando esta fosforilación se modifica se altera la habilidad de PTP1B para unirse al IR y desfosforilarlo (Lingamanaidu y cols., 2001). En este contexto, observamos que insulina promueve la fosforilación de este residuo con efectos máximos significativos entre 30-90 min; sin embargo, AngII no promueve ningún efecto en esta fosforilación; por su parte, Nemoto y cols., mostraron que AngII vía AT₁R inhibe la fosforilación inducida por insulina de PTP1B en Ser⁵⁰ en aortas

de rata, y relacionan este efecto con la disminución de la activación de la PTP1B (Nemoto y cols., 2014). Por otra parte, en tejido adiposo extraído de ratón, después de 15 min de estímulo con insulina, se disminuyó la fosforilación en serinas totales de PTP1B en 20%, además del incremento en AMPc y la activación de PKA, la cual proponen como la enzima que fosforila en Ser a PTP1B y la activa (Tao y cols., 2001). Aunque estos resultados no están de acuerdo con los nuestros ni con los de otros autores (Lingamanaidu y cols., 2001; Bandyopadhyay y cols., 1997; Nemoto y cols. 2014); en células Hela estimuladas con PMA, se aumentó la fosforilación en Ser de PTP1B. Sin embargo, el tratamiento con PMA parece no afectar la actividad de PTP1B directamente (Flint y cols., 1996), por lo que sería importante esclarecer si estos mecanismos relacionados con la fosforilación en Ser, son dependientes del modelo utilizado y en nuestro caso, también evaluar cómo se encuentra la actividad catalítica de PTP1B, si se modifica la fosforilación del residuo Ser⁵⁰ en los adipocitos 3T3-L1 y bajo nuestras condiciones experimentales.

De forma interesante se ha demostrado que, las cinasas involucradas en la regulación de los sitios de fosforilación en Ser de PTP1B, son las cinasas PKC y PKA. En este contexto, Flint y cols, encontraron que TPA promueve la fosforilación en Ser³⁷⁸ de PTP1B vía PKC, aunque la función de esta fosforilación aún no es clara (Shifrin y cols., 1993; Flint y cols., 1996). Adicionalmente, se ha mostrado que la activación de PKA promueve la fosforilación de PTP1B en la región 283-364, sobre todo en la Ser³⁵² localizada entre el motivo Lys-Gly-Ser-Pro-Leu (Brautigan y cols., 1993; Shifrin y cols., 1997); así mismo, PTP1B tiene cambios en su estado de fosforilación en los residuos Ser³⁵² y Ser³⁸⁶. Sin embargo, nuestros resultados evidencian que la cinasa que participa en la regulación en Ser⁵⁰ de PTP1B inducida por insulina es Akt, lo que concuerda con lo reportado en células NIH-3T3 (IR), en donde se encontró que la Ser⁵⁰ es fosforilada por Akt por acción de la insulina (Ravichandran y cols., 2001).

Por otra parte, se ha estudiado poco acerca de la regulación de las PTPs, especialmente de la PTP1B promovida por AngII; encontramos que con AngII incrementa la fosforilación en la Tyr¹⁵² de PTP1B. En ese orden de ideas, se ha reportado que AngII puede regular PTPs, al inducir la activación de la NADPH oxidasa, incrementando las EROs y regulando de forma reversible la actividad de las PTPs (Xu y Finkel, 2002; Touyz y cols., 2003), además,

AngII promueve la producción de EROs en adipocitos, inhibe la señalización de IRS-1 dependiente de insulina (Yanagitani y cols., 1999) e induce la expresión de fosfatasa 1 de la MAPK en células adrenales en bovino (Casal y cols., 2007). Recientemente, se reportó que en aortas aisladas de ratas Goto-Kakizaki, la AngII inhibe la relajación inducida por insulina al suprimir la vía de IRS-1/eNOS/NO por acción de la PTP1B. También se reportó que AngII incrementa la fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B (Nemoto y cols., 2014), consistente con nuestros hallazgos. Por otra parte, se ha observado que el receptor AT₂ de AngII, contrarresta la activación de cinasas de Tyr mediado por el receptor AT₁, al activar fosfatasas de Tyr y Ser/Thr, lo que disminuye el crecimiento celular estimulado por factores de crecimiento (Inagami y cols., 1999; Kambayashi y cols., 1993). Los receptores AT₁ también activan cascadas de señalización asociadas con factores de crecimiento y citocinas, que induce la expresión de genes de respuesta temprana de crecimiento. Se han implicado 3 vías en la activación de proto-oncogenes: las vías de JAK/STAT, de p21ras/Raf-1/MAPK, y la de PLC (Bernstein y Marrero; 1996), donde los tiempos de activación varía de segundos (activación de PLC y generación de inositol fosfatos) a minutos (MAPK) u horas (JAK/STAT) (Bernstein y Marrero; 1996). Es bien conocido que las fosfatasas SHP1, SHP2, PTP1B y TC-PTP regulan negativamente la vía JAK-STAT (Hutchins y cols., 2013), aunque esta regulación sólo ha sido estudiada en células de cáncer y hematopoyéticas, así como en la señalización por leptina en el sistema nervioso central (Tiganis y cols., 2013; Xu y cols., 2008; Tsou y cols., 2012). Se sabe que PTP1B desfosforila a Jak2 y Tyk2, pero no a Jak1 en respuesta a IFN α y γ (Myers y cols., 2001). Resultados en células de músculo liso de aorta de rata, indican que además de insulina, AngII promueve la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 en residuos de Tyr, producto de la asociación y la activación de Jak2 (Velloso y cols., 2006). Además, PTP1B participa como regulador de JAK-STAT en enfermedades metabólicas e inflamación, así como en respuesta inmune y cáncer (Feldhammer y cols., 2013). Sin embargo, la relación de Jak2-PTP1B no es conocida. PTP1B, ha emergido como fosfatasa clave responsable de la resistencia a insulina y a leptina; se ha observado que en el hipotálamo de ratones obesos, el ejercicio agudo, reduce la actividad y la expresión de PTP1B así como su interacción con el IR e IRS y componentes de la señalización de leptina como Jak2, incrementando la fosforilación en Tyr de éstas moléculas y restaurando los efectos anorexigénicos de insulina,

así como la promoción de respuesta anti-inflamatoria (Chiarreotto y cols., 2013). Respecto a la activación de PTP1B por AngII, mostramos, por primera vez que Jak2, activado por AngII desde los 5 min y hasta una hora y media puede conducir a la fosforilación de la Tyr¹⁵² de PTP1B; la única evidencia de esta asociación, es en células vasculares, donde PTP1B es activada por AngII de forma dependiente de Jak2/Ikβ/PKA, posicionando a Jak2 río arriba de la regulación de PTP1B (Ketsawatsomkron y cols., 2010).

