



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

## FACULTAD DE CIENCIAS

LOS HEPATOCITOS LIBERAN AL MEDIO UNA PROTEINA  
QUE ES RECONOCIDA POR UN ANTICUERPO DIRIGIDO  
CONTRA LA SUBUNIDAD ALFA DEL RECEPTOR DE  
INSULINA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**MORENA AVITIA CAO ROMERO**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA



MEXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1. La insulina y sus funciones.....	2
1.1 Acción de la insulina en el metabolismo.....	2
2. El receptor de insulina.....	6
2.1 Unión entre el ligando y el receptor.....	9
2.2 La activación del receptor de insulina: la vía de señalización de la insulina.....	12
2.2.1 Vía de la PI-3K.....	12
2.2.2 Vía de la Grb2.....	14
3. La resistencia a la insulina.....	16
3.1 Alteraciones a nivel del receptor.....	17
3.1.1 Mutaciones del receptor.....	17
3.1.2 Isoformas del receptor.....	17
3.1.3 Formación de receptores híbridos.....	19
3.2 Alteraciones a nivel de la vía de señalización.....	20
3.2.1 Sustratos del receptor de insulina (IRS).....	20
3.2.2 PKB.....	21
3.2.3 Sintetasa de glucógeno; PEPCK y G6Pasa.....	22
3.3 Obesidad y resistencia a la insulina.....	23
3.3.1 Función endocrina del tejido adiposo.....	25
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>HIÓTESIS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
Objetivos específicos.....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
Diferenciación de células 3T3-L1.....	32
Cultivo y tratamiento de adipocitos 3T3-L1.....	33
Inmunocitoquímica de adipocitos 3T3-L1.....	34
Cultivo y tratamiento de hepatocitos de rata.....	35
Electroforesis e inmunotransferencia tipo Western blot.....	38

Cuantificación de bandas del receptor de insulina en la inmunotransferencia (Western blot).....	39
Análisis estadístico.....	40
Diseño experimental.....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
1. Detección de proteínas que se unen a la insulina en el medio de cultivo de hepatocitos.....	42
2. Células 3T3-L1 como modelo de adipocitos y análisis del medio de cultivo de células diferenciadas.....	44
3. Análisis del receptor soluble de insulina en el medio de cultivo de los hepatocitos.....	46
3.1 El receptor soluble en el medio de cultivo de 48 horas.....	47
3.2 El receptor soluble en el medio de cultivo de 96 horas.....	48
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
Perspectivas.....	56
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. La insulina y sus funciones**

La insulina es una hormona fundamental en el metabolismo de los carbohidratos y las grasas y también participa en la regulación del metabolismo de las proteínas.

La insulina es una proteína relativamente pequeña, con un peso molecular de alrededor de 6 kDa, que es producida y secretada por las células beta de los islotes pancreáticos. Está formada por dos cadenas (A y B) unidas entre sí por puentes disulfuro. Se sintetiza en forma de una preprohormona que pasa por un proceso de maduración de varias etapas antes de ser empaquetada en los gránulos de secreción, donde permanece hasta que un estímulo externo promueve su secreción.

La forma de la insulina que se encuentra en circulación y que es biológicamente activa, es un monómero que está formado por la cadena A de 21 aminoácidos y la cadena B con 30 aminoácidos. En concentraciones micromolares, la insulina se dimeriza y, en presencia de iones zinc puede asociarse para formar hexámeros (De Meyts y Whittaker, 2002).

### **1.1 Acción de la insulina en el metabolismo**

Cuando el organismo recibe alimentos y la glucosa es absorbida por el sistema digestivo, la insulina es secretada en respuesta a un aumento en los niveles de glucosa en la sangre. Su efecto inmediato es promover el transporte de glucosa hacia el interior de la mayor parte de las células del cuerpo, permitiendo así que la concentración de dicho carbohidrato en el plasma sanguíneo permanezca dentro de ciertos límites. Además del transporte, la insulina

promueve el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno. Aunque de manera general la insulina actúa sobre todos los tipos celulares, hay tres tejidos que son el blanco principal de la acción de esta hormona: el músculo, el tejido adiposo y el hígado.

En el músculo, la insulina favorece la entrada de glucosa al interior de las células, ya que promueve la traslocación de transportadores de glucosa del citoplasma hacia la membrana. Una vez dentro de las células, a través de la glucólisis, la glucosa se utiliza para la producción de energía necesaria para el movimiento. En el caso de que entre a la célula una mayor cantidad de glucosa de la que el músculo necesita a corto plazo, la glucosa puede almacenarse en forma de glucógeno y ser utilizada más adelante, aunque dicho proceso sucede de manera preferencial en el hígado.

El principal efecto de la insulina en el hígado es inhibir la glucogenólisis y la gluconeogénesis, impidiendo así la producción de glucosa en dicho órgano. Al mismo tiempo, promueve la síntesis de glucógeno, lo que permite que la glucosa se almacene al interior de las células hepáticas. Durante los períodos de ayuno los niveles de glucosa en la sangre disminuyen, el páncreas deja de secretar insulina y la disminución de dicha hormona en el hígado provoca que la producción y liberación de la glucosa se reinicie. Los niveles de dicho carbohidrato en la sangre se normalizan y la glucosa vuelve a estar disponible. Las células de todo el cuerpo pueden utilizarla como fuente de energía para llevar a cabo sus funciones vitales.

Es importante mencionar que además de la insulina hay otro grupo de hormonas que participan en la homeostasis de la glucosa a las que se les conoce como hormonas contraregulatoras de la insulina y que, en general, tienen efectos contrarios a los de la insulina aumentando los niveles de

glucosa. Este grupo de hormonas incluye al glucagon y la adrenalina, entre otras.

Al unirse a su receptor en la membrana de las células hepáticas, la insulina inicia una cascada de señalización que lleva a la activación o inactivación de enzimas específicas que participan en el metabolismo de la glucosa. De este modo, la insulina:

- Inactiva la fosforilasa del hígado, que es la enzima que cataliza la síntesis de glucosa a partir de glucógeno, impidiendo así la glucogenólisis.
- Activa la glucocinasa, que transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato, lo cual impide que la glucosa salga de las células hepáticas, pues la forma fosforilada de la glucosa no puede atravesar la membrana plasmática.
- Activa la sintetasa de glucógeno, promoviendo la polimerización de la glucosa para formar glucógeno.
- Más a largo plazo, inhibe la transcripción de los genes de la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que son enzimas fundamentales en la gluconeogénesis (Saltiel y Kahn, 2001; Schinner *et al.*, 2005).

En el tejido adiposo, la insulina activa a la lipasa de lipoproteínas, que está localizada en las paredes capilares de dicho tejido. Dicha enzima se encarga de hidrolizar los triglicéridos en ácidos grasos, los cuales entran a las células adiposas, donde son de nuevo transformados a triglicéridos y almacenados.

También en el tejido adiposo, la insulina promueve la traslocación de transportadores de glucosa hacia la membrana y, por lo tanto, favorece el movimiento de la glucosa hacia el interior celular. Una vez en los adipocitos, esta glucosa se utiliza para la producción de glicerol 3-fosfato que se combina con los ácidos grasos para formar triglicéridos, que son la molécula de almacenamiento de lípidos del tejido adiposo.

La insulina también inhibe la acción de la lipasa sensible a hormonas, que es una enzima que provoca la hidrólisis de los triglicéridos que ya están almacenados en los adipocitos. Así, cuando los niveles de insulina se elevan, se inhibe la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo hacia la sangre.

La insulina participa en el metabolismo de las proteínas de la siguiente manera:

- Promueve el transporte activo de los aminoácidos hacia el interior celular en el músculo y en el hígado, entre otros.
- Al actuar directamente sobre la maquinaria de traducción de la célula, aumenta la síntesis de proteínas. También, a más largo plazo, promueve la transcripción de genes específicos y su posterior traducción dando lugar a nuevas proteínas.
- Inhibe el catabolismo de las proteínas y la liberación de aminoácidos desde las células, principalmente las musculares, hacia el plasma sanguíneo.

De este modo, cuando hay una deficiencia del nivel de insulina se produce un gasto excesivo de proteínas. El catabolismo de las proteínas aumenta, la síntesis se detiene y una gran cantidad de aminoácidos son liberados al plasma.

Por último, es importante mencionar que la insulina lleva a cabo un importante número de funciones además del mantenimiento de la normoglicemia. Muchas de estas funciones se logran por la acción directa de la insulina sobre enzimas en el interior celular, mientras que otras lo hacen por el cambio en la expresión de más de 100 genes. Por ejemplo, la insulina regula la expresión de genes que participan en la utilización de aminoácidos, en el metabolismo de lípidos en músculo y tejido adiposo y en el crecimiento celular, desarrollo y supervivencia (Rhodes y White, 2002).

## **2. El receptor de insulina**

El receptor de insulina es una proteína de membrana tetramérica que está formada por dos subunidades alfa extracelulares (con un peso molecular de 125 a 135 kDa) y dos subunidades beta (90 a 95 kDa) transmembranales (Berhanu y Olefsky, 1982).

El receptor de insulina es un miembro de la superfamilia de los RTKs (*Receptor Tyrosine Kinase*) que tienen actividad de cinasa de tirosina. En esta familia también se encuentran el receptor de IGF-I (por sus siglas en inglés, *Insulin like Growth Factor I*). Otro receptor muy relacionado con los dos anteriores es el receptor IRR (*Insulin-receptor Related Receptor*) que fue identificado en 1989 por Shier y Watt (Shier y Watt, 1989), pero hasta la fecha no se conoce su ligando (De Meyts, 2004).

El receptor de insulina y el del IGF-I se diferencian de otros RTKs en que aún en ausencia de su ligando son dímeros covalentes, a diferencia de los otros que se dimerizan sólo después de la unión con el ligando, lo que resulta en la activación de la cinasa por transfosforilación (De Meyts y Whittaker, 2002). Cuando la insulina se une a su sitio de unión, localizado en las

subunidades  $\alpha$  del receptor, hay un cambio conformacional que permite la fosforilación de los sitios con actividad de cinasa de tirosina, los cuales están localizados en la región intracelular de las subunidades  $\beta$ . Así se inicia una cadena de señalización que, dependiendo del tipo celular en que el receptor se localice, llevará a la célula a presentar una serie de respuestas fisiológicas específicas (De Meyts, 2004).

En los humanos, el precursor del receptor de insulina se deriva de un gene grande de aproximadamente 130 kilobases que está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (Olefsky, 1990). El gene que codifica el receptor tiene 22 exones y 21 intrones (Seino *et al.*, 1989). El exón corto 11 sufre un corte y empalme (*splicing*) alternativo que da como resultado las isoformas A y B del receptor, las cuales difieren entre sí por la ausencia o presencia de una secuencia de 12 residuos de aminoácido (Seino y Bell, 1989).

El receptor de insulina se sintetiza en forma de un preproreceptor de cadena sencilla que tiene un péptido señal de 27 residuos de aminoácido, el cual se pierde durante la traducción. El receptor es glucosilado, plegado y dimerizado con ayuda de las proteínas chaperonas calnexina y calreticulina (Bass *et al.*, 1998). Posteriormente es transportado al aparato de Golgi, donde es procesado y sufre un corte proteolítico en el sitio formado por los residuos 732 al 735 (Arg-Lys-Arg-Arg), gracias a la acción de la proteasa furina, dando lugar al receptor tetramérico  $\alpha_2\beta_2$  maduro (De Meyts y Whittaker, 2002).

En la figura 1A se muestra un diagrama de la estructura del receptor de insulina en el que se pueden identificar, del lado izquierdo, los 22 exones del gene del receptor y los dominios que forman la proteína, del lado derecho. En el esquema se representa la isoforma B del receptor que incluye al exón 11.

Como puede apreciarse en la figura 1, L1 y L2 (*Large domains* 1 y 2), que se encuentran en la región del amino terminal de la subunidad alfa, son

dominios grandes globulares muy similares a los del receptor de IGF-I. Entre estos dos dominios hay una región rica en cisteínas CR que consiste de una serie de módulos unidos por enlaces disulfuro, similares a los que se encuentran en el receptor del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) y en la laminina (Ward *et al.*, 1995 en De Meyts, 2004).

Hacia la región del carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  y en el amino terminal de la subunidad  $\beta$ , se localizan los dominios del tipo de la fibronectina III, conocidos como Fn0, Fn1 y Fn2. En el dominio Fn1 están contenidos tanto un gran inserto (identificado como Ins en la figura 1A) que tiene el sitio de corte entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , como los residuos de aminoácidos 704-715 que son importantes para la unión con la insulina (Marino-Buslje *et al.*, 1999).

La región extracelular de la subunidad  $\beta$  (que comprende parte del dominio Fn1 y el dominio Fn2 completo) ha sido relacionada con la regulación de la actividad de cinasa de tirosinas del receptor.

Por debajo del dominio Fn<sub>2</sub>, se localiza un pequeño dominio transmembranal y la porción intracelular de la subunidad  $\beta$ , porción que a su vez contiene tres regiones: el dominio de cinasa de tirosina (TK), flanqueado por dos regiones reguladoras; la región yuxtamembranal (JM) que participa en la unión con IRS (*Insulin Receptor Sustare*) así como en la internalización del receptor, y la cola del carboxilo terminal (CT) (De Meyts, 2004).

En la figura 1A también se señalan los sitios de N-glucosilación del receptor, que están indicados por puntas de flecha de color naranja, y los sitios importantes para la unión con el ligando que han sido identificados hasta ahora por análisis de mutagénesis dirigida.

