



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN EL MÚSCULO, EN LA ETAPA
FINAL DE LA GESTACIÓN DE RATONAS C57/BL6**

TESIS

PRESENTA:

Samuel López Guadarrama

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

TUTOR:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

RECEPCIONAL ESCRITO

Ciudad Universitaria, CD. MX., Diciembre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía** por ser directora de tesis y autora intelectual de este trabajo. Agradezco profundamente su apoyo y dedicación para la realización de este trabajo, así como su contribución en mi desarrollo profesional.

Al candidato a **Dr. Alain de Jesús Hernández Vázquez** por el apoyo técnico brindado en actividades experimentales, pero sobre todo, por ser la guía y compañía que necesitaba durante la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. Myrian Velasco Torres

Dr. Carlos Alfonso Larqué Velázquez

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Martha Flores Robles

Por ser mis revisores y contribuir a la mejora de este trabajo.

Mi más grande admiración a cada uno.

A la **Dra. Leticia Riverón Negrete, Dra. Karina Pasten Hidalgo, Bióloga Andrea Paulina Morales Castillo** y demás compañeros de laboratorio con quienes pude compartir buenas experiencias y quienes me motivaron a seguir adelante.

A mis padres y hermanos, con quienes estaré eternamente agradecido por creer en mí y darme la oportunidad de ser feliz. Los amo.

**Este trabajo fue realizado en la Unidad de Genética de la Nutrición del
Instituto de Investigaciones Biomédica.
Universidad Nacional Autónoma de México / Instituto Nacional de Pediatría.**

CONTENIDO

RESÚMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
Insulina y su biosíntesis	5
Secreción de la insulina	7
Mecanismos moleculares la de señalización de la insulina	8
-Receptor de insulina	
-Proteínas IRS	
-Vía de PI3K/AKT	
Efectos metabólicos de la insulina	11
-Señalización de la insulina en el hígado	
-Señalización de la insulina en el músculo esquelético	
-Señalización de la insulina en el tejido adiposo	
Mecanismos inhibitorios de la señalización de la insulina	15
-Expresión del receptor de insulina en la membrana	
-Fosforilación inhibitoria	
-Fosfatasas inhibitorias	
Resistencia a la insulina en condiciones fisiológicas y patológicas ..	18
-Rol del receptor de insulina truncado	
Metabolismo durante la gestación	22
-Cambios metabólicos y fisiológicos en la gestación	
-Resistencia a la insulina en la gestación	
Regulación de la vía de señalización de la insulina durante la gestación	24
ANTECEDENTES DIRECTOS	28
PLANTEAMIENTO	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31

MATERIALES Y MÉTODOS	32
Modelo Animal	32
Curvas de sensibilidad a la insulina	32
Obtención de tejido	33
Análisis de la expresión transcripcional	33
-Extracción de ARNm total	
-Cuantificación de ARN y retrotranscripción	
-qRT-PCR	
Análisis de la expresión traduccional y post-traduccional	37
-Extracción de proteína total	
-Determinación de la concentración de proteínas	
-Electroforesis en gel de poliacrilamida	
-Immunodetección	
Análisis Estadístico	39
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN

Introducción. Durante el último tercio de la gestación, diversos mamíferos, incluido el humano, presentan resistencia a la insulina, un fenómeno fisiológico en el que se observa una disminución en la sensibilidad a la insulina de los tejidos maternos y cuyo propósito es suplir eficientemente al feto de los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo. Aún se desconocen los mecanismos moleculares precisos que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina durante la gestación, por lo que resulta necesario el estudio de las diferentes proteínas partícipes en la vía de señalización de la insulina en diversos tejidos, lo cual ayudaría a comprender de manera integral, el rol que ciertos mecanismos moleculares en determinados tejidos tienen durante este periodo gestacional. En estudios previos en el laboratorio, se analizó la fosforilación de la proteína AKT (Tir308), una proteína central en la señalización de la insulina, encontrándose una disminución en el hígado, el tejido adiposo y el músculo, indicando una menor señalización de la insulina. En el hígado y en el tejido adiposo, esta disminución correlaciona con incrementos en la expresión de PTEN, una proteína inhibitoria de la vía de señalización de la insulina, lo que sugiere que la inactivación de AKT en estos tejidos se encuentra ligado a un aumento en esta proteína inhibidora. Sin embargo, la fosforilación y expresión total de PTEN, no se vieron modificadas en el músculo esquelético, por lo que este mecanismo no explica la disminución de la expresión de la forma activa de AKT en este tejido. En este estudio se propone analizar los cambios en la expresión y fosforilación del receptor de insulina, además de la expresión de la forma truncada de la cadena β del receptor de insulina (IR- β'), buscando determinar el rol de estos factores en la resistencia a la insulina observada hacia el final de la gestación en condiciones fisiológicas, específicamente en el tejido muscular

Objetivo. El objetivo de este trabajo es analizar los cambios en la expresión y activación del receptor de insulina en el músculo esquelético de ratonas en el día 17 (último tercio) de la gestación, en un modelo animal de ratón.

Métodos. Ratonas hembra de la cepa C57BL/6J, se dividieron en dos grupos: ratonas de 8-12 semanas de edad en el día 17 de la gestación y ratonas no

gestantes de la misma edad. Antes de la administración de insulina, se realizó un pequeño corte en la cola para medir los niveles de glucosa plasmática. Posteriormente, las ratonas se inyectaron vía intraperitoneal con insulina humana (1UI/kg) y 30 minutos después los niveles de glucosa plasmática fueron medidos nuevamente. A continuación, se extrajo el tejido muscular del cuádriceps femoral, de donde se analizó la expresión del ARNm de la isoforma B del receptor de insulina, la expresión de proteína total, los niveles de fosforilación en el residuo Tir1150 y la abundancia de la forma trunca de este mismo receptor.

Resultados. Comparado con el grupo no gestante, las ratonas al día 17 de gestación mostraron una disminución en la sensibilidad a la insulina, demostrando así el fenómeno de insulinoresistencia presente durante este periodo. Las ratonas en gestación no mostraron diferentes niveles de expresión del ARNm de la isoforma B del receptor de insulina, comparadas con el grupo control. De igual manera, la expresión de la proteína total y los niveles de fosforilación de la cadena β del receptor de insulina, no se vieron alterados en el grupo gestante. Por otro lado, la abundancia de la forma trunca o soluble del receptor de insulina mostró un incremento significativo en el grupo gestante, comparadas con el grupo control.

Conclusiones. Estos resultados demuestran que la expresión transcripcional y traduccional, así como los niveles de activación por fosforilación del receptor de insulina, no se ven alterados durante la última etapa de la gestación, indicando que estos factores parecen no tener un rol importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en este periodo. Sin embargo, se encontró que, en el grupo de ratonas gestantes, existe una mayor abundancia de la forma trunca del receptor de insulina. Este resultado sugiere que el corte proteolítico del receptor de insulina, que da como resultado la forma trunca, es un posible mecanismo que participa en el desarrollo de insulinoresistencia durante la gestación.

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
AKT (PKB)	Protein Kinasa B
ARNm	RNA mensajero
BACE1	Beta-secretasa 1
BSA	Albúmina bovina sérica
Ca²⁺	Calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DEPC	Dietil pirocarbonato
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glucógeno sintasa
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
kDa	Kilo Daltons
PDK	Cinasa dependiente de fosfoinositol
PI3K	Fosfoinositol-3-cinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PH	Dominio de homología a pleckstrina
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina
S6K	Cinasa de la proteína ribosomal S6
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
Thr	Treonina
Zn²⁺	Zinc

INTRODUCCIÓN

Insulina y su biosíntesis

La insulina es una hormona peptídica producida y secretada por las células beta de los islotes pancreáticos, también conocidos como islotes de Langerhans.