La proteína Jak2, participa en regular vías de señalización de receptores de citosina/hematopoyetina, de RTKs y de GPCRs (Mazurkiewicz y cols., 2006). En macrófagos, la diferenciación inducida por PKC α y PKC δ causan la reducción de la fosforilación en Tyr de Jak2 inducida por IL3, mientras que en células 32D (células hematopoyéticas multipotenciales) y COS7, PKC δ inhibe a Jak2, por fosforilación en Ser/Thr (Kovanen y cols., 2000). Así mismo, Jak2 puede ser fosforilado en Ser⁵²³ en respuesta a PMA y/o EGF por un mecanismo que depende de ERK1/2, observando que la mutación de este residuo inhibe la actividad de Jak2 (Mazurkiewicz y cols., 2006). Por otra parte, se ha demostrado que, inhibidores de PKC (α/β) bloquean la activación de JAK-STAT en extractos de corazones de ratones con isquemia (Yuying y cols., 2005); además, la disminución de la expresión de PKC β o utilizando un inhibidor de PKC β (LY379196) bloquean la fosforilación de JAK2 inducida por AngII, en VSMC (Shaw y cols., 2003). En este sentido, de acuerdo a nuestros datos, proponemos que en las células 3T3-L1, las PKCs clásicas podrían participar en la activación de Jak2 y como consecuencia tener un efecto en la fosforilación en Tyr¹⁵² de PTP1B. Así, se propone un nuevo modelo de regulación de las acciones de insulina, por AngII que involucra a PKC clásicas/Jak2/PTP1B (**Figura 44**).

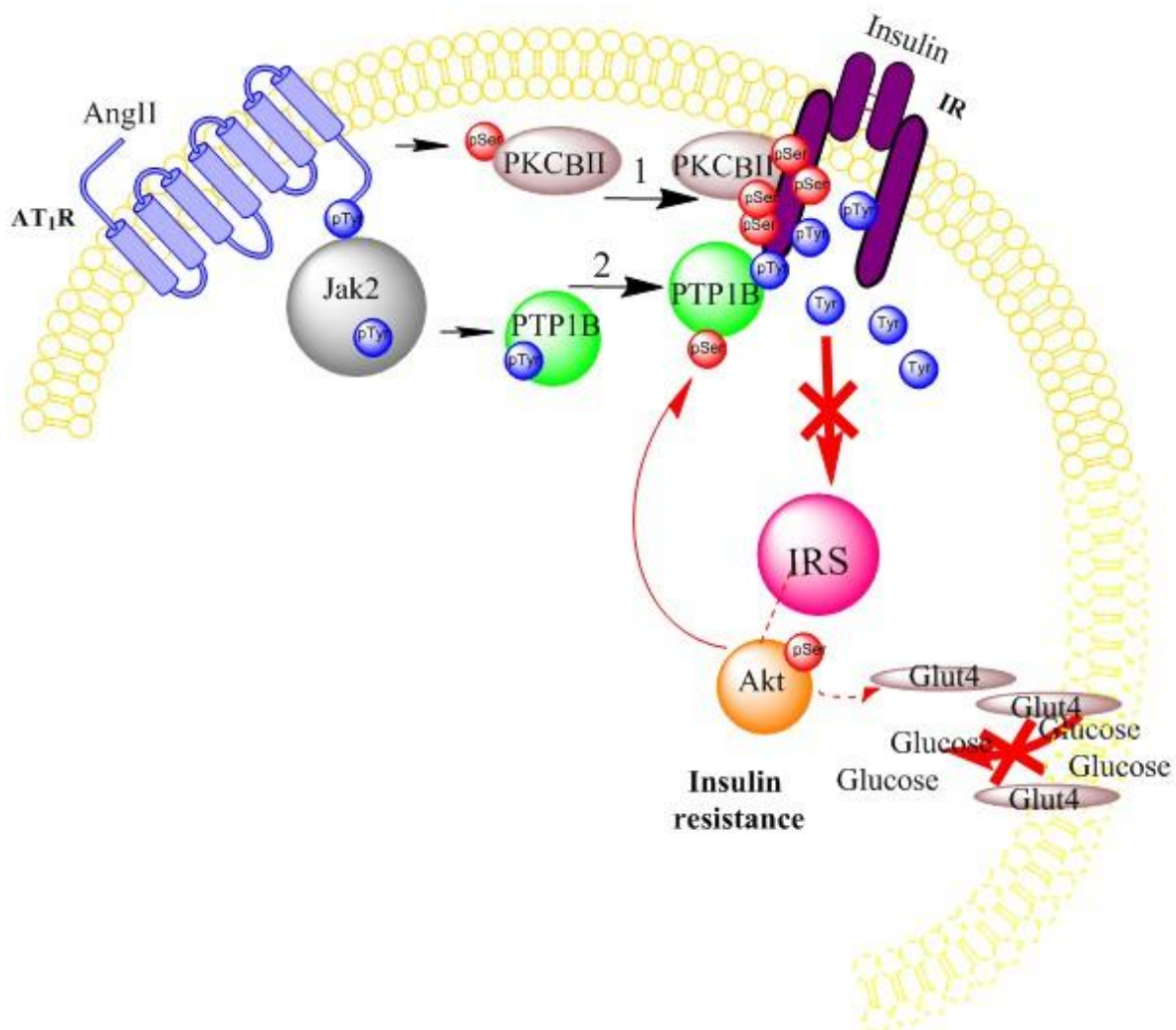


Figura 44. Modelo de conclusiones. En células 3T3-L1, AngII a través del AT₁R, activa a PKCβII que conduce a un incremento en las fosforilaciones en Ser del IR, así mismo, AngII activa a Jak2 y esta cinasa a su vez, activa a PTP1B que desfosforila en Tyr al IR, llevando a una disminución de la señalización de insulina y a una reducción de la incorporación de glucosa, conduciendo a resistencia a insulina.

En conclusión, aunque se requieren más estudios para precisar el mecanismo molecular de como AngII induce desensibilización y la resistencia a insulina, los resultados de este estudio sugieren fuertemente que la activación de los receptores AT₁ alteran la fosforilación en Tyr de IR estimulada por insulina, promueven la fosforilación en Ser de IR, alteran la fosforilación en Tyr del IRS, la fosforilación de Akt y la captación de glucosa, que puede conducir a resistencia a la insulina, mediante la activación de PKCβII /Jak2/ PTP1B en adipocitos 3T3-L1.

9. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la regulación que existe entre las proteínas PKC y Jak2 estimulada por AngII e insulina.
2. Evaluar el efecto de insulina más AngII en la fosforilación de Ser⁵⁰ y Tyr¹⁵² de PTP1B con los inhibidores de Akt y Jak2
3. Estudiar el efecto de siRNA de PTP1B en la incorporación de glucosa promovida por AngII más insulina.
4. Estudiar la actividad enzimática de PTP1B en adipocitos 3T3-L1 estimulados con AngII.
5. Estudiar la estimulación con insulina, seguida de AngII.
6. Analizar el efecto de AngII en cursos temporal y concentraciones respuesta en la cascada de señalización de insulina.
7. Evaluar el efecto de AngII en la señalización de insulina en cultivos primario de rata y ratón.

10. REFERENCIAS

- Achard V, Boullu S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M (2007). Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292:R274-82.
- Ahmad F, Azevedo J L, Cortright R, Dohm G L, and Goldstein B J (1997). Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest.* 1997 Jul 15; 100(2): 449–458.
- Ahmad F, Considine RV, Goldstein BJ (1995). Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *J Clin Invest.* 1995; 95(6):2806–12.
- Ahn J, Donner, D. B. and Rosen, O. M. (1993). Interaction of the human insulin receptor tyrosine kinase from the baculovirus expression system with protein kinase C in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 268, 7571 – 7576.
- Al-Hasani H, Eisermann B, Tennagels N, Magg C, Passlack W, Koenen M, Muller-Wieland D, Meyer HE & Klein HW (1997). Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Letters* 400 65–70.
- Ali MS, Schieffer B, Delafontaine P, Bernstein KE, Ling BN, Marrero MB (1997). Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 9;272(19):12373-9.
- Andreozzi Francesco, Laratta Emanuela, Sciacqua Angela, Perticone Francesco and Giorgio (2004). Angiotensin II Impairs the Insulin Signaling Pathway Promoting Production of Nitric Oxide by Inducing Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Ser 312 and Ser616 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circ Res.* 4; 94:1211-1218.
- Arellano-Plancarte A, Hernandez-Aranda J, Catt KJ, Olivares-Reyes JA (2010). Angiotensin-induced EGF receptor transactivation inhibits insulin signaling in C9 hepatic cells. *Biochem Pharmacol.* 5 (79) 733-45.
- Armstrong CG, Doherty MJ, Cohen PT (1998). Identification of the separate domains in the hepatic glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that interact with phosphorylase a, glycogen and protein phosphatase 1. *Biochem J.* 336(Pt 3):699–704.

- Avruch J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 182:31–48.
- Baba T, Drenckan M, Neugebauer S., Klein H. (1998). Effect of angiotensin II and bradykinin on insulin-syimulated tyrosine kinasa activity on insulin receptor. *Diabetología.* volume 41, Issue 6, pp 741-742.
- Bakke J y cols. (2013). Regulation of the SNARE-interacting protein Munc18c tyrosine phosphorylation in adipocytes by protein-tyrosine phosphatase 1B. *Cell Commun Signal.* 11(1):57.
- Bandyopadhyay Anindita, Elvitigala Thanura, Eric Welsh, Stöckela Jana, Liberton Michelle y cols.,(2011). Novel Metabolic Attributes of the Genus *Cyanothece*, Comprising a Group of Unicellular Nitrogen-Fixing Cyanobacteria. *MBio.* 2(5):e00214-11.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, Galloway L, Karnam P, Moscat J, Farese RV (1997). Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem.* 272(4):2551-8.
- Bernstein KE, Marrero MB (1996). The importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 6:179–187.
- Berti L, Mosthaf L, Kroder G, Kellerer M, Tippmer S, Mushack J, Seffer E, SeedorfK and Haring H (1994). Glucose-induced translocation of protein kinase C isoforms in rat-1 fibroblasts is paralleled by inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 269 3381–3386.
- Bettaieb A (2011). Differential regulation of endoplasmic reticulum stress by protein tyrosine phosphatase 1B and T cell protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 286(11):9225–35.
- Bettaieb A (2011). Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism.* 60(8):1193–201.
- Biddinger SB and Kahn CR (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol.* 68:123-58.
- Bollag Gideon E, Roth Richard A, Beaudoin Jacqueline, Mochly-Rosen Daria y E Koshland Daniel, J R (1986). Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity. *Biochemistry Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 83, pp. 5822-5824,

- Bossenmaier B, Mosthaf L, Mischak H, Ullrich A, Haring H U (1997). Protein kinase C isoforms b1 and b2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor B *Diabetologia*. 40: 863–866.
- Bossenmaier B, Strack V, Stoyanov B, Krutzfeldt J, Beck A, Lehmann R, Kellerer M, Klein H, Ullrich A, Lammers R and Haring H U (2000). Serine residues 1177/78/82 of the insulin receptor are required for substrate phosphorylation but not autophosphorylation. *Diabetes* 49, 889 – 895.
- Bowden D W, Sale M, Howard T D y cols., (1997). Linkage of genetic markers on human chromosomes 20 and 12 to NIDDM in Caucasian sib pairs with a history of diabetic nephropathy. *Diabetes* 46:882–6.
- Bento Jennifer L, Palmer Nicholette D, Josyf C. Mychaleckyj, Leslie A Lange, Carl D Langefeld, Stephen S. Rich, Barry I Freedman and Donald W. Bowden (2004). Association of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 53(11): 3007-3012.
- Braiman Liora, Alt Addy, Toshio Kuroki, Motoi Ohba, Asia Bak, Tamar Tennenbaum, Sanford R (2001). Sampson; Insulin Induces Specific Interaction between Insulin Receptor and Protein Kinase C δ in Primary Cultured Skeletal Muscle, *Molecular Endocrinology*, Volume 15, Issue 4, Pages 565–574.
- Brautigan D L., Pinault F M (1993). Serine phosphorylation of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) in HeLa cells in response to analogues of cAMP or diacylglycerol plus okadaic acid. *Mol. Cell. Biochem*. 127–128:121–129.
- Brendan D Manning and Lewis C Cantley (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129(7): 1261–1274.
- Calò Lorenzo A, Bordin Luciana, Davis Paul A, Pagnin Elisa y cols., (2011). PLC β 1-SHP-2 complex, PLC β 1 tyrosine dephosphorylation and SHP-2 phosphatase activity: a new part of Angiotensin II signaling? *J Biomed Sci*. 18(1): 38.
- Carsten Schmitz-Peiffer and Trevor J. Biden (2008). Protein Kinase C Function in Muscle, Liver, and β Cells and Its Therapeutic Implications for Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 57(7): 1774–1783.
- Carvalho J, Ribeiro E P, Araújo R B, Guimarães M M, Telles M, Torsoni J A R, Gontijo L A, Velloso M J (2003). Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia*. Volume 46, Issue 12, pp 1629–1640.