Las dos subunidades  $\alpha$  del receptor de insulina están unidas entre si por puentes disulfuro, indicados en el diagrama por líneas horizontales que unen

los dos lados del receptor. Uno de ellos se forma entre los residuos de cisteínas en posición 524, localizadas en cada dominio Fn0 (Schäffer y Ljungqvist, 1992). Los tres residuos de cisteína en posición 682, 683 y 685 del inserto del dominio Fn1 también están implicados en la formación de puentes disulfuro entre las dos subunidades  $\alpha$  (Sparrow *et al.*, 1997).

Entre la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$  de cada dímero del receptor también se forma un puente disulfuro entre el residuo de cisteína en posición 647 del dominio Fn1 y el residuo de cisteína en posición 872 del dominio Fn2 (Sparrow *et al.*, 1997; Lu y Guidotti, 1996; Cheatham y Kahn, 1992).

En la figura 1B se muestran algunas de las estructuras secundarias o terciarias de los diferentes dominios del receptor de insulina que se han obtenido gracias a análisis hechos con rayos X y por predicciones hechas a partir de la estructura primaria del receptor y su comparación con la de otras proteínas (Marino-Buslje *et al.*, 1999 y De Meyts y Whittaker, 2002).

## **2.1 Unión entre el ligando y el receptor**

La secuencia y la estructura de la insulina están actualmente bien definidas, lo que ha permitido establecer que hay dos superficies de unión con su receptor. La primera es conocida como la “superficie de unión clásica” y la segunda se traslapa con el dominio que participa en la formación de hexámeros (De Meyts y Whittaker, 2002).

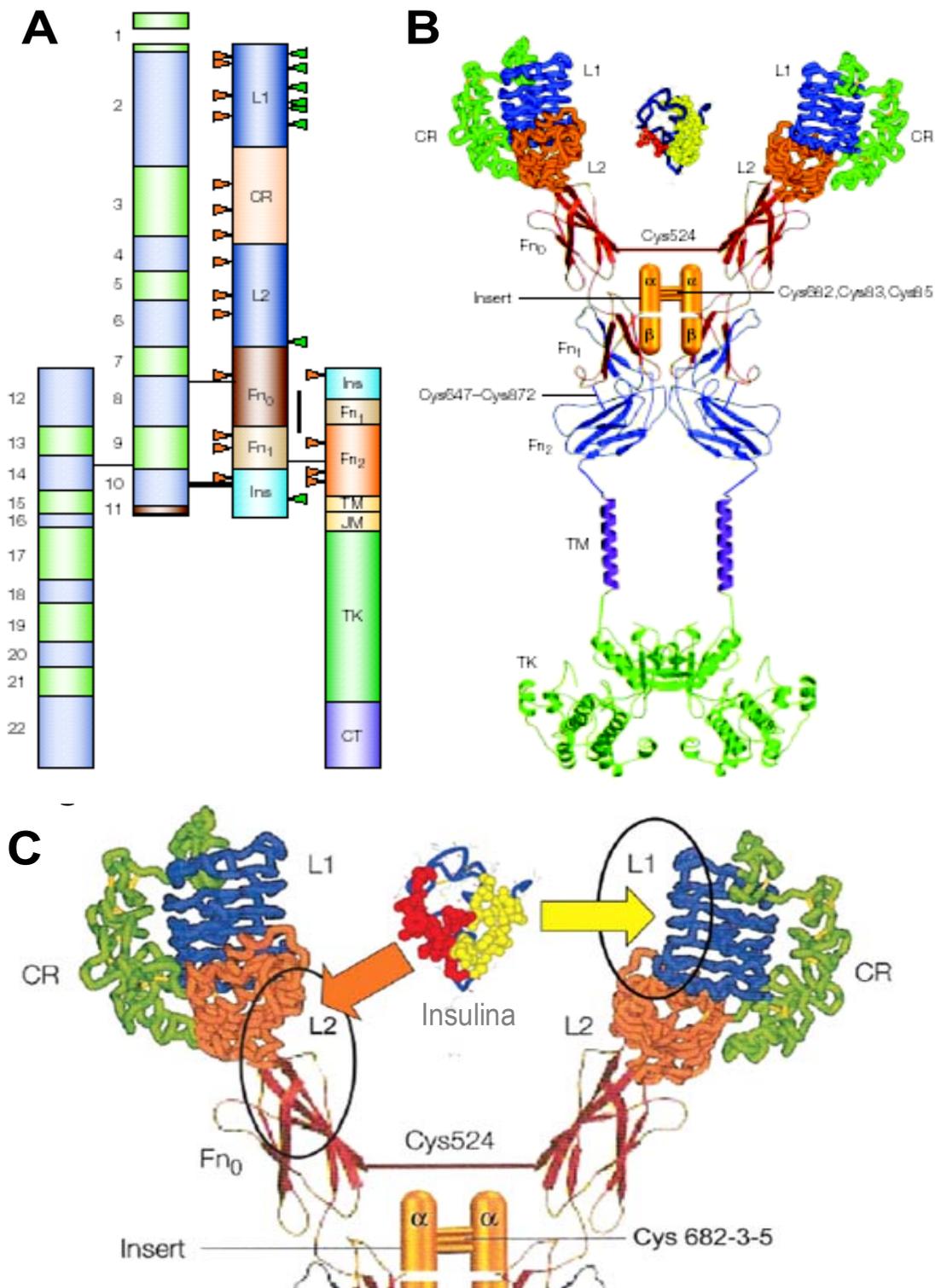
Por otro lado, estudios llevados a cabo utilizando diferentes técnicas, como el marcaje por fotoafinidad, indican que en el receptor de insulina hay dos regiones importantes para la unión con el ligando.

El primer sitio de unión involucra al dominio L1 (residuos de aminoácidos 1-137) y a los aminoácidos 704-715 (Mynarcik *et al.*, 1996

citado en De Meyts y Whittaker, 2002) que se localizan en la región carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$ .

Se ha propuesto que la segunda región importante para la unión se localiza en la región carboxilo terminal del dominio L2 y en el dominio Fn0 (aminoácidos 325-524) (De Meyts y Whittaker, 2002).

Basados en datos estructurales y de cinética del receptor de insulina, se han propuesto modelos para explicar la unión de la insulina con su receptor, los cuales apoyan la idea de que una sola molécula de insulina se une asimétricamente a dos sitios diferentes en el receptor dimérico, provocando un entrecruzamiento (*crosslinking*) de las dos mitades del receptor (De Meyts, 2004). En la figura 1C se muestra un esquema de este modelo en donde los sitios de unión a la insulina en la subunidades  $\alpha$  del receptor están marcados con círculos negros. También está representada una molécula de insulina con la “superficie de unión clásica” en forma de esferas amarillas y la segunda superficie de unión en color rojo.



**Figura 1.** El receptor de insulina y su unión con el ligando. Modificada de De Meyts y Whittaker, 2002 y De Meyts, 2004. En A y B se muestra la estructura del receptor de insulina, en C se muestra el modelo de unión de la insulina con su receptor con los sitios de unión del receptor señalados mediante círculos negros.

## **2.2 La activación del receptor de insulina: la vía de señalización de la insulina**

La insulina ejerce sus efectos en las células blanco a través de la unión con su receptor en la membrana plasmática de dichas células, lo cual inicia una cascada de señalización en el interior de la célula, que se describe brevemente a continuación.

La unión de la insulina con su receptor produce cambios conformacionales que llevan a la transfosforilación en residuos de tirosina de un dominio intracelular del receptor, el cual que tiene actividad de cinasa de tirosina. Con este dominio activo, el receptor puede fosforilar a otras proteínas conocidas como substratos del receptor de insulina (IRS: *Insulin Receptor Substrate*) que a su vez se unirán y activarán a otra serie de proteínas.

Las proteínas IRS se unen específicamente a los dominios SH<sub>2</sub> (inglés *Src-homology-2*) que se encuentran en varias moléculas de señalización, como pueden ser la cinasa del fosfatidilinositol (PI-3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*) o la Grb-2 (*Growth factor receptor binding protein 2*). El efecto que la insulina tenga sobre su célula blanco dependerá de cual de estas proteínas efectoras se exprese en la célula y sea reclutada hacia el complejo de señalización.

### **2.2.1 Vía de la PI-3K**

Cuando se activa la PI-3K actúa sobre los lípidos de membrana y se producen 4,5-bifosfato fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) y 3,4,5-trifosfato fosfatidilinositol (PIP<sub>3</sub>). Los PIP<sub>2</sub> y PIP<sub>3</sub> se unen a la proteína PDK (*Phosphoinositide Dependant Kinase*) y esta última activa a la cinasa de serinas y treoninas conocida como

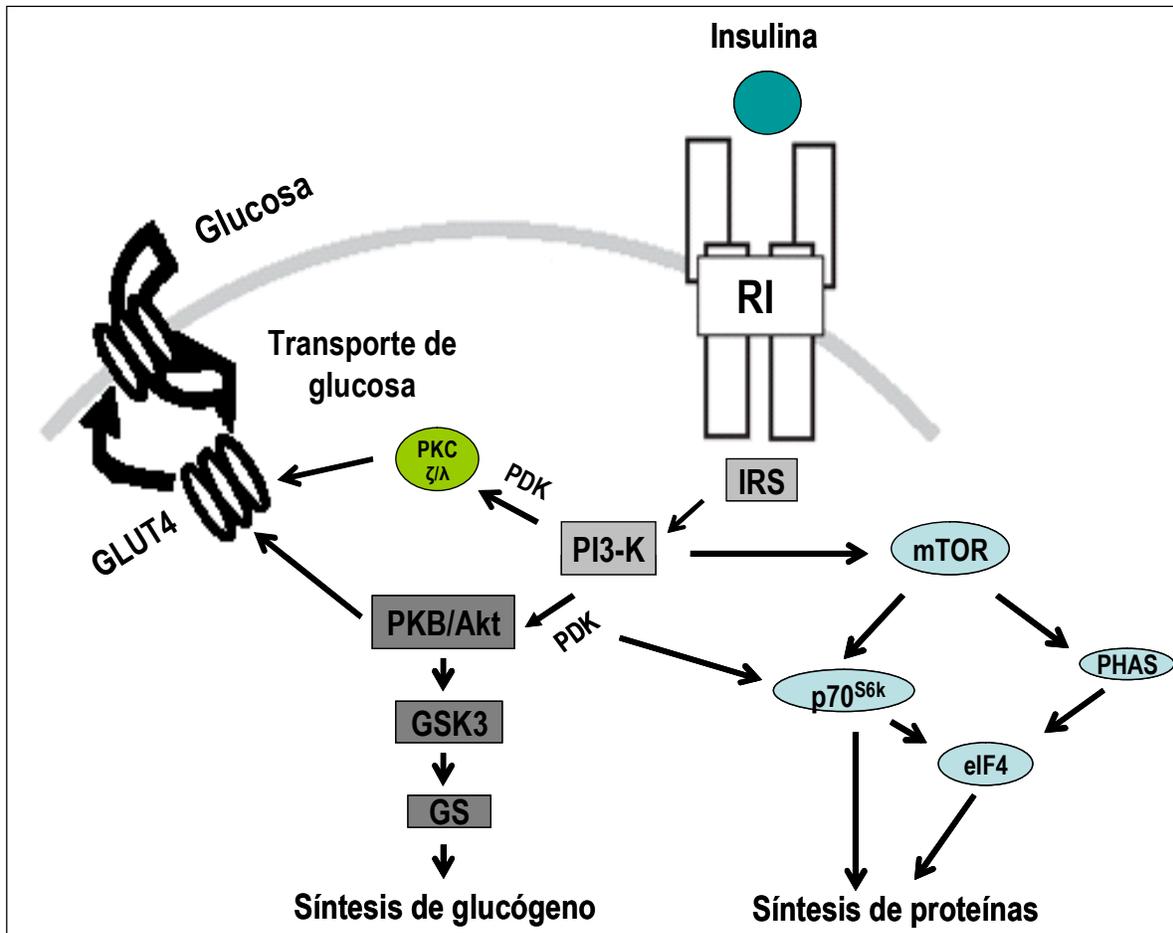
PKB (*Protein Kinase B*), la cual, a su vez, fosforila e inactiva a la proteína cinasa de la sintetasa de glucógeno GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*).

Cuando la GSK3 está activa actúa sobre la sintetasa de glucógeno (GS, *Glycogen Synthase*) fosforilándola e inactivándola, provocando que la síntesis de glucógeno disminuya. Sin embargo, cuando la GSK3 se inactiva, la GS queda activa y la síntesis de glucógeno se promueve. De este modo la estimulación de la insulina sobre la vía de la PI-3K incrementa la acumulación de glucosa en forma de glucógeno.

Cuando se activa la vía de PI3-K también se promueve la entrada de glucosa hacia la célula en el músculo y el tejido adiposo. La PI-3K, a través de la activación de PKB (Rhodes y White, 2002) o de la cinasa de proteínas C (PKC: *Protein Kinase C*) en su isoforma  $\zeta/\lambda$  (Kotani *et al.*, 1998 citado en Kahn y Flier, 2000), lleva a la traslocación de transportadores de glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática, lo cual permite el transporte de glucosa hacia el interior celular.

Por otro lado, la activación de PI-3K también promueve la síntesis de proteínas regulada por la vía de mTOR. (*mammalian Target of Rapamycin*) en la mayoría de las células (Rhodes y White, 2002).

En la figura 2 se puede observar la vía de la PI-3K y las principales moléculas de señalización que participan en ella.