La biosíntesis de la insulina comienza cuando el gen INS se transcribe en el núcleo a ARN mensajero (ARNm); este codifica para una sola cadena polipeptídica (preproinsulina) que es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico. Esta cadena única es un precursor que está conformado por un péptido señal necesario para dirigir el péptido naciente hacia la vía secretora, la cadena A de 21 aminoácidos, la cadena B de 30 aminoácidos y el péptido C de 31 aminoácidos (Steiner DF, 1967).

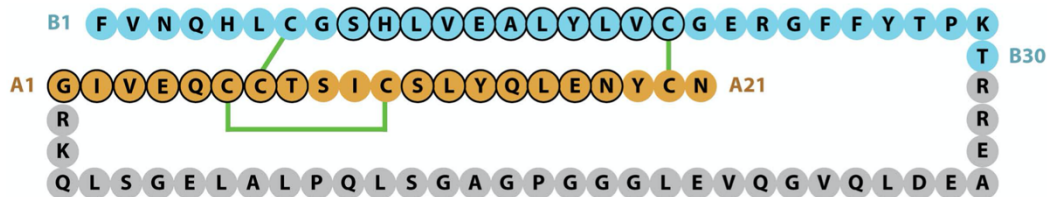


Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la insulina humana. Cada letra representa un aminoácido, mientras las líneas verdes representan puentes disulfuro (Ward CW, 2011).

Durante la traducción, el péptido señal de esta hormona inmadura es cortado por una peptidasa en el retículo endoplásmico rugoso, continuando la traducción para dar origen a la proinsulina. Dentro de este mismo organelo, lo proinsulina se pliega y se estabiliza en su configuración tridimensional nativa, la acción de isomerasas favorece la unión de la cadena A y la cadena B mediante la formación de tres puentes disulfuro.

La proinsulina recién plegada se transporta hacia el aparato de Golgi; se empaqueta en gránulos secretorios inmaduros, donde es procesada por las prohormona convertasas PC1/3 y PC2, cortando el péptido C de la cadena principal. Posteriormente, la carboxipeptidasa E libera aminoácidos básicos del extremo C-

terminal de las cadenas polipeptídicas resultantes, produciendo finalmente la forma madura de la insulina, compuesta por las cadenas A y B unidas por puentes disulfuro (Hutton JC, 1994).

Después de transportarse a través del sistema Golgi, los gránulos con insulina maduran. Dentro de estos gránulos secretorios, la insulina se une a dos átomos de zinc (Zn^{2+}), con la que forma cristales hexaméricos (Lemaire K, et. al. 2009). La gran mayoría de estos gránulos secretorios maduros se mantienen en el citoplasma de la célula beta, unidos a microtúbulos y filamentos de actina. Los gránulos maduros se resguardan hasta ser secretados en respuesta a una señal de calcio (Ca^{2+}) intracelular (Rorsman P, 2003).

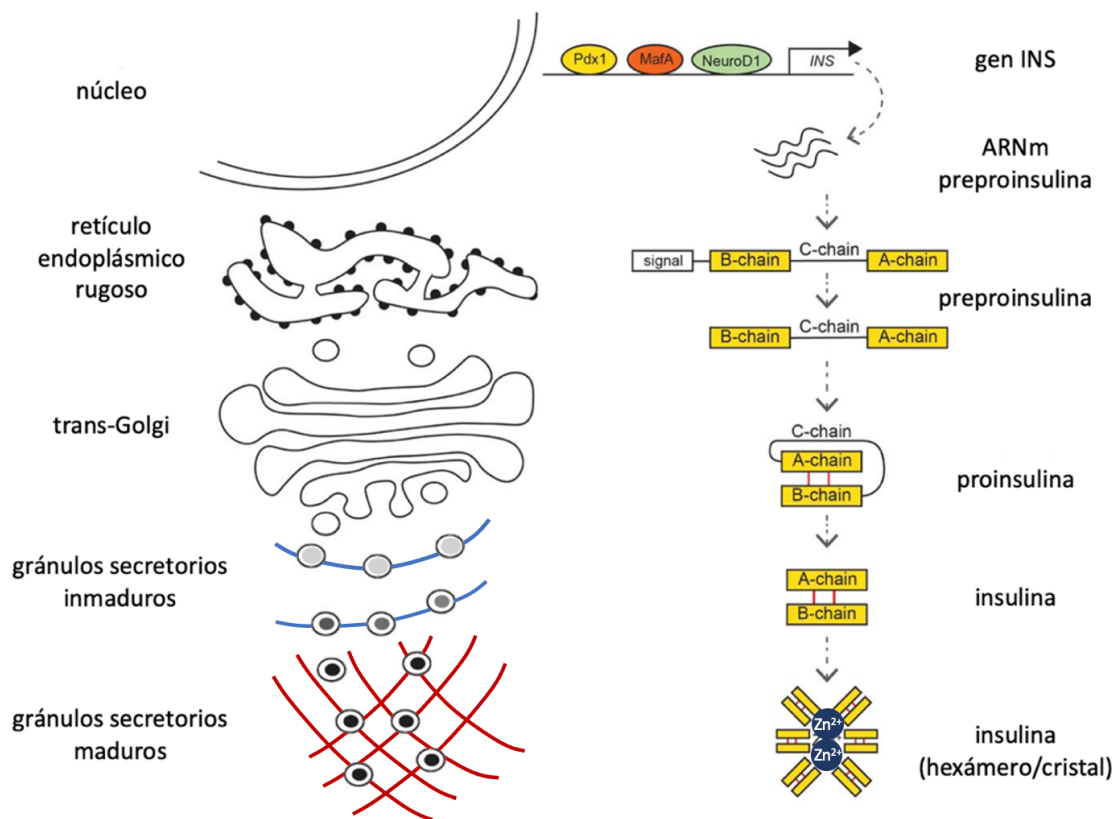


Figura 2. Biosíntesis de la insulina (Modificado de Tokarz VL, 2018).

Secreción de la insulina

La glucosa es el nutriente secretagogo más importante de la insulina. El mecanismo para que se lleve a cabo la liberación de la insulina requiere de la entrada a la célula de la glucosa y de su catabolismo para llevar a cabo el proceso denominado como secreción de insulina estimulada por glucosa (Rorsman P, 2013).

Cuando los niveles de glucosa plasmática suben, la entrada de glucosa a las células beta pancreáticas, a través de transportadores de glucosa (GLUT2) independientes de insulina, también aumenta. Dentro de la célula, la glucosa primero se convierte en glucosa-6-fosfato al ser fosforilada por la glucocinasa (hexocinasa 4), una enzima considerada como un sensor de glucosa de las células beta pancreáticas. Esta fosforilación permite que la glucosa sea metabolizada en concentraciones consideradas hiperglucémicas, lo que resulta en un aumento de la concentración citoplásmica de ATP que permite el acoplamiento del metabolismo con cambios electrofisiológicos ocasionados por el cierre de canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) (Ashcroft F, 1984). Como resultado, la membrana celular sufre una despolarización, conduciendo a la apertura de canales de calcio dependientes de