- Casal Andres J, Ryser Stephane, Capponi Alessandro M y Wang-Buholzer Carine F (2007). Angiotensin II-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Expression in Bovine Adrenal Glomerulosa Cells: Implications in Mineralocorticoid Biosynthesis. *Endocrinology* 148(11):5573–5581.
- Cassis Lisa A, Sara B Police, Frederique Yiannikouris and Sean E Thatcher (2008). Local Adipose Tissue Renin-Angiotensin System, *Curr Hypertens Rep.* 10(2): 93–98.
- Charbonneau H, Tonks N K, Kumar S, Diltz C D, Harrylock M, Cool D E, Krebs E G, Fischer E H , Walsh K A (1989). Human placenta protein tyrosine phosphatase: Amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5252–5256.
- Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML (2002). Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell.* 2(4):497-503.
- Chin J E, Dickens,M, Tavare J M and Roth R A (1993). Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I, gamma, and epsilon in cells overexpressing the insulin receptor. Effects on receptor phosphorylation and signaling. *J. Biol. Chem.* 268, 6338 – 6347.
- Chiarreotto-Ropelle EC, Pauli LS, Katashima CK, Pimentel GD, Picardi PK, Silva VR, de Souza CT, Prada PO, Cintra DE, Carnevalheira JB, Ropelle ER, Pauli JR (2013). Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 305(5):E649-59.
- Coba Marcelo P, Muñoz Marina C, Dominici Fernando P, Toblli Jorge E, Peña Clara, Bartke A y Turyn D (2004). Increased in vivo phosphorylation of insulin receptor at serine 994 in the liver of obese insulin-resistant Zucker rats. *Journal of Endocrinology* 182, 433–444.
- Coghlan MP, Pillay TS, Tavaré JM & Siddle K (1994). Site-specific anti-phosphopeptide antibodies: use in assessing insulin receptor serine/threonine phosphorylation state and identification of serine-1327 as a novel site of phorbol ester-induced phosphorylation. *Biochemical Journal.* 303 893–899.
- Collaku A, Rankinen T, Rice T, y cols. (2004). A genome-wide linkage scan for dietary energy and nutrient intakes: the Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics (HERITAGE) Family Study. *Am J Clin Nutr* 79:881–6.
- Copps KD, White MF (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 55(10):2565-2582.

- Cortright, R. N., Azevedo, J. L., Jr., Zhou, Q., Sinha, M., Pories, W. J., Itani, S. I. and Dohm, G. L. (2000). Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E553-E562
- Davis S.N, Granner D K (1996). Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. L.S. Goodman, A.G. Gilman (Eds.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (6th ed.), McMillan, New York.
- De Luca C1, Olefsky JM (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582(1):97-105. .
- Delibegovic Mirela, Zimmer Derek, Kauffman Caitlin, Rak Kimberly, Hong Eun-Gyoung, y cols., (2009). Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Improves Metabolic Syndrome and Attenuates Diet-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *Diabetes.* Mar; 58(3): 590–599.
- Dong C, Wang S, Li WD, y cols. (2003). Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. *Am J Hum Genet* 72:115–24.
- Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, Olefsky JM (2004). Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 24(19):8778-89.
- Egawa K y cols., (2001). Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in I6 myocytes and Fao hepatoma cells. *J Biol Chem.* 276(13):10207–11.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy A L, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan C C, Ramachandran C, Gresser M J, Tremblay M L and Kennedy B P (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544 – 1548.
- Engeli S, Negrel R, Sharma A M.(2000). Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin– angiotensin system. *Hypertension;* 35, 1270– 1277.
- Engelman J A y Settleman J (2008). Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 73–79.1016.
- England K and Rumsby Martin G (2000). Changes in protein kinase C ϵ phosphorylation status and intracellular localization as 3T3 and 3T6 fibroblasts grow to confluency and quiescence: a role for phosphorylation at Ser-729? *Biochem. J.* 352, 19–26.
- Dekker LV, Parker PJ (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* 1 Feb; 19(2):73-7.

- Dorit Ron and Kazanietz Marcelo G (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors, Vol. 13, No. 13.
- Dubois MJ, Bergeron S, Kim HJ, Dombrowski L, Perreault M, Fournès B, Faure R, Olivier M, Beauchemin N, Shulman GI, Siminovitch KA, Kim JK, Marette A (2006). The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat Med.*;12(5):549-56.
- Faucherre A, Taylor GS, Overvoorde J, Dixon JE, Hertog J (2008). Zebrafish PTEN genes have overlapping and non-redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Oncogene* 27: 1079–1086.
- Fawaz G Haj, Peter J Verveer, Anthony Squire, Benjamin G Neel, Philippe I H Bastiaens (2002). Imaging Sites of Receptor Dephosphorylation by PTP1B on the Surface of the Endoplasmic Reticulum. *Science* : Vol. 295, Issue 5560, pp. 1708-1711.
- Feener EP, Backer JM, King GL, Wilden PA, Sun XJ, Kahn CR & White MF (1993). Insulin stimulates serine and tyrosine phosphorylation in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 268 11256–11264.
- Feldhammer Matthew, Uetani Noriko, Miranda-Saavedra Diego, y Tremblay Michel L (2013). PTP1B: A simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 48(5): 430–445.
- Ferrario CM1, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant EA (1991). Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension*. Nov; 18(5 Suppl):III126-33.
- Fiset A. y cols (2011). Compartmentalized CDK2 is connected with SHP-1 and beta-catenin and regulates insulin internalization. *Cell Signal*.23(5):911–9.
- Flint AJ, Gebbink MF, Franza B R Jr, Hill D E and Tonks N K (1993). Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J.*, 12, 1937–1946.
- Folli Franco, Kahn Ronald C, Hans Hansen, Julie L Bouchie and Edward P Feenev (1997). Angiotensin II Inhibits Insulin Signaling in Aortic Smooth Muscle Cells at Multiple Levels A Potential Role for Serine Phosphorylation in nsulin/Angiotensin II Crosstalk Volume 100, Number 9, 2158–2169.
- Forsell PA, Boie Y, Montalibet J, Collins S, Kennedy BP (2000). Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene* 260:145–153.

- Frangioni JV y cols., (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell*. 68(3):545–60.
- Galic S, Hauser C, Kahn BB, Fawaz G. (2005). PTP1B and TCPTP by the Protein Tyrosine Phosphatases Coordinated Regulation of Insulin Signaling. *Mol. Cell. Biol.* 25(2):819.
- Gao T, Furnari F, Newton AC (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*. 18(1):13–24.
- García-Caballero A, Olivares-Reyes JA, Catt KJ, and García-Sáinz JA (2001). Angiotensin AT1 receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* 59: 576-585.
- García-Sáinz JA, García-Caballero A, and González-Espinosa C (1998). Angiotensin AT1 receptors in clone 9 rat liver cells: Ca²⁺ signaling and c-fos expression. *Eur J Pharmacol* 362: 235-243.
- Goldstein BJ y cols., (2000). Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem*. 275(6):4283–9.
- Gonzalez-Rodriguez A y cols. (2012) Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell*. 2012; 11(2):284–96.
- Greene Michael W, Burringtonc Christine M, Luo Yuwen, Ruhoff Mary S, Darin T Lynchc, Niyutchai Chaithongdid (2014). PKC δ is activated in the liver of obese Zucker rats and mediates diet-induced whole body insulin resistance and hepatocyte cellular insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (2014) 281–288.
- Gutiérrez Rodelo Citlaly (2013). *Mecanismos moleculares involucrados en las acciones de insulina por la AngII en células adiposas*. Tesis de muestra inédita. Centro de investigación y de estudios avanzados de Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. Departamento de Bioquímica.
- Gutiérrez -Rodelo C, Roura-Guiberna A and Olivares-Reyes JA (2017). *Gac Med Mex.*; 153:197-209.