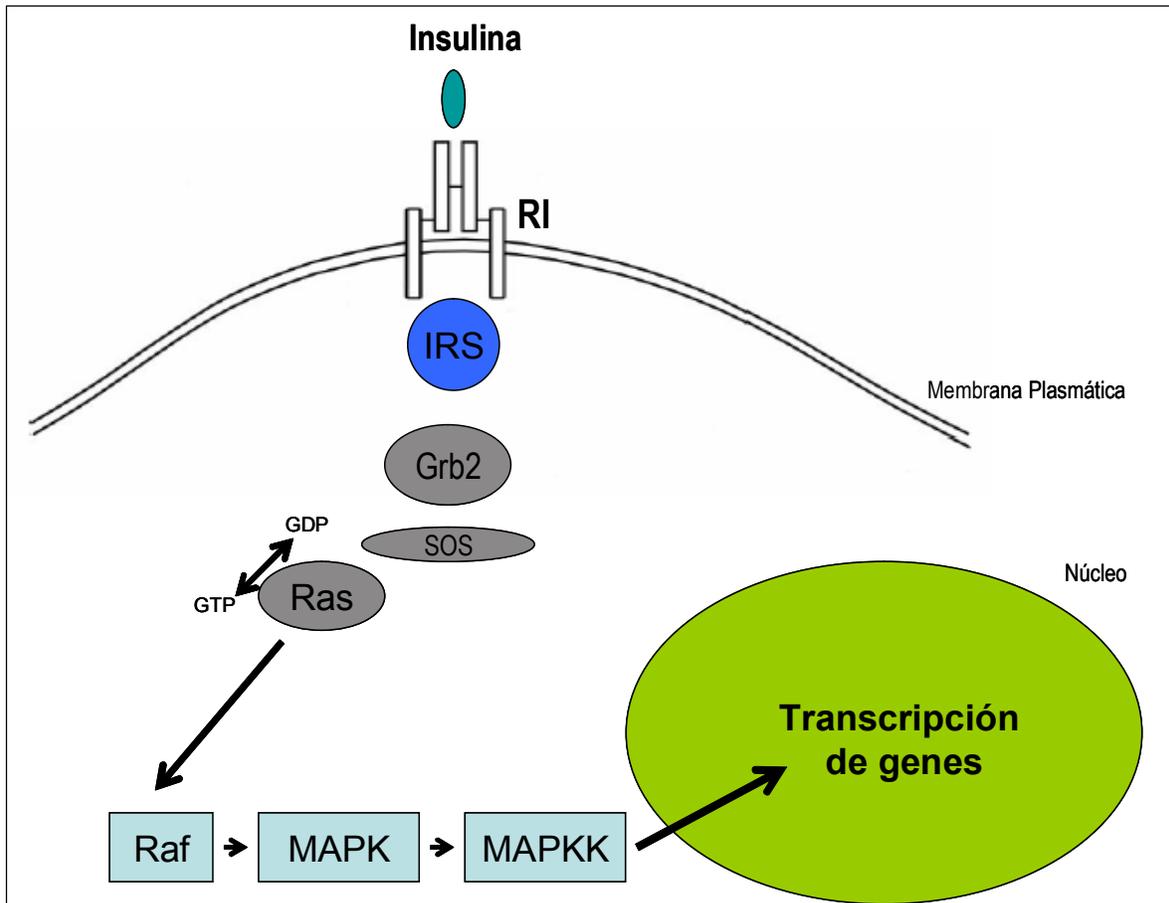


**Figura 2.** El receptor de insulina y la vía de la PI3-K. Modificada de Rhodes y White, 2002 y Schinner *et al.*, 2005.

### 2.2.2 Vía de la Grb2

También en respuesta a la insulina, puede activarse Grb2. Cuando Grb-2 se activa se une a una proteína conocida como SOS la cual, a su vez, cataliza el intercambio de GDP por GTP en una proteína del grupo de las proteínas G pequeñas (que unen nucleótidos de guanósina), la proteína Ras. Cuando se une el GTP, Ras se activa y puede activar a una cinasa conocida como Raf, que es la primera de una serie de cinasas (Raf, MEK y MAPK) que forman una cascada en la cual cada cinasa activa a la siguiente por medio de fosforilaciones. La última de estas cinasas, la cinasa de proteínas activada por

mitógenos, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), puede actuar directamente sobre la expresión de genes específicos, al fosforilar y activar proteínas que regulan la transcripción, (Rhodes y White, 2002).



**Figura 3.** El receptor de insulina y la vía de la Grb2. Modificada de Kido et al., 2001

Independientemente de cuál de las vías se active por la insulina, la terminación de la señal es también un evento importante y puede ser controlada por distintos mecanismos.

La acción de la señal de la insulina puede ser atenuada por la acción de proteínas con actividad de fosfatasas de tirosina (PTPases, *Protein Tyrosine Phosphatases*), que se encargan de la desfosforilación del receptor de insulina y sus sustratos. Se ha demostrado que varias fosfatasas pueden desfosforilar al

receptor de insulina *in vitro* y participar en la regulación de la vía de señalización de la insulina (Saltiel y Khan, 2001).

El receptor de insulina, aparte de tener sitios de fosforilación en tirosinas, también puede ser fosforilado en serinas, lo cual puede atenuar la señalización al disminuir la fosforilación en tirosinas (Hotamisligil *et al.*, 1996 citado en Saltiel y Kahn, 2001).

Después de la unión con la insulina el receptor de insulina es procesado por endocitosis y luego puede ser reciclado y volver a la superficie celular o ser degradado intracelularmente (Accili *et al.*, 1992 citado en Marino-Buslje *et al.*, 1999).

### **3. La resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina puede entenderse como la incapacidad de la insulina de ejercer efectos fisiológicos sobre sus tejidos blanco.

Como la principal acción de la insulina es promover la entrada de glucosa a tejidos como músculo y grasa, así como el almacenamiento de la glucosa y la supresión de la producción de glucosa en el hígado, cuando se presenta la resistencia a la insulina dichas acciones no se llevan a cabo y podemos observar hiperglucemia (nivel elevado de glucosa en el plasma sanguíneo) acompañada de hiperinsulinemia (nivel elevado de insulina en la sangre).

Hay varios mecanismos que se cree que pueden participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina, entre los cuales pueden mencionarse aquellos que tienen que ver directamente con alteraciones a nivel del receptor de insulina, aquellos que tienen que ver con alteraciones en la vía de señalización de insulina y los que tienen que ver con la obesidad.

### **3.1 Alteraciones a nivel del receptor**

En la literatura se pueden encontrar informes relacionados con tres aspectos del receptor de insulina que podrían estar relacionados con la resistencia.

#### **3.1.1 Mutaciones del receptor**

Existen una cantidad importante de informes de mutaciones del gene del receptor de la insulina, que pueden afectar tanto la síntesis como el transporte hacia la membrana celular del receptor como su afinidad de unión por la insulina, su actividad de cinasa de tirosinas o su endocitosis y degradación. Sin embargo, solamente algunas de estas mutaciones, sobre todo las relacionadas con la actividad de cinasa de tirosinas del receptor, se han podido relacionar con casos de resistencia a la insulina y, dentro de estos, sólo una fracción muy pequeña parece participar en la resistencia a la insulina que se desarrolla antes de la diabetes mellitus tipo 2, pues la gran mayoría de las mutaciones en el receptor se relacionan con síndromes congénitos de resistencia severa a la insulina (Taylor *et al.*, 1992).

#### **3.1.2 Isoformas del receptor**

Se sabe que el receptor de insulina tiene dos isoformas: la isoforma A, que también se conoce como isoforma Ex11<sup>-</sup> debido a que no tiene una secuencia de 12 aminoácidos en el carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$ , codificada por el exón 11 y la isoforma B ó Ex11<sup>+</sup> que sí tiene dicha secuencia.

Existe evidencia de que las dos isoformas del receptor tienen características funcionales distintas. En primer lugar, se ha demostrado que la afinidad de unión de la insulina por la isoforma Ex11<sup>-</sup> es aproximadamente

dos veces mayor que la de la isoforma Ex11<sup>+</sup> (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1993 citados en Sesti, 2000).

Por otro lado, la expresión relativa de las dos isoformas es distinta en los diferentes tejidos humanos. Las células hematopoyéticas expresan solamente la forma Ex11<sup>-</sup>, tejidos como la placenta, el riñón, el tejido adiposo y el músculo esquelético expresan ambas isoformas, mientras que el hígado expresa predominantemente la isoforma Ex11<sup>+</sup> (Sesti, 2000).

Además, la diferencia en la afinidad del receptor por el ligando está acompañada por cambios en la sensibilidad a los efectos metabólicos de la insulina (McClain, 1991 citado en Sesti, 2000). De este modo se ha observado que una expresión incrementada de la forma Ex11<sup>+</sup>, de baja afinidad por la insulina, se relaciona con niveles altos de glucosa en la sangre y concentraciones de insulina en ayuno también altas (Sesti, 2000).

El descubrimiento de que las dos isoformas del receptor de insulina tienen características funcionales distintas llevó a postular la hipótesis de que la alteración de la expresión específica de un tejido de las isoformas podría provocar una abundancia relativa mayor de la isoforma de baja afinidad y esto, a su vez, provocar la resistencia a la insulina.

Sin embargo, los resultados del análisis de la abundancia de las dos isoformas en tejidos como el adiposo y el muscular no han sido del todo concluyentes. Por ejemplo, hay tres estudios en los que se ha reportado que la expresión del RNA mensajero de las dos isoformas del receptor de insulina está alterada en el músculo esquelético de sujetos prediabéticos resistentes a la insulina y diabéticos tipo 2, con respecto a controles sanos (Mosthaf *et al.*, 1991; Mosthaf *et al.*, 1993; Norgren *et al.*, 1993 citados en Sesti, 2000), mientras que otros estudios no confirman dichas observaciones (Anderson *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993 citados en Sesti, 2000).

### 3.1.3 Formación de receptores híbridos

El receptor de insulina y el receptor de IGF-I tienen un alto grado de homología y los residuos de cisteína implicados en la formación de puentes disulfuro están muy conservados, por lo que es posible que se formen receptores híbridos con un heterodímero  $\alpha\beta$  del receptor de insulina unido a un heterodímero  $\alpha\beta$  del receptor de IGF-I. La existencia de dichos receptores híbridos está bien demostrada en varios estudios (Soos y Siddle, 1989; Treadway et al., 1989; Soos et al., 1990; Kasuya *et al.*, 1993 citados en Sesti, 2000).

Se ha demostrado que los receptores híbridos se unen al IGF-I con una afinidad similar a la de los receptores de IGF-I, sin embargo se unen a la insulina con una afinidad menor que los receptores de insulina típicos (Soos *et al.*, 1993; Langlois *et al.*, 1995 citados en Sesti, 2000). Además, los receptores híbridos se comportan como un receptor de IGF-I en lugar de como un receptor de insulina típico o como un intermedio entre los dos receptores (Seely *et al.*, 1995 citado en Sesti, 2000).

Por otro lado, se ha analizado la distribución de estos receptores híbridos, descubriendo que una fracción significativa del total de los receptores de insulina está en forma de híbrido, variando desde un 37 % en placenta a un 42 % en el músculo esquelético, con excepción del tejido adiposo, donde la fracción de receptores insulina/IGF-I es sólo del 17 % (Federici *et al.*, 1997). Además, varias observaciones sugieren que las diferencias tejido-específicas en la expresión de receptores híbridos pueden contribuir a la regulación de la sensibilidad a la insulina (Sesti, 2000).

Todo lo anterior ha llevado a sugerir que una proporción incrementada de receptores híbridos en los tejidos blanco de la insulina provocaría una

reducción en la sensibilidad a la insulina, contribuyendo así al desarrollo de la resistencia a la insulina. Una serie de descubrimientos apoyan esta hipótesis, pues se ha encontrado que existe una proporción mayor de receptores híbridos en músculo y tejido adiposo de pacientes con diabetes tipo 2 (Federici *et al.*, 1996; Federici *et al.*, 1997 citados en Sesti, 2000) y en varios tejidos de pacientes resistentes a la insulina, con respecto a controles sanos (Valensise *et al.*, 1996; Federici *et al.*, 1997; Federici *et al.*, 1998 citados en Sesti, 2000).

### **3.2 Alteraciones a nivel de la vía de señalización**

En los últimos años se han encontrado diferentes alteraciones a distintos niveles de la vía de señalización de la insulina que podrían estar de algún modo relacionados con el desarrollo de la resistencia a la insulina. A continuación se presentan algunos de los más relevantes.

#### **3.2.1 Sustratos del Receptor de Insulina (IRS)**

En la literatura existen varios reportes que sugieren que las alteraciones a nivel del IRS pueden tener un papel importante en reducir la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos.

Existen varios tipos de IRS, pero se sabe que los IRS más importantes en la regulación del metabolismo de los carbohidratos parecen ser el IRS-1 y el IRS-2 (White, 2002 citado en Schinner *et al.*, 2005). En el humano, hay mutaciones del IRS-1 que están asociadas con la resistencia a la insulina (Whitehead *et al.*, 1998 citado en Schinner *et al.*, 2005) y la disrupción del gene del IRS-1 en el ratón resulta en el desarrollo de resistencia a la insulina principalmente en el músculo y el tejido adiposo (Yamauchi *et al.*, 1996 citado en Schinner *et al.*, 2005). Por su parte, el ratón *knock out* del IRS-2 no sólo

presenta resistencia a la insulina en el músculo, tejido adiposo e hígado sino que también desarrolla diabetes como resultado de un mal funcionamiento de las células  $\beta$  (Previs *et al.*, 2000 citado en Schinner *et al.*, 2005).