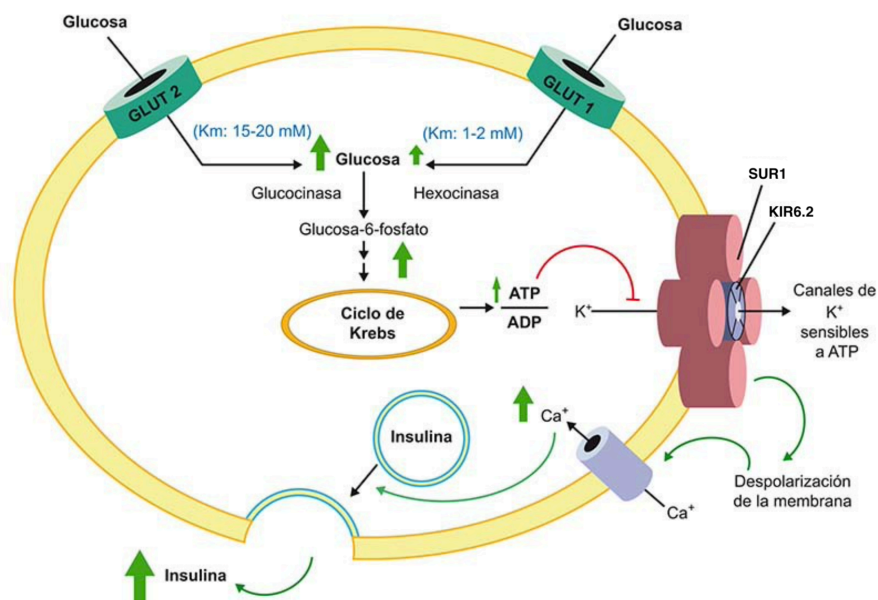


Figura 3. Mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). Procesos biofísicos y enzimáticos que participan en la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Fernández-Mejía, 2018).

voltaje y, por lo tanto, al flujo de calcio dentro de la célula. Esta entrada de calcio extracelular es la señal necesaria para promover la exocitosis de insulina (y péptido C) hacia la vena porta, ya que el calcio intracelular promueve la fusión de los gránulos de insulina maduros con la membrana plasmática (Baumgard LH, 2016).

La secreción de insulina estimulada por glucosa muestra además un patrón bifásico: la primera fase comienza casi inmediatamente después al estímulo de glucosa, observando un pico de secreción de insulina, asociado a los gránulos unidos a la malla cortical de actina; posteriormente, la segunda fase consiste en una secreción de insulina asociada a los gránulos unidos a microtúbulos, que llega más tarde, pero se mantiene constante hasta haber alcanzado los niveles de glucosa plasmática basales (Henquin, 2006).

Mecanismos moleculares de la señalización de la insulina

Tras haber sido secretada por las células beta pancreáticas, la insulina viaja por el torrente sanguíneo para llegar a múltiples tejidos blanco, en donde será capaz de desencadenar sus conocidos efectos metabólicos y mitogénicos al unirse al receptor de insulina (IR).

Receptor de insulina

Este receptor tetramérico se encuentra en la membrana plasmática de las células blanco. Consta de dos subunidades α extracelulares donde se encuentran los sitios de unión a la insulina, y dos subunidades β citoplásmicas que poseen dominios de cinasa de residuos de tirosina y tiene un peso de aproximado de 95kDa (Hubbard SR, 2013).

Existen dos isoformas del receptor de insulina, la isoforma A y B. La isoforma A se diferencia al prescindir del exón 11 del gen *InsR* tras el proceso de empalme alternativo o *splicing*; posee una alta afinidad por el factor de crecimiento IGF-2, lo que le confiere un rol importante en el desarrollo y crecimiento pre-natal. Por el otro lado, la isoforma B del IR, la cual sí contiene al exón 11, resulta mucho más afín a la insulina que a IGF-2, por lo que participa en la mayoría de los procesos

metabólicos regulados por la insulina. Además, IR-B es la isoforma mayormente expresada en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo blanco, tejidos conocidos por sus importantes funciones metabólicas (Belfiore A, 2017).

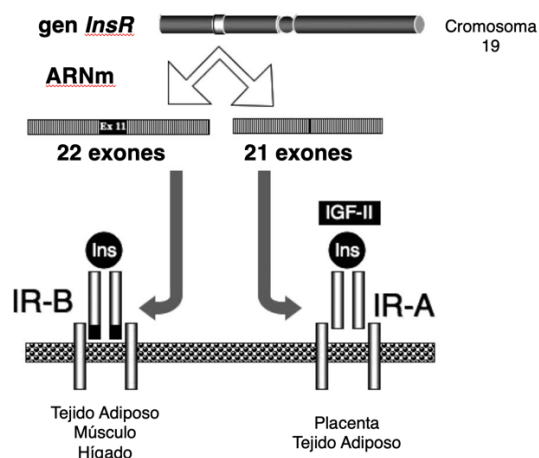


Figura 4. Isoformas del receptor de insulina, resultado de un proceso de splicing sobre el transcrito del gen *InsR* (Frasca, 2008).

Tras la unión de la insulina al receptor de insulina, se da un cambio conformacional en éste que permite la autotransfosforilación en los residuos de tirosina Tir1162, Tir1158 y Tir1163, localizados en el dominio cinasa de las subunidades β . Este evento de trans-autofosforilación resulta esencial para el reclutamiento de proteínas sustrato del IR (Wei L, 1995).

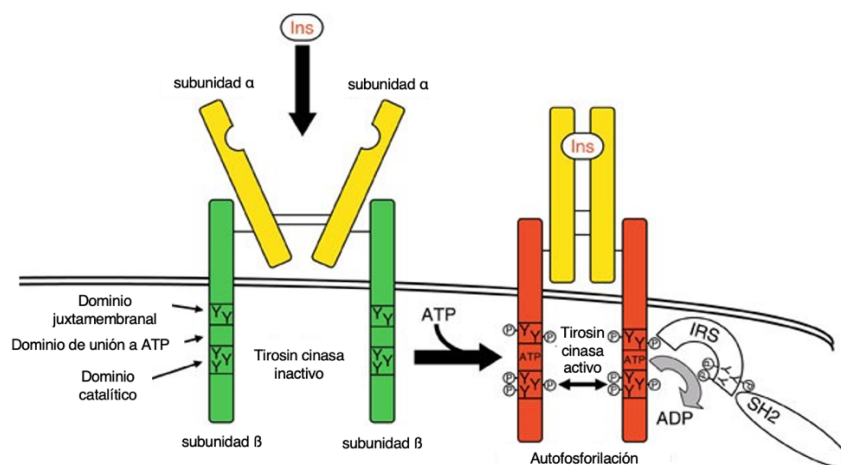


Figura 5. Receptor de insulina. Estructura y activación del IR (Modificado de Barthel A, 2008).

Esta activación del receptor de insulina inicia la amplificación de la señalización metabólica de la insulina al reclutar distintas proteínas adaptadoras con un dominio PTB (dominio de unión a fosfotirosina), como lo son la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS) y la familia SHC. El reclutamiento de diversos sustratos del receptor de insulina permite la ramificación de la señalización de la insulina en una etapa temprana, con el fin de activar múltiples módulos funcionales y regulatorios, entre los que se incluye el transporte de glucosa, síntesis de biomoléculas, diferenciación celular, mitogénesis y la autoinhibición de la actividad del receptor de insulina (Petersen, 2018).

Vía de PI3K/AKT

El sustrato de receptor de la insulina 1 (IRS-1) es una de las proteínas adaptadoras que se unen al receptor de insulina activo. Ha sido altamente estudiada ya que se le considera un nodo regulatorio en múltiples vías de señalización de procesos metabólicos, siendo una de ellas la vía de PI3K/AKT (Dong X, 2006).

La señalización de esta vía continúa posterior a la activación del receptor, el cual recluta y fosforila en múltiples residuos de tirosina a IRS-1. Los sitios de fosfotirosina en motivos YXXM de IRS-1 permiten la unión de PI3K, una proteína con actividad de cinasa de lípidos conformada por dos subunidades: la subunidad p85 α regulatoria y la p110 catalítica (Myers MG Jr, 1992).