- Hachiya H L, Takayama S, White M F, King G L (1987). Regulation of insulin receptor internalization in vascular endothelial cells by insulin and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 262, 6417..
- Hadi HA, Suwaidi JA (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag.* 3: 853–876.
- Haj FG, Verveer PJ, Squire A (2002). Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science.* 295:1708–1711.
- Häring H, Kirsch D, Obermaier B, Ermel B, Machicao F (1986). Decreased tyrosine kinase activity of insulin receptor isolated from rat adipocytes rendered insulin-resistant by catecholamine treatment in vitro. *Biochem J.* 234(1):59–66.
- Harig, H.U (1991). The insulin receptor: signalling mechanism and contribution to the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia*, 34, 848-861.
- Hasani Al, Eisermann, H., Tennagels B., Magg N., y cols. (1997). Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor. *FEBS Lett.* 400, 65 – 70.
- Hashimoto N y cols (1992). Insulin receptor protein-tyrosine phosphatases. Leukocyte common antigen-related phosphatase rapidly deactivates the insulin receptor kinase by preferential dephosphorylation of the receptor regulatory domain. *J Biol Chem.* 267(20):13811.
- Hayashi K y cols (2004). Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 279(39):40807–18.
- He Z y cols., (2013). Nonreceptor tyrosine phosphatase SHP2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(1):E79–88.
- Hubbard S R (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *The EMBO Journal*, 16, 5572–5581.
- Hubbard S R (2013). The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008946.
- Hulver, M. W. and Dohm, G. L. (2004). The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 375 – 380.

- Hutchins A. P. y cols (2013). Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions. *Nucleic acids research* 41, 2155–2170.
- Ikeda Takahide, Kajita Kazuo, Zhiliang Wu, Hanamoto Takayuki y cols., (2009). Effects of Phorbol Ester-Sensitive PKC (c/nPKC) Activation on the Production of Adiponectin in 3T3-L1 Adipocytes *IUBMB Research Communication Life*, 61(6): 644–650.
- Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T (1999). Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10 Suppl 11:S57-61.
- Inoue M, Kishimoto, A, Takai Y and Nishizuka, Y (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* 252, 7610-6.
- Ishizuka T, Hoffman J, Cooper DR, Watson JE, Pushkin DB, and Farese RV (1989). Glucose-induced synthesis of diacylglycerol de novo is associated with translocation (activation) of protein kinase C in rat adipocytes. *FEBS Lett* 249:234 –238, 1989.
- Itani S I, Zhou Q, Pories W J, MacDonald K G and Dohm G L (2000). Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 49, 1353 – 1358.
- Jaken S and Parker PJ (2000). Protein kinase C binding partners. *Bioessays*, 22(3):245-54.
- Jérémie Boucher, André Kleinridders and C Ronald Kahn (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a009191.
- Johannes C L, Reusch H Peter, Albrecht Nadine, Schultz Günter, and Schaefer Michael (2002). Ca²⁺-controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. *The Journal of Cell Biology*, Volume 159, Number 2, 291–301.
- Jia Z, Barford D, Flint AJ, Tonks NK (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*. 268(5218):1754-8.
- Jiangchuan T, Craig C. Malbon, and Hsien-yu Wang (2001). Insulin Stimulates Tyrosine Phosphorylation and Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo. Vol. 276, No. 31, Issue of August 3, pp. 29520–29525.
- Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*. 286:309–312.

- Juan C C, Chien Y, Wu LY, Yang WM, Chang CL, Lai YH, Ho PH, Kwok CF, Ho LT (2005). Angiotensin II Enhances Insulin Sensitivity in Vitro and in Vivo. *Endocrinology*. 146(5):2246-54.
- Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N (2012). The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes Rev*. 13(2):136-49.
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T. (1993). Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 24543-24546.
- Kalupahana N.S., Massiera F., Quignard-Boulangé A., Ailhaud G., Veyre B.H, et al (2012). Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity*, 20 (1), pp. 48-56.
- Kalyankar Mahadev, Assaf Zilbering, Li Zhu and Barry J. Goldstein (2001). Insulin-stimulated Hydrogen Peroxide Reversibly Inhibits Protein-tyrosine Phosphatase 1B in Vivo and Enhances the Early Insulin Action Cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 21938-21942.
- Keidar S, Kaplan M and Gamliel-Lazarovich A (2007). ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Res*. 73(3):463-9.
- Keranen Lisa M, Dutil Erica M., Newton Alexandra C (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. Volume 5, Issue 12, Pages 1394-1403.
- Ketsawatsomkron Pimonrat, W Stepp David, J Fulton David, and Marrero Mario B (2010). Molecular Mechanism of Angiotensin II-induced Insulin Resistance in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: Roles of Protein Tyrosine Phosphatase-1B. *Vascul Pharmacol*. 53(0): 160–168.
- Kipfer-Coudreau S, Eberlé D, Sahbatou M, et al., (2004). Single nucleotide polymorphisms of protein tyrosine phosphatase 1B gene are associated with obesity in morbidly obese French subjects. *Diabetologia*. 47:1278–1284.
- Kim JA, Montagnani M., Koh KK, Quon MJ (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006; 113: 1888–1904.

- Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U & Nishizuka Y (1980). Activation of calcium and phospholipiddependentprotein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 255, 2273-6.
- Koshio O, Akanuma Y and Kasuga M (1989). Identification of a phosphorylation site of the rat insulin receptor catalyzed by protein kinase C in an intact cell. *FEBS Lett.* 254(1-2):22-4.
- Kovanen PE, Junttila I, Takaluoma K, Saharinen P, Valmu L, Li W, Silvennoinen O (2000). Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood.* 95:1626-1632).
- Jacob Kirsten K, Jonathan Whittaker, Frederick M Stanley (2002). Insulin receptor tyrosine kinase activity and phosphorylation of tyrosines 1162 and 1163 are required for insulin-increased prolactin gene expression *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 186, Issue 1, Pages 7–16.
- Krishnan N, Krishnan K, Connors CR, Choy MS, Page R, Peti W, Van Aelst L, Shea SD, Tonks NK (2015). PTP1B inhibition suggests a therapeutic strategy for Rett syndrome. *J Clin Invest.* 125(8):3163-77.
- Kuhne MR y cols (1994). Dephosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the tyrosine phosphatase PTP2C. *J Biol Chem.* 269(22):15833–7.
- Lago F, Lekuona I, González JR (2011). The Intracellular Renin-Angiotensin System: The Role of Direct Renin Inhibition. Volume 11, Supplement 4, Pages 13-17.
- Lazar DF, Saltiel AR (2006). Lipid phosphatases as drug discovery targets for type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 5(4):333–42.
- Letiges Michael, Plomann Markus, Standaert Mary L., andyopadhyayGautam B y cols. (2002). Knockout of PKC α Enhances Insulin Signaling Through PI3K *Molecular Endocrinology* 16: 847–858.
- Lee K, Esselman WJ (2002). Inhibition of PTPS by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 33(8):1121-32.
- Lee JP, Cho H, Bannwarth W, Kitas EA and Walsh CT (1992). NMR analysis of regioselectivity in dephosphorylation of a triphosphotyrosyl dodecapeptide autophosphorylation site of the insulin receptor by a catalytic fragment of LAR phosphotyrosine phosphatase. *Protein Sci.* 1, 1353–1362.

- Lewis RE, Wu GP, MacDonald RG & Czech MP (1990a). Insulin-sensitive phosphorylation of serine 1293/1294 on the human insulin receptor by a tightly associated serine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 265 947–954.
- Li M, Youngren, J F, Dunaif A, Goldfine I D., Maddux B A, Zhang B B and Evans J L (2002). Decreased insulin receptor (IR) autophosphorylation in fibroblasts from patients with PCOS: effects of serine kinase inhibitors and IR activators. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 4088 – 4093.
- Liu F y Chernoff J (1997). Transformation Suppression by Protein Tyrosine Phosphatase 1B Requires a Functional SH3 Ligand. *Biochem J.* 327:139–145.
- Liu F & Roth RA (1994a). Identification of serines-967/968 in the juxtamembrane region of the insulin receptor as insulin-stimulated phosphorylation sites. *Biochemical Journal* 298 471–477.
- Liu F & Roth RA (1994b). Identification of serines-1035/1037 in the kinase domain of the insulin receptor as protein kinase C alpha mediated phosphorylation sites. *FEBS Letters* 352 389–392.
- Liu Yan-Fang y cols. *Mol Cell Biol.* (2004). Serine Phosphorylation Proximal to Its Phosphotyrosine Binding Domain Inhibits Insulin Receptor Substrate 1 Function and Promotes Insulin Resistance, 24(21): 9668–9681.
- Liu C, Lv X H, Li H X, Cao X, Zhang F, Wang L, Yu M and Yang J K (2012). Angiotensin-(1–7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol.* 49, 291–299.
- Loh K y cols., (2011). Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab.* 14(5):684–99.
- Klaman Lori D. y cols., (2000). Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Mol Cell Biol.* 20(15):5479-89.
- Maegawa H y cols., (1996). SHPTP2 serves adapter protein linking between Janus kinase 2 and insulin receptor substrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 228(1):122–7.
- Maeno Yasuhiro, Li Qian, Park Kyoungmin, Rask-Madsen Christian, Benbo Gao, Matsumoto Motonobu y cols., (2012). Inhibition of Insulin Signaling in Endothelial Cells by Protein Kinase C-induced Phosphorylation of p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* vol. 287, no. 7, pp. 4518–4530.

- Mallow H, Trindl A, Loffler G. (2000). Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res*, 32(11-12):500-503.
- Manucha W., Ritchie B., Ferder L (2014). Hypertension and insulin resistance: implications of mitochondrial dysfunction. *Curr. Hypertens. Rep.*, 17 (1) pp. 1-7.
- Mao J, Yang T, Gu Z, Heird WC, Finegold MJ, y cols., (2009). AP2-cre-mediated inactivation of acetyl-CoA carboxylase 1 causes growth retardation and reduced lipid accumulation in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17576–17581.
- Markou Thomais, Chee Shin Yong, Sugden H Peter and Clerk A (2006). Regulation of Protein Kinase C δ by Phorbol Ester, Endothelin-1, and Platelet-derived Growth Factor in Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 8321-8331.
- Marrero Mario B, Venema Virginia J, Ju Hong, Eaton Douglas C, Venema Richard C (1998). Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Vol. 275 no. 5.
- Marrero MB, Banes AK, Tawfik A, Shaw S (2003). Effects on the angiotensin II-induced insulin resistance in blood vessels. *American Heart Association, Research Symposium, 76th Scientific Sessions*.
- Marrero Mario B, Fulton David, Stepp David and Stern David M (2004). Angiotensin II Induced Insulin Resistance and Protein Tyrosine Phosphatases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:2009-2013.
- Masatoshi T, Hideki K, Tomoichiro A, Tetsuya Y, Shigeo O, Ogihara T y Yoshitomo Oka (2002). Role of PKC isoforms in glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E338–E345.
- Matsuo K y cols.,(2010). Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J Biol Chem*. 285(51):39750–8.
- Matsuo K, Bettaie A, Nagata N, Matsuo I, Keilhack H, Haj FG (2011). Regulation of brown fat adipogenesis by protein tyrosine phosphatase 1B. *PLoS One*. 31;6(1):e16446.
- Mazurkiewicz M A M, Argetsinger L S, Kouadio K J L, Stensballe A, Jensen O N., Cline J M and Carter-Su C (2006). Phosphorylation of JAK2 at Serine 523: a Negative Regulator of JAK2 That Is Stimulated by Growth Hormone and Epidermal Growth Factor, *Mol Cell Biol*. 26(11): 4052–4062.
- Mistafa O y cols., (2010). Purinergic receptor-mediated rapid depletion of nuclear phosphorylated Akt depends on pleckstrin homology domain leucine-rich repeat

- phosphatase, calcineurin, protein phosphatase 2A, and PTEN phosphatases. *J Biol Chem.* 285(36):27900–10.
- Mosior M & Newton A C (1995). Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association. *J Biol Chem* 270, 25526-33.
- Mosior M & Newton A C (1996). Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry.* 35, 1612-23.
- Moorhead GB, Trinkle-Mulcahy L, Ulke-Lemée A (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar; 8(3):234-44.
- [Muñoz MC](#), [Argentino DP](#), [Dominici FP](#), [Turyn D](#), [Toblli JE](#) (2006). Irbesartan restores the in-vivo insulin signaling pathway leading to Akt activation in obese Zucker rats. *J Hypertens.* Aug;24(8):1607-1
- Mussig K y cols. (2005). Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem.* 280(38):32693–9.
- Najjar S. (2001). Insulin Action: “*Molecular Basis of Diabetes*”*Encyclopedia of Life Sciences (John Wiley & Sons) 0001402.* ISBN 0470016175.
- Ogihara T, Asano T, Ando K y cols., (2002) Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signalling. *Hypertension* 40:872–879.
- Nemoto S, Matsumoto, Taguchi K, Kobayashi (2014). Relationships among protein tyrosine phosphatase 1B, angiotensin II, and insulin-mediated aortic responses in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Atherosclerosis.* 233(1):64-71.
- Newton A C (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270, 28495-8.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607–614.
- Norris K y cols., (1997). Expression of protein-tyrosine phosphatases in the major insulin target tissues. *FEBS Lett.* 415(3):243–8.
- Oh Y B, Kim J H, Park B M, Park B H and Kim S H (2012). Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). *Peptides* 37, 79–85.