### 3.2.2 PKB

La participación de PKB en la resistencia a la insulina no está del todo clara y existen observaciones contradictorias con respecto a esta proteína. Se ha reportado, por ejemplo, que la función de PKB es defectuosa en el músculo y el tejido adiposo de pacientes diabéticos (Krook *et al.*, 1998; Rondinone *et al.*, 1999 citados en Schinner *et al.*, 2005). Sin embargo, en otro estudio se encontró que no había ningún defecto en la actividad de PKB en músculos de pacientes diabéticos, aunque si podía observarse una disminución en la actividad de PI-3K (Kim *et al.*, 1999 citado en Schinner *et al.*, 2005). Hay otros datos obtenidos con estudios *in vitro* de músculo humano que muestran que las tres isoformas de PKB se activan en respuesta a la insulina en sujetos delgados usados como control mientras que solamente la isoforma PKB $\alpha$  (Akt1) se activa en los músculos de sujetos resistentes a la insulina (Brozinick *et al.*, 2003 citado en Schinner *et al.*, 2005).

Datos más recientes obtenidos con modelos animales *knock out* para PKB aclaran un poco la participación de PKB en el mantenimiento de la normoglucemia y en la resistencia a la insulina. Por ejemplo, mientras que la disrupción de PKB $\alpha$  (Akt1) en ratones no provocó alteraciones significativas en el metabolismo, los ratones *knock out* de la isoforma PKB $\beta$  (Akt2) desarrollaron resistencia a la insulina y terminaron con un fenotipo muy semejante al que se presenta en humanos con diabetes tipo 2 (Cho *et al.*, 2001 citado en Schinner *et al.*, 2005). Consistente con lo anterior, en estudios

recientes hechos en humanos se detectó una mutación en el dominio con actividad de cinasa de la PKB $\beta$  en una familia de pacientes con una resistencia a la insulina severa. Esta mutación co-segregó con el fenotipo de resistencia a la insulina por tres generaciones dentro de dicha familia. (George et al., 2004 citado en Schinner *et al.*, 2005).

### **3.2.3 Sintetasa de glucógeno; PEPCK y G6Pasa**

En estados de resistencia a la insulina comúnmente se presentan alteraciones en la acumulación de glucógeno en el hígado así como en la actividad de la sintetasa de glucógeno (Bogardus *et al.*, 1984; Dambso *et al.*, 1991 citados en Schinner *et al.*, 2005).

Además de una falla en la síntesis de glucógeno, la hiperglucemia que se observa en pacientes con resistencia a la insulina y con diabetes tipo 2 puede ser resultado, en parte, de un incremento en la producción de glucosa en el hígado. Lo anterior es resultado de la falta de inhibición de dos enzimas gluconeogénicas muy importantes, la PEPCK y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). En condiciones normales, la insulina inhibe la expresión de ambas enzimas a nivel transcripcional (Barthel y Schmoll, 2003 citados en Schinner *et al.*, 2005). Cuando hay un estado de resistencia a la insulina, la síntesis de PEPCK y G6Pasa no se inhibe, de modo que la gluconeogénesis puede llevarse a cabo de manera activa en el hígado, aumentando la producción hepática de glucosa, lo cual explica los niveles elevados de glucosa en la sangre.

### **3.3 Obesidad y resistencia a la insulina**

En la actualidad existen una serie de evidencias que muestran una relación estrecha entre la obesidad y el desarrollo de resistencia a la insulina y aunque no se entiende con claridad el mecanismo por el cual esto sucede, cada vez existen más datos experimentales que pueden ayudarnos a dar una explicación a esta correlación.

De acuerdo con los datos presentes en la literatura, es necesario considerar tres aspectos para entender la relación entre obesidad y resistencia a la insulina. El primero está relacionado con las alteraciones en la señalización de la insulina que se presentan durante la obesidad y que impiden a dicha hormona llevar a cabo sus efectos sobre la regulación de la glucemia. El segundo tiene que ver con el exceso de ácidos grasos libres en la sangre que se produce en la obesidad y que pueden contribuir también al desarrollo de la resistencia a la insulina. Estos dos aspectos están muy relacionados entre si, ya que el exceso de ácidos grasos libres en la sangre puede afectar de manera directa la señalización de la insulina, llevando a una disminución en el transporte de glucosa inducido por insulina. El tercero considera el papel del tejido adiposo como un órgano endocrino capaz de producir sustancias, conocidas como adipocinas, que aumentan o disminuyen la sensibilidad a la insulina y que pueden participar por si mismos en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Kahn y Flier, 2000; Saltiel y Khan, 2001; Schinner *et al.*, 2005).

Durante la resistencia a la insulina que se presenta en pacientes obesos, tanto en músculo como en los adipocitos, hay varias alteraciones en la vía de señalización de la insulina que pueden presentarse a nivel de la expresión o de la actividad de las diferentes proteínas que participan en dicha vía. Se sabe,

por ejemplo, que en los adipocitos de humanos obesos resistentes a la insulina o con diabetes tipo 2, la expresión de IRS-1 está reducida, lo que resulta en una actividad de PI-3K asociada a IRS-1 disminuida (Rondinone *et al.*, 1997 citado en Kahn y Flier, 2000). Por otro lado, en el músculo esquelético de sujetos obesos, los niveles de IRS-1 e IRS-2 son normales pero la actividad de PI-3K está disminuida (Kim *et al.*, 1999 citado en Kahn y Flier, 2000). También se sabe, a partir de datos obtenidos con fibras musculares *in vitro*, que en el músculo de humanos obesos hay una reducción de la fosforilación del receptor de insulina y de IRS-1 así como una menor actividad de PI-3K (Goodyear *et al.*, 1995).

Otro posible mecanismo para explicar los defectos de la señalización de la insulina en la obesidad puede ser el aumento en la expresión y actividad de varias fosfatasas de tirosina que desfosforilan y, por lo tanto, terminan los procesos de señalización propagados gracias a la fosforilación en residuos de tirosina de diversas proteínas. Existen datos que indican que hay niveles elevados de la expresión y/o actividad de varias fosfatasas en el músculo y el tejido adiposo de humanos y roedores obesos (Goldstein *et al.*, 2000 citado en Kahn y Flier, 2000).

Con respecto al efecto que tienen los ácidos grasos sobre la acción de la insulina en humanos, se tienen reportes de que los niveles de ácidos grasos libres en la sangre se correlacionan inversamente con la sensibilidad a la insulina (Perseghin *et al.*, 1997 citado en Schinner *et al.*, 2005). Así mismo, una elevada concentración de ácidos grasos libres y/o una acumulación intracelular excesiva de lípidos podrían reducir la sensibilidad a la insulina, particularmente en el músculo esquelético (Shulman, 2000).

La alteración en el transporte de glucosa parece ser el proceso central que determina la resistencia a insulina inducida por ácidos grasos (Shulman,

2000). Esto implicaría un mecanismo en el cual la acumulación intracelular de ácidos grasos o de sus metabolitos provocaría un defecto en la señalización a través de IRS/PI-3K, involucrando potencialmente a PKC $\theta$  (Dresner *et al.*, 1999; Griffin *et al.*, 1999 citados en Rhodes y White, 2002). Esto resultaría en una disminución en la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática cuya consecuencia final sería una reducción del transporte de glucosa en músculo (Dresner *et al.*, citado en Rhodes y White, 2002).

### **3.3.1 Función endocrina del tejido adiposo**

En los últimos años se ha descubierto que el tejido adiposo es capaz de producir y secretar numerosas citocinas, conocidas como adipocinas, que incluyen al TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), la leptina, la adiponectina y la resistina, las cuales tienen un papel importante en la regulación metabólica y se han relacionado con la sensibilidad a la insulina.

Los adipocitos expresan y secretan TNF- $\alpha$  y este factor es sobre expresado en humanos y animales obesos (Peraldi y Spiegelman, 1998 citados en Kahn y Flier, 2000). TNF- $\alpha$  tiene varios efectos que incluyen una inhibición de la lipogénesis y un aumento en la lipólisis. TNF- $\alpha$  puede afectar la señalización de la insulina al incrementar la fosforilación en serinas de IRS-1 y regular negativamente la expresión de GLUT4, contribuyendo así a la resistencia a la insulina (Kahn y Flier, 2000), lo cual se confirma con modelos de animales *knock out* para TNF- $\alpha$  o su receptor que presentan una disminución en la resistencia a la insulina asociada con obesidad (Peraldi y Spiegelman, 1998; Hotamisligil, 1999 citados en Kahn y Flier, 2000).

La leptina tiene efectos muy variados que tienen que ver con la saciedad y el consumo de alimento, el gasto energético y la función neuroendocrina

(Kahn y Flier, 2000). La leptina tiene un efecto de sensibilización a la insulina, como se ha observado, por ejemplo, en ratones con un tratamiento crónico y agudo con leptina (Halaas *et al.*, 1995 citado en Khan y Flier, 2000). Las bases moleculares de esta acción sensibilizadora no se conocen pero se han propuesto explicaciones que sugieren que sus acciones metabólicas son llevadas a cabo directamente a través de sus efectos sobre el sistema nervioso central o que la leptina tiene efectos directos en los tejidos blanco de la insulina (Kahn y Flier, 2000).

La adiponectina, por su parte, tiene un efecto que parece incrementar la sensibilidad a la insulina. Favorece la inhibición de la producción y liberación de glucosa hepática así como el transporte de glucosa y su utilización en el tejido adiposo y el músculo. La expresión de la adiponectina está disminuida en humanos y ratones obesos (Stumvoll y Häring, 2002 citados en Schinner *et al.*, 2005). De este modo, en humanos, los niveles de adiponectina se correlacionan directamente con la sensibilidad a la insulina y se sabe que, ratones deficientes en adiponectina son resistentes a la insulina (Kubota *et al.*, 2002 citado en Schinner *et al.*, 2005) e inversamente, la administración de adiponectina a ratones obesos resistentes a la insulina mejora la sensibilidad a la insulina (Berg *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002 citados en Schinner *et al.*, 2005).

Por último, con respecto a la resistina se sabe hasta ahora que tiene efectos antagónicos a la insulina pues se ha observado, en modelos animales, que la resistina disminuye el transporte de glucosa dependiente de insulina *in vitro* e incrementa los niveles de glucosa en la sangre en ayuno y la producción hepática de glucosa *in vivo* (Steppan *et al.*, 2001; Moon *et al.*, 2003; Pravenec *et al.*, 2003; Rajala *et al.*, 2003 citados en Schinner *et al.*, 2000).

## RESUMEN

La insulina es una hormona que tiene un papel central en el metabolismo de la glucosa y el mantenimiento de la normoglucemia y también participa en el metabolismo de los lípidos y las proteínas. Debido a que es una hormona tan importante es posible pensar en que exista un mecanismo de regulación para ella una vez que se encuentra en circulación. Una posibilidad es que la insulina en el plasma sanguíneo se una a proteínas capaces de regular su función.

Cuando la insulina no puede llevar a cabo sus funciones sobre sus tejidos blanco se presenta lo que se conoce como resistencia a la insulina. Se han propuesto varias explicaciones para esta patología y están todas relacionadas con alteraciones a nivel del receptor de insulina o de la vía de señalización. En este trabajo se propone que además puede haber un mecanismo que impida que la insulina se una a su receptor y que contribuya a la resistencia a la insulina.

La hipótesis de este trabajo es que se pueden producir proteínas que se unan a la insulina regulando su función y que una de estas proteínas podría ser una forma soluble del receptor de insulina. Los órganos que podrían estar produciendo estas proteínas son el hígado, ya que es el órgano que recibe el total de la producción de insulina del páncreas o el tejido adiposo, ya que en los últimos años se ha descubierto que el tejido adiposo puede actuar como un órgano productor de proteínas que también pueden participar en la regulación metabólica.

En este trabajo se analizaron medios de cultivo de hepatocitos y de un modelo de células adiposas y se buscaron en ellos proteínas capaces de unirse a la insulina y, en particular, se analizó la presencia de formas solubles del receptor de insulina en dichos medios.

El resultado más interesante fue que en el medio de cultivo de los hepatocitos se encontró una proteína que llamamos receptor soluble de la insulina, ya que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra la subunidad alfa de dicho receptor. Además, la presencia en el medio de cultivo de esta forma soluble del receptor aumenta dependiendo de la cantidad de insulina presente en el medio y del tiempo de exposición de las células a dicha hormona. Esta observación es muy importante ya que puede ayudarnos a entender la fisiología de la insulina y también fisiopatologías como la resistencia a la insulina.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El problema de la resistencia a la insulina es complejo y en su desarrollo pueden participar factores muy diversos y a distintos niveles, aunque todos de alguna manera relacionados con el receptor de la insulina o su vía de señalización.

También sabemos que la insulina es una hormona fundamental en el metabolismo y que tanto su ausencia como su exceso pueden causar diversas alteraciones. Por lo tanto, es posible pensar en un mecanismo de “amortiguamiento” de los efectos de la insulina, que actúe a un nivel diferente que el de las hormonas contrarreguladoras de la insulina. Una posibilidad es que exista una proteína en el plasma que se una a la insulina cuando ésta ya ha sido liberada y en el plasma viaje unida a la hormona.

En condiciones normales dicha proteína se produciría en niveles basales, pero en condiciones de hiperinsulinemia constante, como la que se observa en la resistencia a la insulina, habría una sobreproducción de la proteína y la insulina quedaría “secuestrada” y no podría llevar a cabo sus efectos, contribuyendo así a aumentar la resistencia.

El hígado es un órgano productor de proteínas y además recibe directamente, a través del sistema portal, el total de la secreción de insulina producida en el páncreas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que este órgano, sintetice y libere al plasma una proteína que se una a la insulina, y de esta manera regule su acción sobre los tejidos periféricos, en particular, músculo y tejido adiposo.