La PI3K, a través de la actividad de la subunidad p110 catalítica, fosforila el precursor fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) que se encuentra en la membrana plasmática, sintetizando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Esta reacción es reversible y catalizada por la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), lo que la convierte en una proteína inhibitoria de la vía PI3K/AKT, ya que la propagación y amplificación de la señal de insulina, requiere la acumulación de PIP₃. (Wijesakara N, 2005).

PIP₃ actúa entonces como segundo mensajero y sitio de anclaje al promover el reclutamiento a la membrana de cinasas dependientes de fosfoinositidos, como lo son PDK-1 y PDK-2, así como AKT (formalmente conocida como PKB).

Existen tres genes que codifican isoformas de AKT. La isoforma AKT2 es la que participa en esta vía de señalización estimulada por insulina. AKT interactúa con PIP₃ a través de su dominio PH (dominio de homología a pleckstrina), lo que la localiza en la misma región en la membrana que PDK-1 y mTORC2, que activan a AKT al fosforilarla en los residuos (treonina) Thr308 y (serina) Ser473, respectivamente (Alessi DR, 1997) (Sarbasov DD, 2005). Esta forma activa de AKT es capaz de fosforilar múltiples blancos, como lo son las proteínas FOXO1, GSK3, TSC1/2 que activa a mTORC1, AS160, entre otras; por lo que está implicada en la regulación de múltiples procesos principalmente metabólicos. Esta característica convierte a AKT (también conocida como PKB), en un importante nodo regulador de la vía de la insulina (Taniguchi CM, 2006).

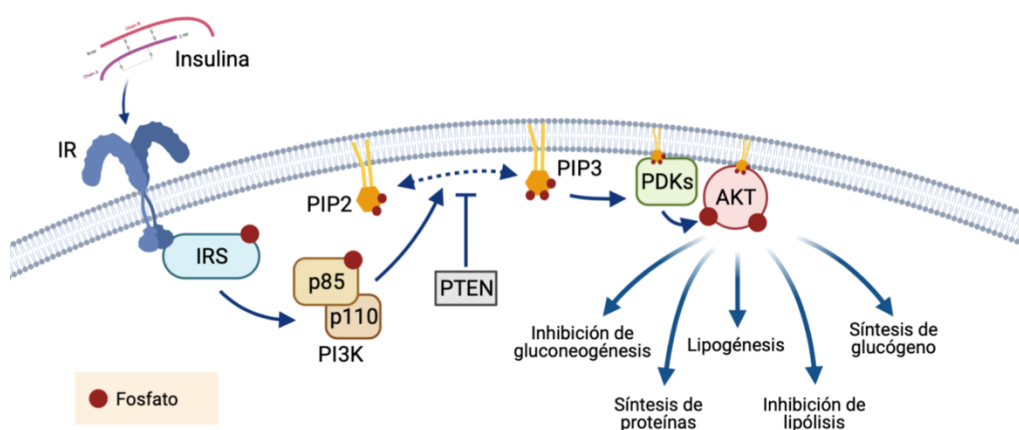


Figura 6. Vía de señalización de la insulina por PI3K/AKT.

Efectos metabólicos de la insulina

La función más conocida de la insulina es el efecto hipoglucemiante que se observa en respuesta a altas concentraciones de glucosa plasmática, que actúa como la señal metabólica más importante que estimula la secreción de insulina de las células beta pancreáticas. Este efecto hipoglucemiante se debe a que la insulina facilita la

entrada de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo, al promover la translocación del transportador GLUT4 a la membrana celular, aumentando así la captación de glucosa por las células en estos tejidos (Leto D, 2012).

La insulina es considerada la principal hormona anabólica, por también regular el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos en múltiples tejidos.

Durante el postprandio, en el hígado, la insulina activa enzimas que metabolizan la glucosa a través de los procesos de glucólisis y glucogenogénesis, al mismo tiempo que inhibe enzimas de degradación del glucógeno (Lewis GF, 2021)

En el músculo, además de favorecer la entrada de glucosa y la síntesis de glucógeno, la insulina activa la esterificación de ácidos grasos y la síntesis de proteínas; mientras que en el tejido adiposo la insulina favorece principalmente la lipogénesis y almacenamiento de lípidos activando a la lipoproteína lipasa (Petersen MC, 2018)

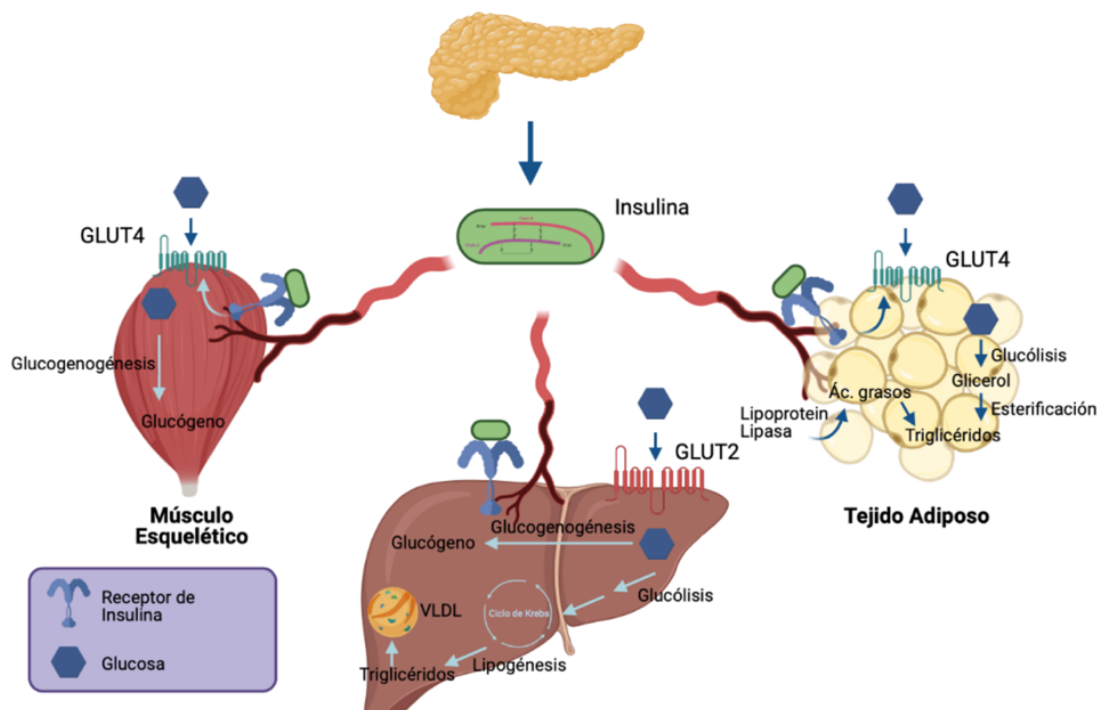


Figura 7. Efectos metabólicos de la insulina. Procesos metabólicos activados por la señalización de la insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo blanco.

Señalización de la insulina en el hígado

La señalización hepática de la insulina posee propiedades anabólicas al promover la síntesis de todo tipo de macromoléculas metabólicas, como lo son el glucógeno, lípidos y proteínas.

A diferencia del músculo y el tejido adiposo, la captación de glucosa en el hígado es independiente a la acción de la insulina. Se considera que la entrada de glucosa a los hepatocitos se da por transporte facilitado a través de GLUT2. Además, este es el transportador de glucosa hepático predominante en humanos (Adeva-Andany, 2016).