- Olivares-Reyes JA y Arellano-Plancarte A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 1 (27): 9-18.
- Olivares Reyes JA (2012). Obesidad en la edad pediátrica prevención y tratamiento, cap10 (185-214).
- Ogg S, Ruvkun G (1998). The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell*. 2(6):887–93.
- Owen Carl, Czopek Alicja, Agouni Abdelali, Grant Louise, y cols., (2012). Adipocyte-Specific Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deletion Increases Lipogenesis, Adipocyte Cell Size and Is a Minor Regulator of Glucose Homeostasis. *PLOS ONE* 7(5): 10.1371.
- Park Kyoungmin, a Qian Li, a Christian Rask-Madsen, Akira Mima, Koji Mizutani, Jonathon Winnay, Yasutaka Maeda, Katharine D'Aquino, Morris F. White, Edward P. Feener, a George L. Kinga (2013). Serine Phosphorylation Sites on IRS2 Activated by Angiotensin II and Protein Kinase C to Induce Selective Insulin Resistance in Endothelial Cells. *Molecular and Cellular Biology* p. 3227–3241.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 272(47):29911–29918.
- Petersen Max C., Madiraju Anila K., Gassaway Brandon M., y cols., (2016). Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 126(11):4361–4371.
- Pierre De Meyts. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
- Pillay Tahir S., Xiao Sen, Lisa Keranen, Jerrold M. Olefsky. (2004) Regulation of the insulin receptor by protein kinase C isoenzymes: preferential interaction with β isoenzymes and interaction with the catalytic domain of β II Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, University of California-San Diego, 9500 Gilman Drive. *Cellular Signalling* 16; 97 – 104.
- Posner BI (2003). Regulation of insulin receptor kinase activity by endosomal processes: possible areas for therapeutic intervention. *Curr Opin Investig Drugs*; 4 (4): 430-4.
- Poole AW, Jones ML (2005). A SHPping tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal*. 17(11):1323–32.

- Rajshankar D y cols (2013). Role of PTPalpha in the destruction of periodontal connective tissues. *PLoS One*. 8(8):e70659.
- Ramalingam L y cols., (2017). The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance, *Biochim. Biophys Acta*. 1863(5):1106-1114.
- Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ. (2001). Phosphorylation of PTP1B at Ser (50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol* 15:1768–80.
- Reaven G. (2004). The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2 (33): 283-303.
- Rocchi S y cols. (1996). Interaction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor: studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology*. 137(11):4944–52..
- Romsicki Y, Reece M, Gauthier JY, Asante-Appiah E, Kennedy BP (2004). Protein tyrosine phosphatase-1B dephosphorylation of the insulin receptor occurs in a perinuclear endosome compartment in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*. 26; 279(13):12868-75
- Rocchi S y cols., (1996). Interaction of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor: studies of the domains involved using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology*. 137(11):4944–52.
- RondinoneCristina M., TrevillyanJames M., ClampitJill y cols. (2002). Protein Tyrosine Phosphatase 1B Reduction Regulates Adiposity and Expression of Genes Involved in Lipogenesis. *Diabetes*; 51(8): 2405-2411.
- Sale E. M., Sale G. J. (2008). Protein kinase B: signaling roles and therapeutic targeting. *Cell. Mol. Life Sci*. 65:113–127.
- Santos R A, Ferreira A J, Verano-Braga T and Bader M (2013) Angiotensin- converting enzyme 2, Angiotensin-(1–7) and Mas. New players of the renin angiotensin system. *J. Endocrinol*. 216, R1–R17.
- Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM (2015). Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS ONE*. 10(8): e0134601.

- Salmeen A Andersen, J N Myers, M P Tonks, N K & Barford D (2000). Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Molecular Cell*, 6, 1401–1412.
- Saltiel A R y C R Kahn (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414 (6865):799-806.
- Saltiel, A.R. y Pessin, J.E. (2003) Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic*. 4, 711–716.
- Schievella A R, Paige L A, Johnson K A, Hill D E, Erikson R L (1993), Protein tyrosine phosphatase 1B undergoes mitosis-specific phosphorylation on serine. *Cell Growth Differ*. 4:239–246.
- Schmitz-Peiffer C (2002). Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 146 – 157.
- Seely BL1, Staubs PA, Reichart DR, Berhanu P, Milarski KL, Saltiel AR, Kusari J, Olefsky JM (1996). Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*. 45(10):1379-85.
- Shah BH and Catt KJ (2002). Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein kinase C δ , Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth receptor trans-activation. *Mol Pharmacol* 61: 343-351.
- Shao J, Catalano P M, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J and Friedman J E (2000). Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. *Diabetes* 49, 603 – 610.
- Shaw S, Xiaodan Wang, Heather Redd, Gwendolyn D. Alexander, Carlos M. Isales y Mario B. Marrero (2003). High Glucose Augments the Angiotensin II-induced Activation of JAK2 in Vascular Smooth Muscle Cells via the Polyol Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 30634-30641.
- Shrikrishna Dadke y cols., (2000). Down-regulation of Insulin Signaling by Protein-tyrosine Phosphatase 1B is Mediated by an N-terminal Binding Region*J. *Biol. Chem.* 275:23642-23647.