Por otra parte, sabemos que la obesidad está directamente relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina y que los adipocitos son células capaces de producir y secretar proteínas como las adipocinas. Esto nos permite

pensar que también es posible que los adipocitos produzcan una proteína que se una a la insulina.

Existen algunos estudios en los cuales se ha observado la presencia de un receptor de insulina en el medio de cultivo de líneas celulares (Berhanu y Olefsky, 1982; Whittaker y Okamoto, 1988; Papa *et al.*, 1993) y en el plasma sanguíneo de humanos (Pezzino *et al.*, 1992), pero no se conoce el significado fisiológico de dichos descubrimientos. Sin embargo, es relevante notar que ya se ha observado un receptor soluble de insulina.

En 1982, Berhanu y Olefsky marcaron con insulina radioactiva el receptor de insulina presente en linfocitos IM-9 de humano y demostraron que del medio de cultivo de dichas células se puede recuperar una proteína marcada que, en condiciones reductoras, tiene un peso aproximado de 125 kDa y que dicha proteína se libera al medio de cultivo en función del tiempo (Bernahu y Olefsky, 1982). Esta es una de las primeras evidencias de que el receptor de insulina o una parte de éste pueden librarse al medio. Más adelante Wittaker y Okamoto reportaron que las células de ratón de la línea NIH3T3 que son transfectadas con una forma reducida del receptor de insulina, que no incluye las regiones transmembranal ni citoplásmica, pueden secretar al medio de cultivo una forma soluble de dicho receptor que conserva sus características estructurales y funcionales ya que puede formar estructuras heterotetraméricas similares a las del receptor de insulina presente en la membrana y también es capaz de unirse a la insulina (Whittaker y Okamoto, 1988). Además, en 1993, Papa y colaboradores reportaron que tres líneas celulares de humano, IM-9, MCF-7 y Hep-G2 y una de ratón, 3T3, transfectadas con el receptor de insulina humano, liberan al medio de cultivo una forma intacta y funcional del receptor de insulina. En este estudio se caracteriza detalladamente el receptor encontrado en el medio de cultivo de las

células IM-9 y se observa que la forma secretada de dicho receptor tiene características estructurales y funcionales muy similares a las del receptor de insulina purificado de la membrana de estas mismas células. Ambos tienen una afinidad de unión con la insulina muy similar y tanto en el medio de cultivo como en la membrana se presentan en forma de una estructura tetramérica con un peso aproximado de 400 kDa que en condiciones reductoras se separa en subunidades  $\alpha$  con un peso aproximado de 130 kDa y subunidades  $\beta$  de aproximadamente 95 kDa (Papa *et al.*, 1993).

Por otro lado, existe un reporte de la presencia de una forma soluble del receptor de insulina en el plasma sanguíneo de humanos. Dicho receptor fue aislado del plasma de dos individuos sanos por medio de cromatografía y se identificó con un radioinmunoensayo (RIA, *radioimmunoassay*) específico para el receptor de insulina. Al caracterizarlo se observó que este receptor es capaz de unir insulina marcada radioactivamente, [<sup>125</sup>I]insulina, y que, al separarlo por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, forma una banda de 135 kDa, que corresponde al peso de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina, así como otras bandas con pesos que van de los 80 a los 50 kDa aproximadamente (Pezzino *et al.*, 1992).

Además existen reportes interesantes que relacionan la expresión de un receptor soluble de la insulina en el plasma sanguíneo con un efecto sobre la regulación del metabolismo de la glucosa. El primero de estos estudios se llevó a cabo en un ratón transgénico que expresa un derivado soluble del ectodominio del receptor de insulina. Este derivado del receptor se acumula en el plasma del ratón y se une a la insulina con alta afinidad, de modo que una porción importante de la insulina total presente en el plasma está unida a esta porción soluble del receptor. En este ratón se observan alteraciones importantes en la homeostasis de la glucosa que incluyen una hiperglucemia y

un incremento en la producción hepática de glucosa, además de hiperinsulinemia (Schaefer *et al.*, 1994). En el segundo, la inyección de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina en ratones provoca una hiperglucemia muy marcada, lo cual muestra que la presencia de la subunidad  $\alpha$  en forma soluble en el plasma de los animales puede unirse a la insulina e inhibir sus acciones en el mantenimiento de la normoglucemia (Kanezaki *et al.*, 2003).

Todo lo anterior nos lleva a pensar en la posibilidad de que una de las proteínas secretadas, ya sea por el hígado o por el tejido adiposo, pudiera ser una forma soluble del receptor de insulina. Si esta forma soluble del receptor se liberara en respuesta a una elevación de insulina, es posible que, además de tener una función amortiguadora de los efectos de la insulina, pudiera participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina, ya que al haber un mal funcionamiento y una hiperinsulinemia constante, el receptor se estaría produciendo en forma excesiva y no permitiría que la insulina llegara a sus tejidos blanco y llevara a cabo sus efectos.

## **HIPÓTESIS**

El hígado y el tejido adiposo producen proteínas que podrían unirse a la insulina y regular su acción. Una de estas proteínas podría ser una forma soluble del receptor de insulina.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo es explorar si los hepatocitos y los adipocitos en cultivo pueden producir y liberar al medio extracelular proteínas que se unan a la insulina. Una de estas proteínas podría ser una forma soluble del receptor de insulina.

### **Objetivos específicos**

- Analizar el medio de cultivo de los hepatocitos y buscar en él una forma soluble del receptor de insulina.
- Analizar el medio de cultivo de las células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos (usadas como modelo de células adiposas) y buscar en él una forma soluble del receptor de insulina.
- Analizar la relación entre los niveles de insulina en el medio y los niveles del receptor soluble en el medio de cultivo de hepatocitos y adipocitos 3T3-L1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diferenciación de células 3T3-L1

Para analizar las proteínas que los adipocitos podrían estar secretando al medio de cultivo y ahí unirse a la insulina se utilizaron células de ratón 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos, como modelo de células adiposas.

Las células 3T3-L1 son células de una línea celular de fibroblastos de ratón que tienen la capacidad de diferenciarse en células parecidas a adipocitos de manera espontánea si permanecen varios días en un cultivo confluyente (Green y Kehinde, 1974 citados en Rubin *et al.*, 1978). El tratamiento de las 3T3-L1 con insulina, 1-metil-3-isobutilxantina y dexametasona acelera la diferenciación (Rubin *et al.*, 1978).

Para lograr la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Las células 3T3-L1 se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) con glucosa baja (5.6 mM), adicionado con un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina-estreptomicina (DMEMc). Se mantuvieron en una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37 °C, hasta que alcanzaron confluencia.
- Dos días post-confluencia se inició la diferenciación. Para inducirla se adicionó al medio de cultivo dexametasona en una concentración de 0.25 µM, 0.5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina e insulina en una concentración de 4 µg/ml.

- Transcurridos dos días se retiró el medio de diferenciación y se agregó medio de cultivo con insulina en una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , en el cual permanecieron durante otros dos días.

Al concluir los cuatro días de tratamiento las transformaciones morfológicas en las células fueron muy evidentes (cambio de una forma alargada de los fibroblastos 3T3-L1 a una mucho más circular de los adipocitos y una acumulación de gránulos de grasa en el citoplasma de las células diferenciadas). Estas células diferenciadas se utilizaron para los experimentos posteriores.

### **Cultivo y tratamiento de adipocitos 3T3-L1**

Las células diferenciadas fueron tratadas con distintas concentraciones de insulina y glucosa para lo cual se llevó a cabo el protocolo que sigue:

- Los adipocitos se sembraron en cajas de cultivo de 12 pozos con una densidad de 250,000 células por pozo, en DMEMc con 5  $\mu\text{g/ml}$  (0.85 nM) de insulina, donde permanecieron 24 horas antes de iniciar el tratamiento con concentraciones mayores de insulina.
- Al día siguiente se retiró el medio con 5  $\mu\text{g/ml}$  (0.85 nM) de insulina y las células cultivadas en DMEM sin suero bovino fetal y con 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Se trataron con 0, 1.7, 4.25 y 8.5 nM de insulina.
- El medio de cultivo de las células con los diferentes tratamientos se recuperó a las 48 y 96 horas en cultivo.

- Los medios recuperados se centrifugaron para eliminar detritos celulares o células que pudieran estar flotando y se conservaron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

En una segunda etapa experimental, los adipocitos se cultivaron del mismo modo pero se modificaron las concentraciones de glucosa en el medio, de manera que además de los cuatro grupos iniciales, otro grupo de células se trató con 15.6 mM de glucosa. En todos los casos, los medios fueron recuperados a las 48 y 96 horas de cultivo, centrifugados y conservados a  $-70$  grados centígrados.

### **Inmunocitoquímica de adipocitos 3T3-L1**

Los adipocitos 3T3-L1 ya diferenciados fueron levantados de la caja de cultivo con una solución dispersante sin calcio y sembrados en vidrios previamente tratados con poli-l-lisina para promover su anclaje.

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 hora y después se lavaron con PBS 0.1 M tres veces durante 5 min y tres veces más con TBS 0.1 M. Se incubaron con un anticuerpo policlonal levantado en conejo dirigido contra la subunidad alfa del receptor de insulina (Sta. Cruz; sc-710), diluido en TBS 0.1 M con 1% de suero normal de cabra (SNC), en una concentración de 1:100, durante 48 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después las células fueron lavadas con TBS 0.1 M con 1% suero normal de cabra (SNC) durante 10 min y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a FITC levantado en cabra contra IgG de conejo (Jackson; 111-095), diluido en TBS 0.1 M con 1% SNC, en una concentración de 1:100. La incubación con el anticuerpo secundario duró 1 hora, se hizo a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Pasada la hora de incubación con el anticuerpo secundario, las células se lavaron con TBS 0.1 M tres veces durante 5 min y después se montaron en portaobjetos con medio de montaje (Dako Cytomation).

Se obtuvieron imágenes de las células en el microscopio confocal, con longitudes de onda de excitación a 488 nm y de emisión a 522 nm.

### **Cultivo y tratamiento de hepatocitos de rata**

El aislamiento de los hepatocitos se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Marina Macías, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- El hígado de una rata Wistar macho adulto de aproximadamente 250 g, se perfundió con Krebs-Ringer sin calcio (amortiguado con bicarbonato de sodio a pH de 7.35-7.4 y gaseado con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>), para remover la sangre.
- Enseguida, se perfunde de 2 a 3 min con Krebs-Ringer + CaCl<sub>2</sub>.
- Transcurridos los tres minutos, el hígado se perfundió con Krebs-Ringer + CaCl<sub>2</sub> + 20 mg de Colagenasa durante aproximadamente 20 min, recirculando.
- El hígado digerido se colocó en una caja de petri de plástico y las células se rasparon con la parte posterior de una micropunta de una pipeta 1 ml.
- Las células se filtraron con tela de tul y se colocaron en un tubo cónico de 50 ml. Se añadió Krebs-Ringer + CaCl<sub>2</sub> hasta tener un volumen de 45 ml. Se tapó el tubo y se agitó suavemente.

- Se centrifugó a 400 rpm durante 2 min y luego se removió el sobrenadante y las células se lavaron de dos a tres veces más con el mismo buffer, hasta recuperar un sobrenadante de color claro.
- Se tomó una alícuota del medio con células en suspensión para cuantificar la viabilidad con azul tripano (cuando la viabilidad era mayor al 75% se seguía con el cultivo, si no era así las células se desechaban y se iniciaba un cultivo nuevo).
- En condiciones de esterilidad, las células se lavaron dos veces más con PBS+Antibióticos (50 µg/ml de gentamicina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 4 µg/ml de trimetropim y 20 µg/ml de sulfametaxol) a 400 rpm, durante dos minutos.
- Después de los lavados, las células se resuspendieron en PBS + Percoll en una proporción 1:1 y se mezclaron por inversión. Se centrifugó 5 min a 800 rpm. El lavado con Percoll se da para retirar las células muertas que pudieran estar presentes en el sedimento.
- Se retiró el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en medio de *anclaje* a temperatura ambiente.
- Se tomó una pequeña alícuota de 50 a 100 µl de células, se añadió una cantidad igual de azul de tripano y se contaron las células en un hemocitómetro.
- Las células se sembraron en cajas de plástico de 100 mm cubiertas con colágena tipo I y estériles, en una densidad de  $2.5 \cdot 10^5$  células/ml.
- Las células se dejaron en medio de *anclaje* durante 3 a 4 horas para que se pegaran al fondo de la caja y luego poder cambiarles el medio.

El **medio de *anclaje*** se preparó de la siguiente manera: en un litro de medio DMEM de baja glucosa (5.6 mM) con 10 % de suero bovino fetal, se agregaron 200µg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 3·mM de Hepes, 1mM de piruvato de sodio, 510 µg/ml de bicarbonato de sodio, 1mg/ml de galactosa, 30 µg/ml de prolina, 4mM de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 250 ng/ml de fungizona, 4µg/ml de trimetropim y 20 µg/ml de sulfametaxol , ITS (Insulina Transferrina Selenito: 10 ng/ml de insulina, 5.5 ng/ml de transferrina, 6.7 pg/ml de selenito de sodio).