La insulina postprandial en el hepatocito promueve la síntesis de glucógeno mediante la señalización a través de la vía de PI3K/AKT, que tiene como uno de sus blancos la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) en el residuo Ser21 para la isoforma α , y en Ser9 para la isoforma β . Esta fosforilación inactiva a la GSK3 β , la cual es un inhibidor de la enzima glucógeno sintasa (GS). Por lo tanto, en respuesta a insulina, la glucógeno sintasa se activa y cataliza la formación de enlaces glucosídicos entre moléculas de glucosa para formar glucógeno (Cross DA, 1995).

Otro mecanismo clave en las propiedades anabólicas de la insulina en estado postprandial, es la inhibición de genes gluconeogénicos. La activación de AKT estimulada por insulina, hace que fosforile al factor de transcripción FOXO1. Este factor de transcripción es responsable de regular el programa transcripcional gluconeogénico en el hígado (Puigserver P, 2003). Por lo tanto, FOXO1 al ser fosforilado por AKT, sale del núcleo y pierde su actividad de factor transcripcional, inhibiendo así la expresión de genes gluconeogénicos. Además, la insulina reduce la producción de glucosa hepática al limitar el suministro de glicerol y ácidos libres al hígado; así como inhibiendo la glucogenólisis (Cherrington AD, 1998).

Existe también un efecto de la insulina sobre el metabolismo de lípidos hepático, sobre todo relacionado con la regulación positiva de genes partícipes en la lipogénesis de novo a cargo del factor de transcripción SREBP-1c, el cual se activa

después de ser procesado y translocado al núcleo en respuesta a la señal proveniente del eje PI3K/AKT/mTORC1 (Li S, 2010).

Señalización de la insulina en el músculo esquelético

En el músculo esquelético, la insulina es una señal de abundancia de glucosa en el torrente sanguíneo, por lo que su función en los miocitos es la captación de glucosa para la obtención de energía mediante su catabolismo en el periodo de posprandio o su almacenamiento en forma de glucógeno (Kim JK, 2000).

El efecto de la insulina en el músculo esquelético más estudiado ha sido la captación de glucosa a través de una coordinada translocación y fusión de GLUT4 a la membrana plasmática, proceso que se considera, dependiente de la señalización de PI3K (Luo J, 2006). El control que PI3K ejerce sobre la captación de glucosa, está mediado a través de la activación de AKT, RAC1 y sus proteínas blanco, las cuales a su vez coordinan la acción de proteínas envueltas en el tráfico y fusión de vesículas cargadas con GLUT4 a la membrana plasmática (SyLOW L, 2014).

IRS-1 e IRS-2 son las proteínas sustrato del receptor de insulina más importantes en su señalización metabólica en el músculo esquelético. En este tejido, IRS-1 tiene un rol dominante, promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno estimuladas por insulina. Mientras tanto, IRS-2 parece no ser esencial para estas funciones, sin embargo, participa en la regulación del metabolismo de lípidos (Previs SF, 2000).

Como sucede en el hígado, la síntesis de glucógeno estimulada por insulina en el músculo esquelético se regula en parte por la fosforilación de AKT y consecuente inactivación de la glucógeno sintasa cinasa (GSK3). Además, la insulina promueve la desfosforilación de la glucógeno sintasa a través de la activación de la fosfatasa PP1. Ambos mecanismos permiten entonces, la abundancia de una sintasa de glucógeno activa y desfosforilada, capaz de promover la síntesis de glucógeno (Cohen P, 2001).

Señalización de la insulina en el tejido adiposo

Los efectos de la insulina sobre el tejido adiposo blanco son importantes en el mantenimiento de la homeostasis de los ácidos grasos. Además, el tejido adiposo presenta alta sensibilidad a esta hormona, por lo que la insulina exhibe efectos potentes y rápidos en este tejido.

La insulina inhibe la lipólisis a través de mecanismos dependientes de cAMP/PKA ligados a AKT, que tras ser activada por la señalización de la insulina, fosforila a la fosfodiesterasa 3B (PDE3B), la cual degrada cAMP para disminuir la señalización de PKA, que tiene como blancos proteínas participantes en la lipólisis como la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la perilipina (PLIN). Al inhibir los procesos lipolíticos, la insulina regula a la baja los niveles de ácidos grasos libres en plasma (Jaworski K, 2007).

A pesar de que no se ha observado que la insulina favorezca directamente la esterificación de ácidos grasos, su participación apunta más bien a regular la disponibilidad de sustratos. Al regular la captación de glucosa mediante el eje de señalización IRS-1/PI3K/AKT en adipocitos, activa mediante la vía de la glucólisis, la síntesis de glicerol-3-fosfato, que funciona como sustrato para el proceso de esterificación de triglicéridos. Por otro lado, aumenta la actividad de la lipoprotein lipasa en el endotelio del tejido adiposo, proveyendo de ácidos grasos libres para su re-esterificación (Farese RV, 1991).

Adicionalmente, la insulina activa el factor de transcripción SREBP-1c y su programa transcripcional pro-lipogénico como lo hace en hepatocitos (Horton JD, 2002).

Mecanismos inhibitorios de la señalización de la insulina

La regulación de la vía de señalización de la insulina es esencial para mantener en correcto funcionamiento sus efectos metabólicos, siendo la actividad de las proteínas proximales de la vía receptor de insulina: IRS-1, PI3K y AKT, el principal blanco de esta regulación (Posner BI, 2017).

Se conocen distintos mecanismos de regulación negativa que en condiciones fisiológicas se encargan principalmente de terminar la señalización de la insulina. Sin embargo, se ha encontrado que la desregulación de estos mecanismos inhibitorios participa en condiciones patológicas, tales como la obesidad, diabetes o incluso en un contexto inflamatorio. (Rahman M, 2021)

Expresión del receptor de insulina en la membrana plasmática

El receptor de insulina es la primera proteína con la que entra en contacto la insulina para transducir su señal. Uno de los mecanismos por los que se reduce la señalización de la insulina es la disminución en la expresión de su receptor sobre la membrana plasmática. Existen dos explicaciones por las que presuntamente ocurre este fenómeno: la primera propone una disminución en la transcripción y expresión total del receptor; mientras que el segundo mecanismo involucra a la ubiquitin ligasa *MARCH1*, la cual ubiquitina al receptor de insulina promoviendo su degradación y disminuye su abundancia en la superficie celular. Además, la expresión de *MARCH1* se ha encontrado aumentada en tejido adiposo blanco de ratones y humanos obesos, sugiriendo un rol en la fisiopatología de este padecimiento al contribuir a la desensibilización a la insulina (Nagarajan A, 2016).

Fosforilaciones inhibitorias

Usualmente los eventos de fosforilación en el receptor de la insulina y proteínas IRS, especialmente en residuos de tirosina, son entendidos como modificaciones postraduccionales que activan proteínas y promueven la transducción de señal de la insulina. En contraste, existen fosforilaciones principalmente en residuos de serina/treonina, a las que se les atribuyen funciones inhibitorias (Boucher J, 2014). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que el efecto positivo o negativo que puedan tener estas fosforilaciones, depende más de el patrón de fosforilación que se forme sobre la proteína, es decir, son sitio-dependientes (Haeusler RA, 2018).

Uno de los ejemplos más claros de este tipo de regulación se encuentra en la proteína adaptadora IRS-1. En condiciones fisiológicas, la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) forma parte de un circuito auto-regulatorio activado por la misma insulina. Al activarse la S6K por la fosforilación de mTORC1, esta fosforila a IRS-1 en el residuo Ser302 que resulta en una caída en la señalización de IRS-1 y su posterior degradación proteosomal, terminando así la señalización de la insulina (Shah OJ, 2004).