- Shiqing Li, Rafael S. Depetris, David Barford, Jonathan Chernoff, and Stevan R. Hubbard (2005). Crystal Structure of a Complex between Protein Tyrosine Phosphatase 1B and the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. *Structure*, Vol. 13, 1643–1651.
- Shifrin V I, Davis R J, Neel B G (1997). Phosphorylation of Protein-tyrosine Phosphatase PTP-1B on Identical Sites Suggests Activation of a Common Signaling Pathway during Mitosis and Stress Response in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 272:2957–2962.
- Shifrin S Victor I and Neel Benjamin G (1993). Growth Factor-inducible Alternative Splicing of Nontransmembrane Phosphotyrosine Phosphatase PTP-1B Pre-mRNA. *The journal of biological chemistry*. Vol. 268, No. 34, Issue of December 5, pp. 25376-25384.
- Sigal Y J, McDermott MI, Morris AJ (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J.* 387(Pt 2):281–93.
- Siri Fagerholm, Unn Örtengren, Margareta Karlsson, Iida Ruishalme, Peter Strålfors (2009). Rapid Insulin-Dependent Endocytosis of the Insulin Receptor by Caveolae in Primary Adipocytes. *PLoS ONE* 4(6): e5985.
- Sjostrand M and Eriksson JW (2009). Neuroendocrine mechanisms in insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1-2 (297): 104-11.
- Song D D y cols., (2013). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibits adipocyte differentiation and mediates TNFalpha action in obesity. *Biochim Biophys Acta.* 1831(8):1368–76.
- Standaert M L, Bandyopadhyay G, Zhou XP, Galloway L, Farese RV (1996). Insulin stimulates phospholipase D-dependent phosphatidylcholine hydrolysis, Rho translocation, de novo phospholipid synthesis, and diacylglycerol diacylglycerol/ protein kinase C signaling in L6 myotubes. *Endocrinology* 137:3014–3020.
- Strack V, Hennige A. M, Krutzfeldt J., Bossenmaier B, Klein H H, Kellerer M, Lammers R and Haring H U (2000). Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms beta2 and theta. *Diabetologia* 43, 443 – 449.
- Stadtmauer L, Rosen OM (1986). Increasing the cAMP content of IM-9 cells alters the phosphorylation state and protein kinase activity of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 261(7):3402-7.
- Sun XJ and Liu F (2009). Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitam Horm.* 80: 351-87.

- Sykiotis GP and Papavassiliou AG (2001). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol Endocrinol*; 11 (15): 1864-69.
- Tagami S y cols., (2002). Troglitazone ameliorates abnormal activity of protein tyrosine phosphatase in adipose tissues of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Tohoku. J Exp Med.* 197(3):169–81.
- Takayama S, White MF, Lauris V, Kahn CR (1984). Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(24):7797-801.
- Takayama S, White M F., and Kahn C. Ronald (1988). Phorbol Ester-induced Serine Phosphorylation of the Insulin Receptor Decreases Its Tyrosine Kinase Activity. *The journal of biological chemistry.* Vol. 263, No. 7, Issue of March 5, pp. 3440-3447.
- Than A, Leow MK, Chen P (2013). Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 31; 288(22):15520-31.
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Isola J, Kuerkasjavi T, Collins C, Kowbel D, Guan XY, Trent J, Gray JW, Meltzer P and Kallioniemi OP (1996). *Cancer Res.*, 56, 3441 ± 3445.
- Tao J, Malbon CC, Wang HY (2001). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. *J Biol Chem.* 276(31):29520-5.
- Thatcher S, Yiannikouris F, Gupte M, Cassis L (2009): The adipose renin-angiotensin system: Role in cardiovascular disease. *Molecular and cellular endocrinology*, 302(2):111-117.
- Tiganis T (2013). PTP1B and TCPTP—nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis. *FEBS J.* 280(2):445-58.
- Tiantian Jin, HaiboYu & Xu-Feng Huang (2016). Selective binding modes and allosteric inhibitory effects of lupane triterpenes on protein tyrosine phosphatase 1B. *Scientific Reports* 6:20766.
- Tonks NK. (2003). PTP1B: from the sidelines to the front lines!. *FEBS Letters.* 3;546(1):140-8.
- Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL (2003). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30:860 – 866.

- Turban Sophie, Hajduch Eric. (2011). Protein kinase C isoforms: Mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Letters* 585; 269–274.
- Tsou RC, Bence KK (2012). Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci.* 6:192.
- Ullrich A, Bell JR, Chen, EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grundfeld C, Rosen OM & Ramachandran J (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313 756–761.
- Valverde Ángela M. y González-Rodríguez Águeda (2011). IRS2 and PTP1B: Two opposite modulators of hepatic insulin signaling, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 117(3): 105–115.
- Velloso L. A., Folli Franco, Perego Lucia, Saad Mario J (2006). A multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev*; 22: 98–10.
- Venable CL, Frevert EU, Kim YB y cols., (2000). Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *The Journal of Biological Chemistry*; 275(24):18318–18326
- Wada T y cols., (1999). Role of the Src homology 2 (SH2) domains and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology*.140(10):4585–94.
- Walchli S y cols., (2000). Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on “substrate-trapping” mutants. *J Biol Chem.* 275(13):9792–6.
- Walsh D.A. and Van P.S. (1994). Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *Faseb J.*, 8 1227-1236.
- Walchli S y cols., (2000). Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on “substrate-trapping” mutants. *J Biol Chem.* 275(13):9792–6.
- Wang ZV, Deng Y, Wang QA, Sun K, Scherer PE (2010). Identification and characterization of a promoter cassette conferring adipocyte-specific gene expression. *Endocrinology* 151: 2933–2939.

- White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR (1988). A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 263(6):2969-80.
- Wu CH, Mohammadmoradi S, Thompson J, Su W, Gong M, Nguyen G, Yiannikouris F (2016). Adipocyte (Pro) Renin-Receptor Deficiency Induces Lipodystrophy, Liver Steatosis and Increases Blood Pressure in Male Mice. *Hypertension.* 68(1):213-9
- Xie L, Zhang Y L & Zhang Z Y (2002). Design and characterization of an improved protein tyrosine phosphatase substrate-trapping mutant. *Biochemistry*, 41, 4032–4039.
- Xu D, Rovira II, Finkel T (2002). Oxidants painting the cysteine chapel. Redox regulation of PTPs. *Dev. Cell.* 2: 251–2.
- Xu D, Qu CK (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci.*13:4925–32.
- Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M I y cols., (1999). Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension*, 33 (1 Pt 2) pp. 335-339.
- Yip Shu-Chin, Saha Sayanti, Chernoff Jonathan (2010). PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. Review article Pages 442-449. *Trends in Biochemical Sciences* Volume 35, Issue 8.
- Youngren J F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 7(64): 873-91.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med.* 342(3):145-53.
- Yuying C. Hwang, Sean Shaw, Michiyo Kaneko, Heather Redd, Mario B. Marrero, and Ravichandran Ramasamy (2005). Aldose reductase pathway mediates JAK-STAT signaling: a novel axis in myocardial ischemic injury. *FJ Express Summaries*, Vol. 19, No. 7. _____
- Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Annual Biochem.* 425(1):88-90.
- Zhang ZY, Thieme-Sefler AM, Maclean D, McNamara DJ, Dobrusin EM, Sawyer TK, Dixon JE (1993). Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90(10):4446-50.

Zhou Q, Dolan P L and Dohm G L (1999). Dephosphorylation increases insulin-stimulated receptor kinase activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Mol. Cell. Biochem.* 194, 209 – 216.

Zick Y (2001). Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 11(11):437–441.