En el laboratorio, los hepatocitos ya aislados y adheridos a la caja de cultivo se trataron de la siguiente manera:

- Se retiró el medio de *anclaje* y se agregó medio de *alimentación*, que se preparó igual que el de *anclaje* pero sin suero bovino fetal. El medio que se utilizó, en lugar de ITS se preparó con las cantidades equivalentes de transferrina y selenito de sodio contenidas en 10 ml de ITS (0.55 g/l y 0.67 mg/l, respectivamente) y sin insulina, para poder controlar la concentración de insulina en el medio de manera más precisa durante el tratamiento de las células. Además, se agregó glucosa para tener una concentración final de 10.6 mM.
- Las células fueron divididas en grupos y a cada grupo se le cultivó con medio de *alimentación* con las siguientes concentraciones de insulina y glucosa: en una primera etapa experimental se utilizaron con 5.6 mM de 0, 1.7, 3.4 y 8.5 nM de insulina y 5.6 mM de glucosa, y en una segunda etapa 0 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM y 1nM de insulina y 10.6 mM de glucosa.

- Los hepatocitos se mantuvieron en cultivo con los diferentes tratamientos y se recuperó el medio de cultivo a las 48 y 96 horas.
- Tanto el medio recuperado a las 48 horas como el de 96 horas se centrifugaron durante 10 min a 1, 500 rpm para eliminar detritos celulares o células que pudieran estar flotando en él. Se recuperó el sobrenadante y se conservó en congelación a -70 °C.

### **Electroforesis e inmunotransferencia tipo Western blot**

Los medios de cultivo recuperados tanto de los adipocitos 3T3-L1 como de los hepatocitos se descongelaron y concentraron por ultrafiltración utilizando microconos con un punto de corte de 3 kDa (Millipore). Se recuperó 50 % del volumen inicial.

El contenido de proteína total presente en el medio concentrado se cuantificó utilizando el método de Bradford con un kit de BioRad.

Las proteínas contenidas en los medios concentrados fueron separadas por medio de una electroforesis en un gel nativo de acrilamida-bisacrilamida (Ornstein-Davis) con un gradiente de concentración de acrilamida de 5 a 20 % (como se describe en el diseño experimental) y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF.

La membrana se bloqueó 1 hora a 37 °C con leche descremada al 2.5 %, preparada en TBS con 0.1 % de Tween (TBS-T).

Transcurrida la hora del bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal levantado en conejo dirigido contra los primeros 20 aminoácidos de la región amino terminal de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina (Sta. Cruz; sc-710, concentración 1:200), con un anticuerpo policlonal levantado en conejo dirigido contra los aminoácidos

941-1010 de la subunidad beta del receptor de insulina (Sta. Cruz; sc-20739, concentración 1:200) o con un anticuerpo levantado en cobayo contra insulina (ICN; 651041, concentración 1:5000). Los anticuerpos se diluyeron en leche descremada al 2.5 % preparada en TBS-T.

Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-T, tres veces durante 15 minutos y luego se pusieron a incubar durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo secundario. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anticuerpo conjugado con peroxidasa HRP levantado en cabra contra IgG de conejo (Sta Cruz; sc-2004, dilución 1:5,000) o un anticuerpo conjugado con peroxidasa HRP levantado en conejo contra IgG de cobayo (Zymed; 61-4620, dilución 1:3,000). Ambos anticuerpos se diluyeron en leche descremada al 2.5 % preparada en TBS-T.

Las membranas se lavaron con TBS-T (tres veces durante 15 minutos) y con TBS (dos veces durante 5 min) y las proteínas se detectaron utilizando el sistema de ECL plus (Amersham).

### **Cuantificación de bandas del receptor de insulina en la inmunotransferencia (Western blot)**

El área y la intensidad de las bandas fueron analizadas con el programa Image J (Wayne Rasband; Nacional Institute of Health, USA) . Los valores de intensidad y área se normalizaron con respecto al control (medio condicionado de las células sin insulina) tomado como el 100% de expresión.

## **Análisis estadístico**

Los porcentajes de área e intensidad de la banda se analizaron en el programa Stat View 4.57 (Abacus Concepts, Cary, NC) y se hizo una ANOVA factorial con una prueba de Fisher para obtener el significado estadístico.

## **Diseño experimental**

Para analizar los medios de cultivo tanto de los hepatocitos como de los adipocitos 3T3-L1 y analizar las proteínas presentes en ellos se llevó a cabo el siguiente diseño experimental.

En primer lugar se separaron las proteínas en geles nativos de acrilamida, utilizando un sistema de buffer discontinuo (PAGE nativo discontinuo, Ornstein-Davis), es decir que el gel está dividido en dos regiones principales, la región concentradora y la región separadora.

Se decidió utilizar un gel nativo pues en la preparación de este tipo de geles no se utilizan agentes desnaturizantes y además se utilizó un *buffer* de carga sin SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) ni mercaptoetanol, que son los agentes desnaturizantes que suelen utilizarse en la separación de proteínas por SDS-PAGE. El *buffer* de corrida que se utilizó fue el de tris-glicina y también se preparó sin SDS. De este modo se buscó que las posibles uniones de las proteínas presentes en el medio con la insulina se conservaran.

Después de varias pruebas, se decidió utilizar en la región separadora un gel en gradiente de 5 a 20 % de concentración de la acrilamida, de manera que la insulina libre, que es una proteína de peso molecular bajo, quedara dentro del gel en la región de mayor concentración y las proteínas de pesos moleculares más altos pudieran entrar al gel y separarse en la región menos concentrada.

Posteriormente se realizó una inmunotransferencia de tipo western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la insulina, para localizar las bandas positivas a la insulina y después poder analizarlas con más detalle. Suponiendo que en el medio de cultivo de las células existieran proteínas capaces de unirse a la insulina, al revelar la inmunotransferencia se esperaría encontrar una banda de bajo peso molecular (alrededor de 6kDa) que correspondería a la insulina libre agregada al medio pero además podrían aparecer bandas con pesos moleculares mayores que corresponderían a la insulina unida con otras proteínas del medio.

En una primera etapa experimental, tanto los hepatocitos como los adipocitos fueron cultivados con 5.6 mM de glucosa y 0, 1.7, 3.4 y 8.5 nM de insulina. Más adelante, a los adipocitos también se les trató con 15.6 mM de glucosa en el medio, para reproducir las condiciones que se presentan durante la resistencia a la insulina, es decir, hiperglucemia e hiperinsulinemia.

En una segunda etapa experimental, al no haber resultados positivos con los adipocitos, los análisis se llevaron a cabo solamente con los medios de cultivo de los hepatocitos. Además, las células se trataron con 0 pM, 50 pM, 100 pM, 500 pM y 1nM de insulina y 10.6 mM de glucosa, ya que estas concentraciones de insulina son más cercanas a los niveles fisiológicos y a los que pueden encontrarse en un estado de hiperinsulinemia (Song *et al.*, 2000).

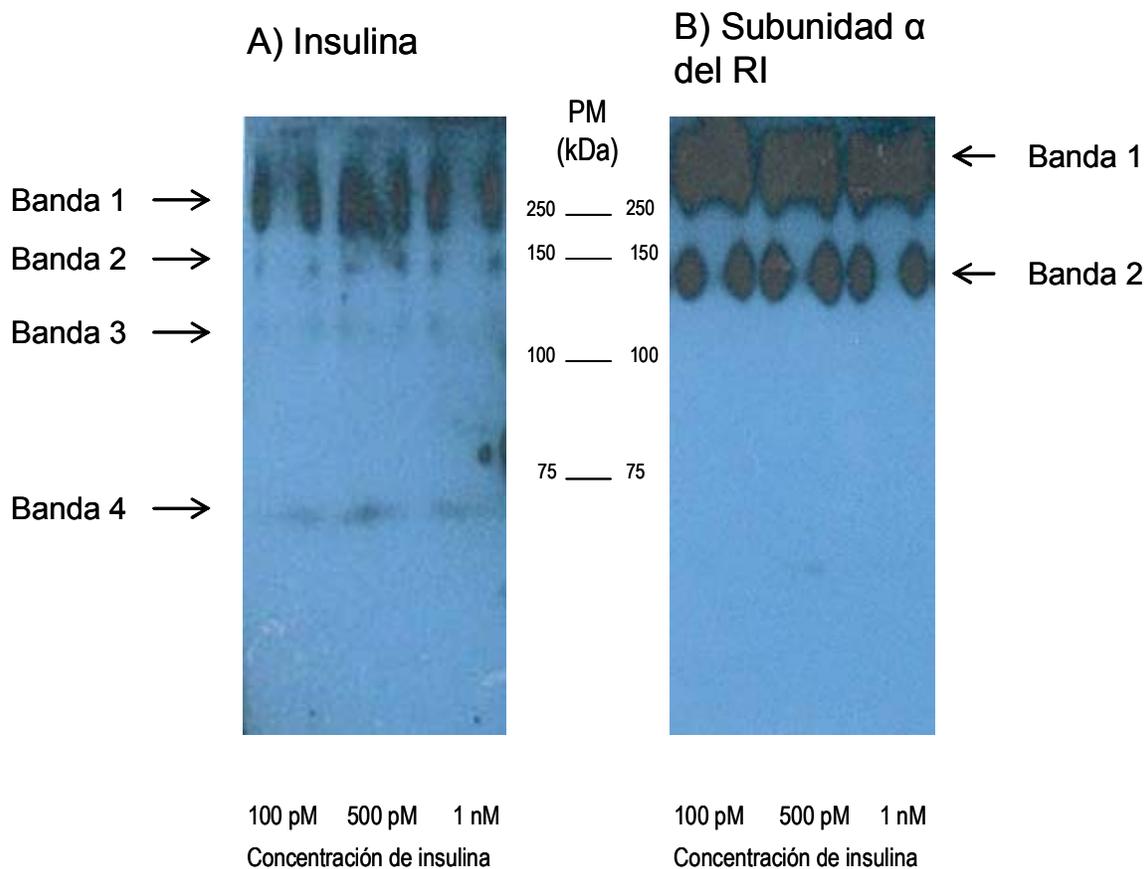
## RESULTADOS

### 1. Detección de proteínas que se unen a la insulina en el medio de cultivo de hepatocitos

Al revelar la inmunotransferencia del medio de cultivo de los hepatocitos con el anticuerpo dirigido contra insulina, además de encontrar una banda en un peso molecular bajo, correspondiente a la insulina presente en el medio, se observaron otras bandas de pesos moleculares más altos (entre 60 y 250 kDa), que son las que podrían corresponder a proteínas unidas a la insulina.

En la figura 4A se muestra una inmunotransferencia del medio de cultivo de los hepatocitos, llevada a cabo con un anticuerpo dirigido contra la insulina. En la imagen pueden observarse, en la parte superior, una banda gruesa intensa (con un peso de alrededor de 250 kDa), dos más pequeñas enseguida de ésta (con pesos de entre 150 y 100 kDa) y, hacia la mitad del gel, una cuarta banda (con un peso aproximado de 60 kDa).

Sabiendo que la insulina se une a la parte externa del receptor, entre las dos subunidades alfa, se decidió probar si una de las bandas podría corresponder a la subunidad alfa del receptor de insulina. Como puede apreciarse en la figura 4B, cuando se llevó a cabo la inmunotransferencia del medio de cultivo de los hepatocitos con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina, aparecieron dos bandas de alto peso molecular en posiciones muy similares a las que aparecen en la figura 4A, lo que permite pensar que parte de la insulina que se agrega al medio de cultivo puede unirse a estas proteínas de alto peso molecular. Dichas proteínas podrían ser formas solubles del receptor de insulina ya que son reconocidas por un anticuerpo dirigido contra dicho receptor.



**Figura 4. Presencia de la insulina y de la subunidad alfa del receptor de insulina en el medio de cultivo de hepatocitos.** Se muestra una inmunotransferencia representativa del medio de cultivo de hepatocitos colectado a las 96 horas de cultivo y tratados con 100 pM, 500 pM y 1 nM de insulina en el medio. En **A** se muestra la inmunotransferencia hecha con un anticuerpo que reconoce insulina y se indican las cuatro bandas que se forman mientras que en **B** la inmunotransferencia se hizo con un anticuerpo que reconoce la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina y se indican con flechas las dos bandas presentes.

Al llevar a cabo la separación de las proteínas del medio de cultivo de hepatocitos y reconocerlas por medio de una inmunotransferencia con el anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina, se observó, en cuatro experimentos independientes, que la banda 1 aparece en todos los casos, pero la banda 2 apareció solamente en uno de los experimentos. Por lo

tanto, los análisis siguientes se enfocaron en la banda de mayor peso molecular (alrededor de 250 kDa), pues la banda 2 puede ser una proteína que el anticuerpo reconoce por una reacción inespecífica.

## **2. Células 3T3-L1 como modelo de adipocitos y análisis del medio de cultivo de las células diferenciadas**

Contrario a lo observado en los hepatocitos, al analizar el medio de cultivo de los adipocitos 3T3-L1 y llevar a cabo la inmunotransferencia con el anticuerpo dirigido contra la insulina solamente se formó una banda de bajo peso molecular que corresponde a la insulina presente en el medio, pero no se formó ninguna banda de mayor peso molecular que pudiera indicar la presencia en el medio de cultivo de proteínas unidas a la insulina.

Por otro lado, al realizar el western blot de estos mismos medios de cultivo con el anticuerpo que reconoce la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina tampoco se observó señal positiva en ninguno de los casos, ni en la primera etapa experimental, ni durante la segunda en la que los adipocitos se trataron con concentraciones altas de glucosa (15.6 mM) e insulina (8.5 nM).