Ser307 es otro sitio de fosforilación que ha mostrado un importante rol en la regulación de IRS-1, pues es usada frecuentemente como evidencia de inhibición de IRS-1 y subsecuente pérdida de sensibilidad a la insulina. Se conocen múltiples estímulos que inducen la fosforilación de IRS-1 en Ser307, entre los que se encuentran el estrés hiperosmótico, el antibiótico asinomicina, citocinas pro-inflamatorias como $TNF\alpha$ provenientes de infiltración de células inmunes y ácido okadaico. Todos estos estímulos activan cinasas de Ser/Thr como $IKK\beta$ y JNK, o mTOR, y son capaces de reducir la señalización de la insulina a través de este mecanismo (Gual P, 2005).

El estudio de las fosforilaciones en residuos de Ser/Thr en IRS-1 es tan extenso que se han descrito patrones de fosforilación en donde se reportan los residuos fosforilados, la cinasa responsable de la fosforilación, y los efectos observados (Copps KD, White MF, 2012).

Otro mecanismo de regulación por fosforilación inhibitoria sucede en el receptor de insulina. La activación de $PKC\epsilon$ o $PKC\theta$ (dependiendo del tejido) dependiente de diacilglicerol, promueve la fosforilación del residuo Thr1160 en la asa de activación del receptor, debilitando su autofosforilación, la cual es necesaria para su completa activación (Petersen MC, 2016).

Fosfatasas inhibitorias

Uno de los mecanismos más estudiados que alteran la señalización de la insulina, es la desfosforilación de varias de las proteínas que integran la vía, disminuyendo así su activación. Si bien este fenómeno puede ocurrir debido a una desregulación

de las cinasas activadoras de la vía, existen múltiples fosfatasa con acción antagonista que catalizan la reacción opuesta y bloquean así la transducción de la señal (Haeusler RA, 2018).

Uno de los puntos de la vía donde existe este tipo de regulación es en la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), un lípido de membrana que actúa como segundo mensajero al ser fosforilado por cinasas como la PI3K de la vía de la insulina. La fosfatasa PTEN se encarga de inhibir la señalización en este punto al revertir la reacción desfosforilando PIP₃, resultando en su forma precursora fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), impidiendo así la acumulación de PIP₃, la cual es esencial para la transducción de la señal (Li YZ, 2020).

Resistencia a la insulina en condiciones fisiológicas y patológicas

La resistencia a la insulina se define como la pérdida de sensibilidad de los tejidos a esta hormona a concentraciones basales de insulina en plasma, por lo que se observa un decremento en la capacidad de los tejidos blanco de desencadenar los efectos moleculares, celulares y fisiológicos de la insulina. (Petersen MC, 2018).

Este fenómeno se presenta en condiciones fisiológicas como gestación, así como en ciertas patologías como el síndrome metabólico o la diabetes mellitus tipo 2.

En la resistencia a la insulina la acción defectuosa de esta hormona lleva a una disminución en la captación de la glucosa y la síntesis del glucógeno, lo cual repercute en los niveles de glucosa sanguíneos que permanecen altos; esto estimula la secreción de insulina y causa hiperinsulinemia. También, la resistencia a la insulina causa supresión defectuosa de la producción hepática de la glucosa (Czech MP, 2017).

Se han propuesto varios mecanismos como posibles causas del desarrollo de resistencia a la insulina: anormalidades genéticas en una o más proteínas participes en la vía de señalización de la insulina o su regulación, efectos de otras hormonas u adipocinas contrarreguladoras, efectos de citocinas provenientes de procesos inflamatorios, malnutrición fetal y patologías como la obesidad (Lebovitz HE, 2001).

Rol del receptor de insulina truncado

Múltiples estudios han descubierto un mecanismo de regulación de la señalización de receptores cinasa de residuos de tirosina, basado en la escisión proteolítica de estos receptores que participan en numerosos procesos celulares, y cuya desregulación está asociada a varias enfermedades (Huang H, 2021).

Específicamente sobre el receptor de insulina, se ha encontrado que este receptor puede sufrir cortes proteolíticos por la acción de diferentes enzimas: calpaina 2, la cual es secretada al espacio extracelular asociado a exosomas, es capaz de cortar directamente el ectodominio de la subunidad β del receptor de insulina. A su vez, este corte promueve el procesamiento intramembranal del receptor de insulina por la enzima γ -secretasa, lo que libera el fragmento del C-terminal del receptor de insulina (Yuasa T, 2016).

Otro estudio demostró que la enzima BACE1 puede también cortar el ectodominio del receptor de insulina, resultando en fragmentos de aproximadamente 45kDa. Estos fragmentos resultantes se denominan como receptor soluble a la insulina (sIR) o subunidad β del receptor de insulina truncado (IR- β') (Meakin PJ, 2018).

La escisión proteolítica del receptor de insulina dependiente de estas enzimas es capaz de regular la cantidad de receptor de insulina que se encuentra en la superficie de la membrana celular, por lo que también sería capaz de regular la sensibilidad a la insulina de las células blanco (Knutson VP, 1991).

Se ha determinado que el corte del receptor de insulina es suficiente para alterar negativamente la señalización de la insulina, pues al inhibir mediante knock-down las enzimas responsables de estos cortes proteolíticos, calpaina 2 y γ -secretasa, se logró reestablecer la activación de enzimas río abajo de la vía de señalización de la insulina. Además, el conocido fármaco de efecto hipoglucemiante, metformina, parece actuar parcialmente mediante este mecanismo, por ser un inhibidor de la liberación de calpaina 2 en los exosomas y así prevenir la escisión del receptor de insulina, reestableciendo la transducción de la señal (Yuasa T, 2016).

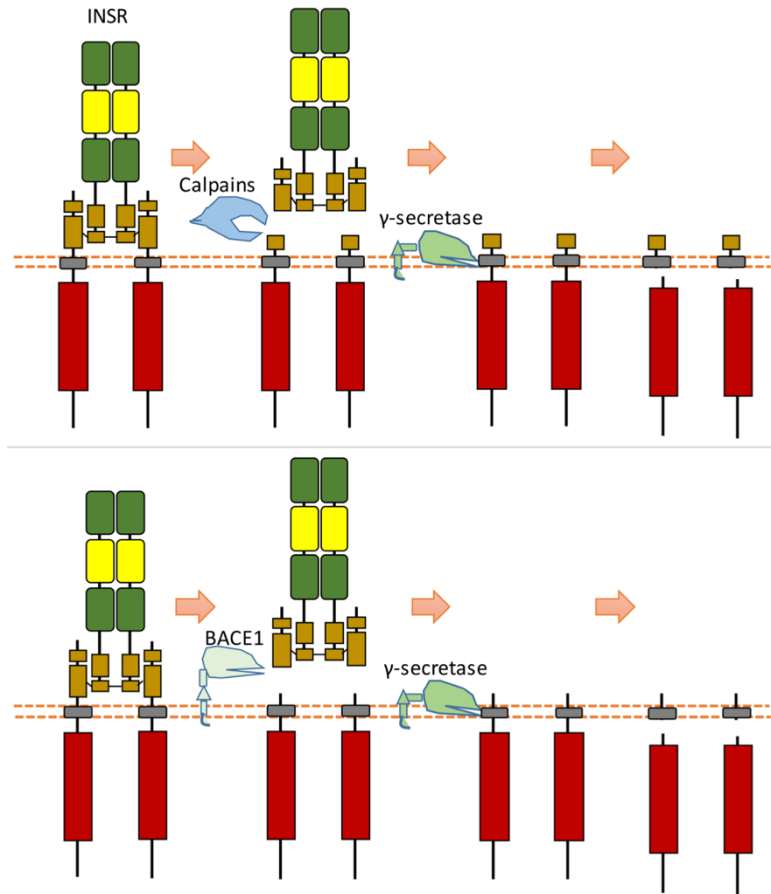


Figura 8. Escisión proteolítica del receptor de insulina por la acción de calpains, BACE1 y γ -secretasa (Huang H, 2021).