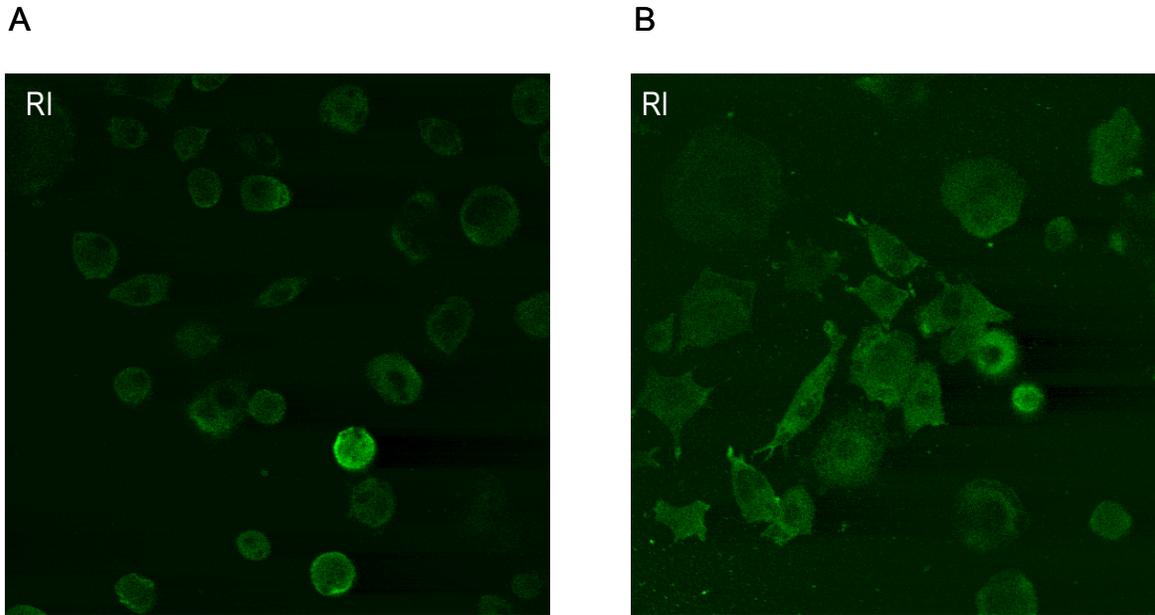
Para asegurarnos de que este resultado negativo no se debiera a que el receptor de insulina de los adipocitos 3T3-L1 no estuviera siendo reconocido por el anticuerpo utilizado para hacer la inmunotransferencia se llevaron a cabo inmunocitoquímicas de los adipocitos 3T3-L1 al concluir el proceso de diferenciación utilizando el mismo anticuerpo.

Como puede observarse en la figura 5, el receptor de insulina de la membrana de los adipocitos fue reconocido en todas las células. En la figura 5A puede observarse que en algunas células la señal del anticuerpo fue más

intensa por lo que es probable pensar que existe una diferencia en el número de receptores presentes en la membrana de las distintas células. También puede notarse, tanto en 5A como en 5B, que las células 3T3-L1 presentaron una heterogeneidad de formas y tamaños, aún después de completar el tratamiento para inducir su diferenciación.

Al concluir el protocolo de diferenciación la mayoría de las células presentaron cambios morfológicos muy evidentes. En primer lugar se observó un cambio de forma alargada de los fibroblastos a una forma circular de los adipocitos diferenciados. Además, se produjo una acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma de las células. Sin embargo, un porcentaje pequeño de las células permaneció con características de fibroblastos a una morfología intermedia entre fibroblasto y adipocito. En la figura 5B se muestra una imagen representativa de un conjunto de células que no alcanzaron a diferenciarse por completo.

Los resultados de las inmunocitoquímicas nos permitieron concluir que los adipocitos 3T3-L1 sí expresan el receptor de insulina en su membrana pero no parecen liberarlo al medio de cultivo, ni en condiciones control, ni en presencia de insulina.



**Figura 5. Presencia del receptor de insulina en adipocitos 3T3-L1.** En la imagen **A** se muestra un conjunto de células con una morfología representativa de adipocitos 3T3-L1 diferenciados y en la imagen **B** hay un grupo de células con morfologías intermedias entre fibroblasto y adipocito. Ambas inmunocitoquímicas se llevaron a cabo utilizando un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina.

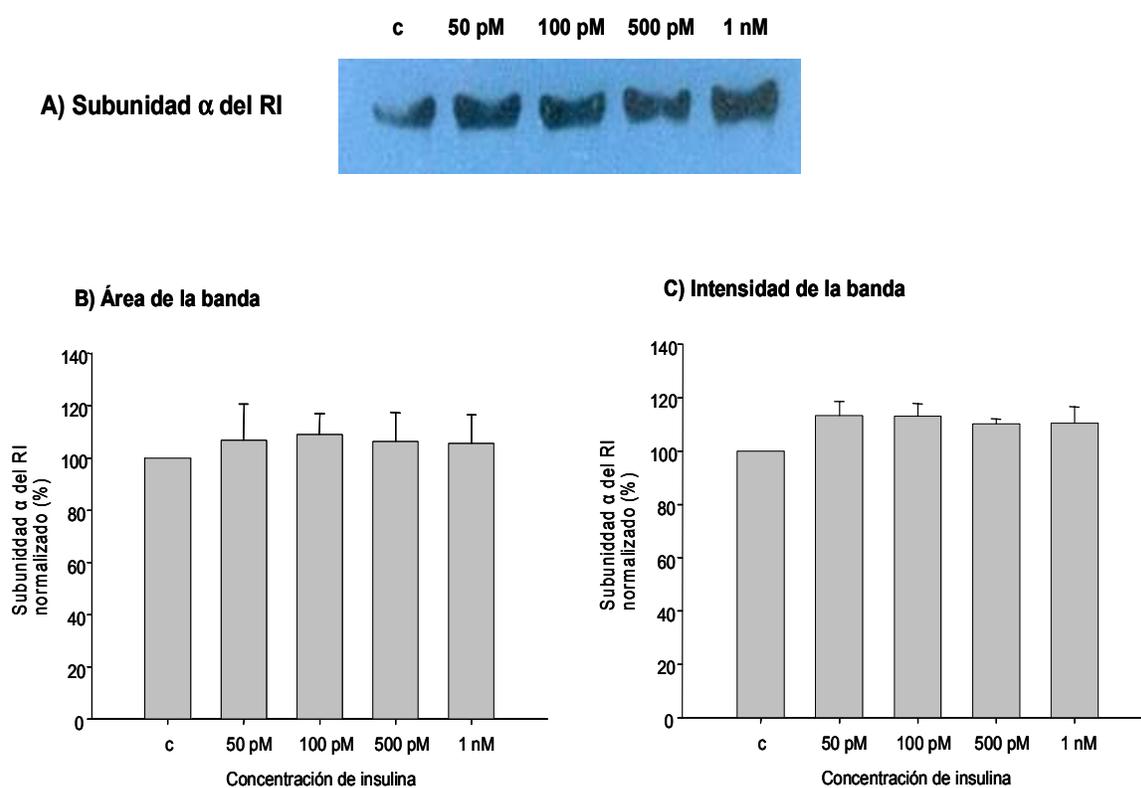
### **3. Análisis del receptor soluble de insulina en el medio de cultivo de los hepatocitos**

Debido a que en el medio de cultivo de los adipocitos 3T3-L1 no se observó la presencia de proteínas reconocidas por el anticuerpo dirigido contra el receptor de insulina, los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando solamente el medio de cultivo de los hepatocitos y analizando con particular atención la banda con un peso molecular cercano a los 250 kDa, que es la que creemos que podría ser una forma soluble del receptor de insulina.

Se analizó la aparición de dicha banda en los medios de cultivo colectados a las 48 y 96 horas de cultivo y se observó su relación con la concentración de insulina con la fueron tratados los hepatocitos.

### 3.1 El receptor soluble en el medio de cultivo de 48 horas

En la figura 6A puede observarse una inmunotransferencia representativa de cuatro experimentos independientes llevados a cabo con medios colectados a las 48 horas de cultivo. Puede apreciarse que la banda que corresponde a la forma soluble del receptor de insulina apareció en el medio cultivo de las células tratadas con las cuatro concentraciones de insulina e incluso estuvo presente en el medio de cultivo de las células control que no fueron tratadas con insulina. Sin embargo, el tamaño y la intensidad de la banda no son diferentes en los medios de las células de los distintos tratamientos con se observó insulina, como puede apreciarse en las gráficas B y C de la figura 6.



**Figura 6. Efecto de la concentración de insulina sobre la presencia de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina en el medio de cultivo de los hepatocitos colectado a las 48 horas.** En A) se muestra un western blot representativo de la banda reconocida con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina. En las gráficas se muestran en B) el tamaño y en C) la intensidad de la banda representados en forma de porcentaje, considerando al control como 100%; n=4.

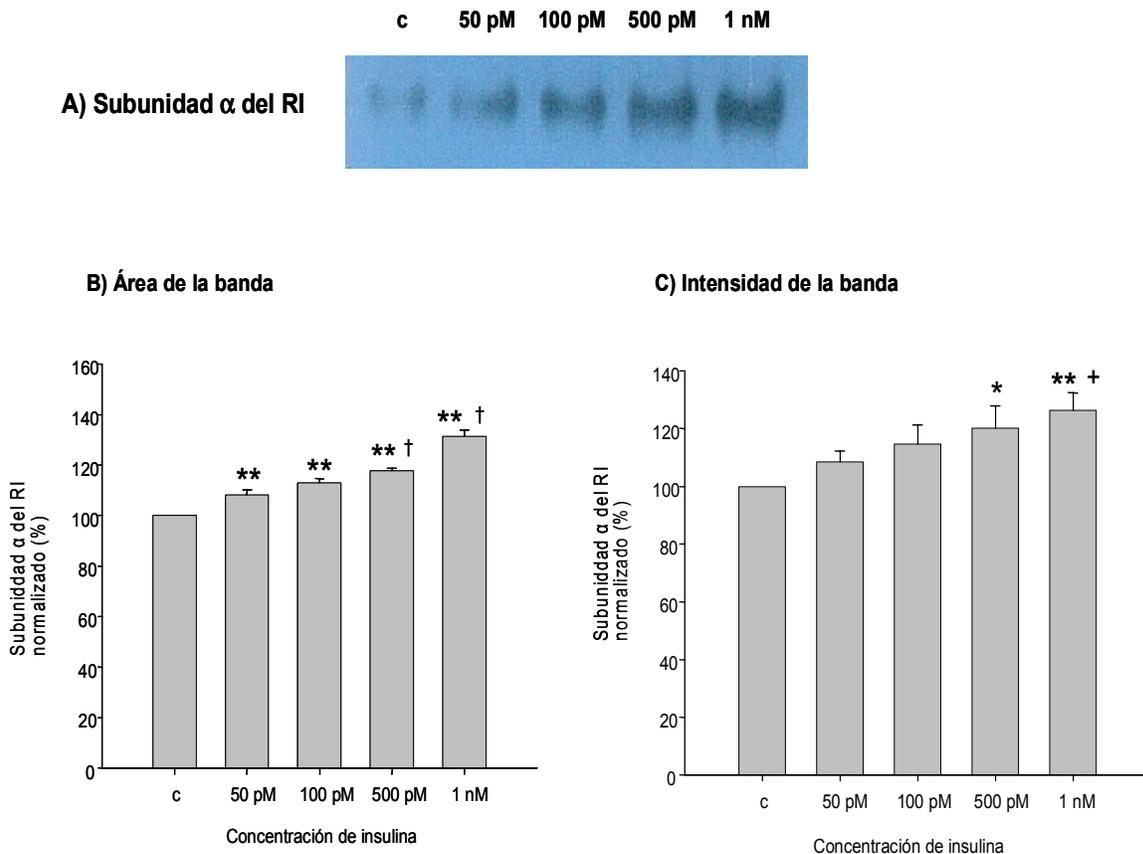
### **3.2 El receptor soluble en el medio de cultivo de 96 horas**

Al analizar el medio de cultivo recolectado después de que las células permanecieron 96 horas en cultivo, en presencia de las diferentes concentraciones de insulina, se observó que, al igual que en los medios recolectados a las 48 horas, la banda que corresponde a la subunidad alfa del receptor de insulina aparece en todos los casos, aún en el medio de las células control, que fueron cultivadas sin insulina en el medio.

Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en los medios colectados a las 48 horas, en los medios de 96 horas se observó que dicha banda aumenta de tamaño dependiendo de la cantidad de insulina con la que hayan sido tratadas las células. Dicho aumento puede observarse en la figura 7A donde se muestra una inmunotransferencia representativa de tres experimentos independientes.

Al analizar con más detalle las bandas pudo observarse que el incremento del tamaño de la banda es significativo en todos los tratamientos con respecto al control, como está representado en la gráfica B de la figura 7. La intensidad de la banda también aumenta pero dicho aumento solamente es significativo, con respecto a las células control, cuando se trata a los hepatocitos con 500 pM y 1 nM de insulina, como se muestra en la gráfica C de la misma figura.

Por otra parte se analizó la posible presencia de la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina en el medio de cultivo de los hepatocitos. Para lograrlo también se llevaron a cabo inmunotransferencias de tipo western blot pero se utilizó un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\beta$  de dicho receptor. Sin embargo, los resultados fueron negativos.



**Figura 7. Efecto de la concentración de insulina sobre la presencia de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina en el medio de cultivo de los hepatocitos colectado a las 96 horas.** En A) se muestra un western blot representativo de la banda reconocida con un anticuerpo dirigido contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina en la que puede apreciarse el incremento de la subunidad  $\alpha$  del receptor de insulina dependiente de la concentración de insulina en el medio. En las gráficas se muestran en B) el tamaño y en C) la intensidad de la banda representados en forma de porcentaje, considerando al control como 100%. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  con respecto al control; + $p < 0.05$ , † $p < 0.01$  con respecto al tratamiento con 50 pM de insulina;  $n = 3$ .

Los resultados de los análisis de los medios de cultivo nos permitieron concluir que los hepatocitos liberan al medio de cultivo una proteína que es reconocida por un anticuerpo específico para la subunidad alfa del receptor de insulina, pero no por un anticuerpo que reconoce la subunidad alfa de dicho receptor. Dicha proteína se libera al medio aún en ausencia de insulina, por lo que podemos decir que su liberación es constitutiva.

## DISCUSIÓN

La observación principal de esta tesis es que los hepatocitos producen y secretan al medio una proteína que podría ser la subunidad alfa del receptor de insulina, ya que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra dicha subunidad.

Como se detalló en el planteamiento del problema, en la literatura se pueden encontrar algunos reportes de la existencia de diferentes formas solubles del receptor de insulina en el medio de cultivo de líneas celulares transfectadas o no con dicho receptor. Sin embargo, en la literatura no existen reportes de la presencia del receptor de insulina en el medio de cultivo de células en cultivo primario y no se propone una función para las formas solubles que hasta ahora han sido encontradas.

En este trabajo nosotros encontramos que una proteína, que es reconocida por un anticuerpo específico contra la subunidad alfa del receptor de insulina, se libera al medio de cultivo de los hepatocitos de rata en cultivo primario. Aunque en ninguno de nuestros análisis encontramos una señal positiva para la subunidad beta del receptor de insulina, no podemos descartar la posibilidad de que una fracción de dicha subunidad también se libere al medio. El anticuerpo que utilizamos para reconocer la subunidad beta está dirigido contra una región que abarca los aminoácidos 941-1010 del receptor de insulina humano (equivalentes a los aminoácidos 942-1008 del receptor de rata) y dichos aminoácidos se encuentran en su mayoría en la región transmembranal e intracelular de la subunidad beta, por lo que, si la región de la subunidad beta del receptor que se libera al medio está en la parte extracelular del receptor (aminoácidos 764-957), puede no ser reconocida por

nuestro anticuerpo. Para descartar esta posibilidad, sería necesario hacer pruebas con un anticuerpo dirigido específicamente contra la región extracelular de la subunidad beta del receptor de insulina.

La proteína presente en el medio de cultivo de los hepatocitos que llamamos receptor soluble, apareció siempre en el western blot con un peso de 250 kDa o un poco superior, el cual es el doble del peso de la subunidad alfa de entre 125 y 130 kDa. Sin embargo, debido a que siempre separamos las proteínas en geles nativos, existe la posibilidad de que la subunidad alfa se esté liberando en forma de un homodímero, que es la forma en que se encuentra en el receptor cuando está asociado a la membrana celular, y que la unión entre las dos subunidades alfa se conserve debido a la ausencia de agentes desnaturizantes durante la electroforesis. Además, si como suponemos la proteína que llamamos receptor soluble es capaz de unir insulina, en un gel nativo esta unión se mantendría modificando la migración de la proteína.

El resultado más interesante que observamos al analizar el medio de cultivo de los hepatocitos es que, además de que en todos los casos la proteína que llamamos receptor soluble estuvo presente, su presencia en el medio de cultivo colectado a las 96 horas, aumentó dependiendo de la concentración de insulina. Aún en ausencia de insulina dicha proteína está presente en el medio de cultivo de los hepatocitos, lo cual permite suponer que en condiciones basales los hepatocitos pueden estar liberando al medio una región del receptor de insulina. Sin embargo, el hecho de que a una mayor concentración de insulina, la presencia de la proteína sea mayor en el medio, apoya la idea de que la liberación del receptor soluble al medio extracelular depende de la concentración de insulina en el mismo. Observaciones similares han sido

descritas anteriormente por Berhanu y Olefsky en 1982, quienes observaron que en los linfocitos IM-9 la presencia de una forma soluble del receptor de insulina aumenta en el medio de cultivo de células luego de que son tratadas durante 16 horas con una concentración de 1  $\mu$ M de insulina.

En esta tesis, el efecto de la insulina sobre la liberación al medio del receptor soluble no se apreció a las 48 horas sino solamente a las 96 horas, lo cual sugiere que la liberación de esta proteína no es sólo dependiente de la concentración de insulina sino también del tiempo de exposición a niveles altos de la hormona.

En el medio de cultivo recuperado de las células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos no pudimos observar la presencia de la proteína reconocida por el anticuerpo dirigido contra la subunidad alfa del receptor de insulina. Sin embargo debido a que utilizamos una línea celular diferenciada y no un cultivo primario de adipocitos no podemos descartar la posibilidad de que los adipocitos en cultivo sí liberen al medio una fracción del receptor de insulina.

Sin embargo, aún cuando los adipocitos no produzcan formas solubles del receptor de insulina pueden participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina de otras maneras, como mediante la producción excesiva de ácidos grasos y de adipocinas que pueden alterar la sensibilidad a la insulina en tejidos como el músculo.

Para poder estar seguros de que la proteína que recuperamos del medio de cultivo de los hepatocitos, y que llamamos receptor soluble, es efectivamente una forma soluble del receptor de insulina es necesario hacer una caracterización más detallada de dicha proteína.

En primer lugar se podría caracterizar la migración de la proteína en un sistema de *SDS-PAGE* para observar el comportamiento de la misma en

presencia de agentes desnaturizantes y comprobar si la proteína se encuentra en forma de un homodímero de subunidades alfa. Si la proteína está en forma de dímero, al desnaturizarse en presencia del SDS, la unión entre monómeros se perdería y esperaríamos observar en el gel una sola banda con un peso molecular de entre 125 y 130 kDa, que corresponde al peso de una subunidad alfa.

También sería importante comprobar que nuestro receptor soluble es capaz de unirse a la insulina lo cual podría llevarse a cabo con experimentos de unión con insulina marcada radiactivamente.

Si demostramos que la proteína que llamamos receptor soluble corresponde efectivamente a una forma soluble de la subunidad alfa del receptor de insulina y que dicha forma soluble conserva la capacidad de unir insulina, las observaciones apoyarán la idea de que el hígado puede producir y liberar al medio una forma soluble del receptor de insulina y que su liberación es mayor en presencia de niveles elevados de insulina. Dicha forma soluble podría actuar en el plasma como amortiguador de la insulina pero también, al producirse en exceso, podría contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina.

Para poder comprobar que efectivamente existe una relación entre la liberación al medio de una forma soluble del receptor de insulina (producida por los hepatocitos) y el desarrollo de la resistencia a la insulina, sería necesario probar, en primer lugar, que dicha proteína además de liberarse hacia el medio de cultivo se encuentre presente en el plasma y, en segundo lugar, que sus niveles circulantes se incrementen en presencia de niveles altos de insulina.

Aún cuando es necesaria una caracterización más detallada de la proteína que llamamos receptor soluble de la insulina, la observación de que su liberación aumenta dependiendo de la cantidad de insulina con que se trate a las células, puede ser una observación relevante para entender la fisiología y fisiopatología de la insulina y puede ayudarnos a entender el fenómeno de la resistencia a la insulina.

## CONCLUSIONES

- Los hepatocitos en cultivo primario liberan constitutivamente al medio una proteína que es reconocida por un anticuerpo dirigido contra la subunidad alfa del receptor de insulina, a la cual llamamos receptor soluble de insulina.
- La presencia del receptor soluble de insulina en el medio aumenta dependiendo de la concentración de insulina con la que son tratados los hepatocitos y del tiempo de exposición a dicha hormona.
- Las células 3T3-L1 diferenciadas en adipocitos, que utilizamos como modelo de células adiposas, no secretan al medio la proteína que es reconocida por el anticuerpo contra el receptor de insulina.
- Aún cuando los adipocitos no secreten una forma soluble del receptor de insulina pueden participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina a través de otros mecanismos.
- Es necesario caracterizar más detalladamente la proteína recuperada del medio de cultivo de los hepatocitos para poder asegurar que se trata de una forma soluble del receptor de insulina.
- La resistencia a la insulina es un fenómeno complejo en el que pueden participar factores muy diversos. Uno de ellos puede ser la elevación en el plasma de formas solubles del receptor de insulina que al unirse a la hormona no le permitan llevar a cabo sus efectos en el tejido periférico.

## **Perspectivas:**

- Caracterizar más detalladamente la proteína que llamamos receptor soluble en presencia de agentes desnaturalizantes para conocer sus características como peso molecular exacto y determinar la forma en la que se está liberando al medio de cultivo de los hepatocitos (dímero, monómero, etc).
- Comprobar que el receptor soluble es capaz de unirse a la insulina y determinar la afinidad de unión por la insulina.
- Secuenciar la proteína recuperada del medio de cultivo de los hepatocitos para comprobar que se trata de una forma soluble del receptor de insulina.
- Analizar la liberación del receptor al plasma sanguíneo en modelos *in vivo* de resistencia a la insulina.

## REFERENCIAS

Bass J, Chiu G, Argon Y y Steiner DF. 1998. "Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization" *J. Cell Biol.* **141**:637-646.

Berhanu P y Olefsky JM. 1982. "Photoaffinity labeling of insulin receptors in viable cultured human lymphocytes. Demonstration of receptor shedding and degradation". *Diabetes* **31**:410-417.

Cheatham B y Kahn CR. 1992. "Cysteine 647 in the insulin receptor is required for normal covalent interaction between  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and signal transduction". *J. Biol.Chem.* **267**: 7108-7115.

De Meyts P y Whittaker J. 2002. "Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design". *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**:769-783.

De Meyts P. 2004. "Insulin and its receptor: structure, function and evolution". *BioEssays* **26**:1351-1362.

Federici M, Porzio O, Zucaro L, Fusco A, Borboni P, Lauro D y Sesti G. 1997. "Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues". *Moll. Cell. Endocrinol.* **129**:121-126.

Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ y Dohm GL. 1995. "Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects". *J. Clin. Invest.* **95**: 2195-2204.

Kahn BB y Flier JS. 2000. "Obesity and insulin resistance". *J. Clin. Invest.* **106**:473-481.

Kanezaki Y, Matsushima R, Obata T, Nakaya Y, Matsumoto T y Ebina Y. 2003. "Injection of the insulin  $\alpha$  subunit increases blood glucose levels in mice". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **309**: 572-577.

Lu K y Guidotti G. 1996. "Identification of the cysteine residues involved in the class I disulfide bonds of the human insulin receptor: properties of insulin receptor monomers". *Mol. Biol. Cell* **7**:679-691.

Marino-Buslje C, Martin-Martínez M, Mizuguchi K, Siddle K y Blundell TL. 1999. "The insulin receptor: from protein sequence to structure". *Biochem. Soc. Trans.* **27**:715-726.

Olefsky JM. 1990. "The insulin receptor a multifunctional protein". *Diabetes* **39**:1009-1016.

Papa V, Russo P, Gliozzo B, Goldfine ID, Vigneri R y Pezzino V. 1993. "An intact and functional soluble form of the insulin receptor is secreted by cultured cells". *Endocrinology* **133**: 1369-1376.

Pezzino V, Papa V, Constantino A, Frittitta L, Russo P, Goldfine ID y Vigneri R. 1992. "Identification and initial characterization of insulin receptor-like immunoreactivity in human plasma". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**: 1116-1121.

Rhodes CJ y White MF. 2002. "Molecular insights into insulin action and secretion". *Eu. J. Clin. Invest.* **32** (Suppl.3): 3-13.

Rubin CS, Hirsch A, Fung C y Rosen OM. 1978. "Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in Vitro*. Insulin receptors and insuline sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells". *J. Biol. Chem.* **253**: 7570-7578.

Saltiel AR y Kahn CR. 2001. "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism". *Nature* **414**:799-806.

Schaefer EM, Viard V, Morin J, Ferré P, Pénicaud L, Ramos P, Maika SD, Ellis L, Hammer RE. 1994. "A new transgenic mouse model of chronic hyperglycemia". *Diabetes* **43**:143-153.

Schäffer L y Ljungqvist L. 1992. "Identification of a disulfide bridge connecting the  $\alpha$  subunits of the extracellular domain of the insulin receptor". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **189**:650-653.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR y Barthel A. 2005. "Molecular mechanisms of insulin resistance". *Diabetic Medicine* **22**:674-682.

Shier P, Watt VM. 1989. "Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family". *J. Biol. Chem.* **264**:14605-14608.

Seino S, Seino M, Nishi S y Bell GI. 1989. "Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 114-118.

Seino S y Bell GI. 1989. "Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**:312-316.

Sesti G. 2000. "Insulin receptor variant forms and Type 2 diabetes mellitus". *Pharmacogenomics* **1**:49-61.

Shulman GI. 2000. "Cellular mechanisms of insulin resistance". *J. Clin. Invest.* **106**: 171-176.

Song SH, McIntyre SS, Shah H, Veldhuis JD, Hayes PC y Butler PC. 2000. "Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**:4491-4499.

Sparrow LG, McKern NM, Gorman JJ, Strike PM, Robinson CP, Bentley JD y Ward CW. 1997. "The disulfide bonds in the c-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain". *J. Biol. Chem.* **272**:29460-29467.

Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Quon MJ, Sierra ML, Suzuki Y, Koller E, Levy-Toledano R, Wertheimer E, Moncada VY, Kadowaki H y Kadowaki T. 1992. "Mutations in the insulin receptor gene". *Endocrine Rev.* **13**:566-595.

Whittaker J y Okamoto A. 1988. "Secretion of soluble functional insulin receptors by transfected NIH3T3 cells". *J. Biol. Chem.* **263**:3063-3066.