Adicionalmente, se ha propuesto otro mecanismo de acción del receptor de insulina soluble. Se ha demostrado que diversas líneas celulares, especialmente hepatocitos, son capaces de secretar la forma trunca del receptor de insulina en respuesta a una alta concentración de insulina (Papa V, 1993). Esta forma soluble al ser aún capaz de unirse a insulina libre en plasma, compite por esta unión con el receptor de insulina unido a la membrana celular, contribuyendo así a disminuir los efectos fisiológicos de la insulina en un estado hiperinsulinémico (Hiriart M, 2014).

Reforzando la idea de que la forma truncada del receptor de insulina juega un rol importante en el desarrollo de resistencia a insulina y patologías asociadas a este fenómeno, se ha encontrado que existe una correlación negativa entre los niveles en plasma del receptor de insulina soluble y la sensibilidad a la insulina, es decir, a mayores niveles de receptor de insulina soluble en plasma, mayor tendencia a desarrollar resistencia a la insulina (Yuasa T, 2016).

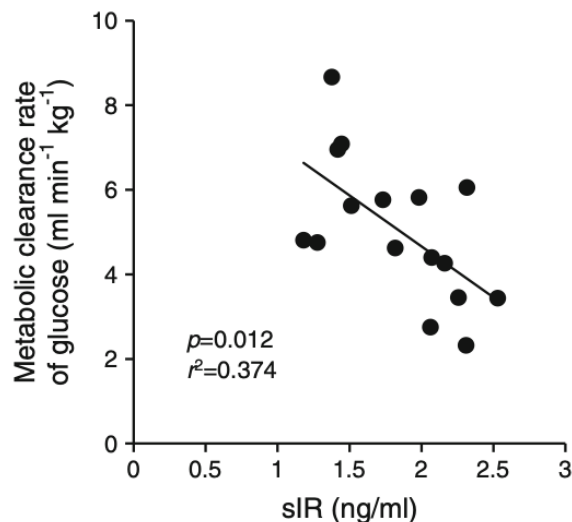


Figura 9. Correlación entre la resistencia a la insulina y la abundancia de sIR determinada por un clamp euglicémico-hiperinsulinémico (Yuasa T, 2016)

En pacientes con diabetes tipo 2, se han encontrado niveles aumentados del ectodominio del receptor de insulina soluble en plasma, comparado con personas sin diabetes y sin historial diabético en la familia (SIRSG, 2007).

Otro hallazgo indica que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 muestran niveles aumentados de BACE1 en plasma y de actividad enzimática de BACE1, que se relacionaron con un aumento de receptor de insulina soluble en plasma. Además, el estado glucémico de estos pacientes correlacionó con los elevados niveles de BACE1 y de la escisión del receptor de insulina, lo cual está relacionado con la resistencia a la insulina (Bao H, 2021).

Metabolismo durante la gestación

La gestación es un evento que representa un reto adaptativo en el que participan cambios anatómicos, fisiológicos y metabólicos en la madre, con el propósito de satisfacer las necesidades nutricionales y metabólicas del feto.

Las adaptaciones metabólicas en la madre incluyen el desarrollo de resistencia a la insulina, hiperlipidemia y cambios en el metabolismo de proteínas y aminoácidos. En conjunto, estos cambios aumentan la disponibilidad de nutrientes en favor del crecimiento de la unidad feto-placentaria (von Versen-Hoeynck FM, 2007).

Cambios metabólicos y fisiológicos en la gestación

La gestación es un estado dinámico, en donde se diferencian dos etapas metabólicamente distintas:

La primera etapa abarca los dos primeros tercios de la gestación, donde el crecimiento fetal es limitado y el metabolismo en la madre tiende al almacenamiento de nutrientes. Por ejemplo, existen cambios hormonales relacionados a la gestación que inducen cambios adaptativos en el hipotálamo materno, estimulando un aumento en la ingesta de alimento. Además, se observa un fenómeno de resistencia a la leptina, que inhibe los efectos supresores de apetito de esta hormona. Estos cambios adaptativos resultan en el aumento de depósitos de grasa que funcionan como almacenamiento de energía en preparación para la alta demanda energética de la gestación tardía y la lactancia (Augustine RA, 2008).

Por otro lado, durante esta etapa, la gluconeogénesis hepática se encuentra aumentada. Además, la utilización de glucosa por parte del tejido adiposo y el músculo esquelético disminuye (Bell AW, 1997). Mientras tanto, la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de glucosa en ayuno no se ven afectadas.

Durante la segunda etapa, que comprende el último tercio de la gestación, el crecimiento del feto es rápido, por lo que el metabolismo en la madre pasa de ser anabólico a catabólico, asegurando así el suministro continuo de nutrientes para el crecimiento fetal y placentario. Se promueve la utilización de depósitos de lípidos

en tejido adiposo como principal fuente de energía de la madre, preservando la glucosa y aminoácidos para el feto (Herrera E, 1988). Además, se observa un claro desarrollo de insulinoresistencia, en donde la sensibilidad a la insulina disminuye entre un 50-60% (Catalano PM, 2014).

Resistencia a la insulina en la gestación

Ya que durante el último tercio de la gestación las demandas nutricionales de la unidad feto-placentaria crecen al máximo, la madre desarrolla en este periodo resistencia a la insulina periférica, es decir, los tejidos blanco como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, muestran un decremento en la respuesta biológica a una dosis de insulina, ya sea endógena o exógena (Catalano PM, 2010). Por lo tanto, la habilidad de la insulina para suprimir la lipólisis se encuentra reducida, contribuyendo al aumento de ácidos grasos libres en plasma. Así mismo, disminuye el efecto supresor de la producción de glucosa hepática, por lo que esta se encuentra aumentada. Además, la captación de glucosa del músculo esquelético y el tejido adiposo se encuentra disminuida en la madre (Barbour LA, 2007). Este balance metabólico garantiza la provisión de nutrientes en favor del crecimiento del feto, incluso en condiciones donde la ingesta de nutrientes de la madre no es suficiente.

En mujeres con tolerancia a la glucosa normal, estos cambios en la sensibilidad a la insulina son compensados por una respuesta adaptativa en el páncreas. Se da un aumento en el número de células beta pancreáticas, así como en su capacidad de producir y secretar insulina. Al término de la gestación, la población de células beta en el páncreas se contrae y vuelve al tamaño original previo a la gestación. Sin embargo, en mujeres diabéticas, la secreción de insulina endógena durante la gestación no es suficiente para compensar la resistencia a la insulina (Kampmann U, 2019).

Cuando esta respuesta adaptativa por parte del páncreas falla y no es suficiente, la madre desarrolla diabetes gestacional, un estado patológico caracterizado por el desarrollo espontáneo de hiperglucemia (Baeyens L, 2016). Aunque la diabetes

gestacional suele resolverse después del parto, las mujeres que padecieron esta complicación durante el embarazo tienen una mayor tendencia a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en los años siguientes, en comparación con mujeres que tuvieron un embarazo con normogluemia (Bellamy L, 2009).

Regulación de la vía de señalización de la insulina durante la gestación

Diversos estudios han intentado encontrar el mecanismo molecular que da origen a la resistencia a la insulina en el último tercio de la gestación, sin embargo, conforme los hallazgos avanzan, se ha descubierto que este fenómeno más bien comprende un complejo sistema de regulación, en el que participan distintos factores que promueven el desarrollo de la resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se da por una falla en la señalización activada por esta hormona, resultando en una menor translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, que es el principal transportador responsable de la captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo. Como consecuencia de esta inadecuada captación de glucosa de las células, se presenta un estado de hipergluemia, característico de individuos con resistencia a la insulina (Plows JF, 2018).

En mujeres con gestación normal, se presenta un decremento del 50% en la captación de glucosa (Barbour LA, 2007). Esto está relacionado con una disminución en la señalización de la insulina posterior a la unión del ligando con su receptor.

Molecularmente, se ha encontrado que la fosforilación de la proteína sustrato del receptor de insulina, IRS-1, se encuentra disminuida en el músculo esquelético de mujeres gestantes, sugiriendo que existe una menor activación de la vía, lo que conduce a una menor capacidad de translocación de GLUT4 a la membrana de células musculares (Kirwan JP, 2004).

En músculo de mujeres gestantes obesas y con diabetes gestacional, también hay defectos en los primeros pasos de la señalización del receptor de insulina, pues la fosforilación en sitios de tirosina del receptor y de IRS-1 es menor en un ~37% y

~62%, respectivamente. Además, se encontró una disminución del ~44% en la expresión total de IRS-1 (Friedman JE, 1999).

Otro mecanismo que involucra a IRS-1 y parece influir en la resistencia a la insulina, se trata de un complejo sistema de regulación de IRS-1 basado en la fosforilación de sitios de serina/treonina, pues la fosforilación específica de ciertos de estos residuos en IRS-1 e IRS-2, han mostrado propiedades inhibitorias y se han asociado a una disminución en la fosforilación de residuos de tirosina, que en estas proteínas suelen ser activadoras (Copps KD, 2012). En tejido adiposo de ratas al final de la gestación (día 20), se encontró una mayor abundancia de IRS-1 fosforilado en el residuo Ser307, así como un decremento en la fosforilación en sitios de tirosina. La fosforilación específica en Ser307 usualmente se considera como inhibitoria y ha sido asociada a múltiples modelos de resistencia a la insulina (Sevillano J, 2007). Este mismo fenómeno se repite en músculo esquelético de mujeres con diabetes gestacional, quienes muestran un aumento del 62% en el nivel basal de IRS-1 fosforilado en Ser312 (Ser307 en ratones), así como un decremento en la fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1, que correlaciona con una mayor expresión de una cinasa de residuos de tirosina que es inhibitoria (Barbour LA, 2006).

PI3K puede también influir en la regulación de la resistencia a la insulina en mujeres embarazadas. Esta cinasa se compone de dos subunidades, la subunidad p85 α regulatoria y la p110 catalítica, las cuales se deben unir en un heterodímero a IRS-1 para formar PI3K activo. Un desbalance entre la expresión de estas dos subunidades tiene un impacto en la sensibilidad a la insulina, pues el monómero de p85 α en mayor abundancia competiría con el heterodímero p85 α -p110 para unirse a IRS-1, reduciendo así la activación de PI3K (Biddinger SB, 2006). En el músculo esquelético y tejido adiposo abdominal de mujeres obesas embarazadas, los niveles del monómero de p85 α se encuentran aumentados entre 1.5-2 veces, comparados con el de mujeres obesas no gestantes (Catalano PM, 2002).

Lo mismo se observó en el músculo esquelético de una población asiática de mujeres gestantes con diabetes mellitus. Los niveles totales de p85 α estaban

aumentados en este grupo, comparado con mujeres gestantes normoglucémicas, por lo que la actividad de PI3K era más baja. Además, se encontró que la expresión total de PKB (AKT) y GSK3- β , proteínas río abajo en la vía de señalización de la insulina, no mostraron diferencia significativa entre ambos grupos. Sin embargo, la fosforilación en sitios de serina de PKB y GSK3- β eran más bajos en el grupo gestante respecto al grupo control, indicando que una falla en la cascada de fosforilación de la vía de la insulina, podría ser la causa de la insulinoresistencia en la gestación (Zhang T, 2014).

En ratas al final de la gestación, tampoco se encontraron cambios en la expresión total del receptor de insulina, IRS-1, PI3K y PTEN; aunque la activación de algunas de estas proteínas de la vía de la insulina se vio disminuida, pues bajaron los niveles de fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina e IRS-1, así como la fosforilación en Ser473 de AKT (Sevillano J, 2007).

Finalmente, un análisis de PTEN, fosfatasa inhibitoria de la vía de la insulina, reveló que los niveles en plasma de esta enzima se encuentran aumentados en mujeres gestantes con diabetes gestacional, en comparación con mujeres gestantes normoglucémicas. Incluso se encontró que existe una correlación entre la alta concentración de PTEN en plasma y un aumento en el nivel de resistencia a la insulina, sugiriendo que PTEN podría participar en el desarrollo de la resistencia a la insulina durante la gestación (Li YY, 2015).

A continuación, se presenta una tabla que resume los cambios en la vía de señalización de la insulina ocurridos durante la gestación, en comparación con un estado no gestante:

Proteína	Tejido	Expresión	Fosforilación	Sitio	Referencia
IR	Músculo	=	↓	pTir	Saad MJ (1997)
IRS-1	Músculo	↓	↓	pTir	Kirwan JP (2004) Friedman JE (1999)
			↑	Ser307	Barbour LA (2006)
	Tejido Adiposo				Catalano PM (2002)
p85α (PI3K)	Músculo	↑	↓		Catalano PM (2002) Zhang T (2014)
	Tejido Adiposo		(actividad)		
AKT	Músculo	=	↓	pSer	Zhang T (2014)
GSK3-β	Músculo	=	↓		
PTEN	Plasma	↑			Li YY (2015)

ANTECEDENTES DIRECTOS

No existen estudios analizando concomitantemente el efecto de la gestación en diferentes tejidos sensibles a la insulina. En investigaciones previas en el laboratorio, se analizó la vía de señalización de la insulina en ratonas gestantes al día 17 de gestación en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco, los tres principales tejidos sensibles a la insulina. Los resultados revelaron que la expresión total y fosforilación de proteínas de la vía de señalización de la insulina difiere entre los tejidos previamente mencionados.

Específicamente, los estudios previos encontraron una disminución en la fosforilación de AKT (Thr308) en los tres tejidos, indicando una menor señalización de la insulina. En tanto que la fosforilación de la proteína GSK3- β (Ser9), la cual se encuentra río abajo de la vía, se encontró disminuida en el músculo esquelético, esta no mostró cambios en el tejido adiposo y se vio aumentada en el hígado, lo que sugiere que el hígado, pero no el músculo, es capaz de activar la síntesis de glucógeno independientemente de la vía de señalización la insulina.

El análisis de la expresión total y la fosforilación inhibitoria en el residuo Ser380 de la fosfatasa PTEN, una proteína de acción inhibitoria en la vía de señalización de la insulina reveló los siguientes resultados. En el hígado se observó una disminución del 43% en los niveles de fosforilación de PTEN (Ser380), un aumento del 58% en la expresión de la proteína total y de casi 300% en la abundancia del ARNm de *Pten*; en el tejido adiposo no hubo cambios en la proteína fosforilada, pero en la proteína total y en el ARNm se observaron incrementos del 35% y 50%, respectivamente. El aumento observado en la proteína total y en el mensajero de PTEN en el hígado y en el tejido adiposo sugiere fuertemente que la inactivación de AKT en la gestación se encuentra ligada a un aumento en esta proteína.

En divergencia con estos resultados, la fosforilación de PTEN y la proteína total no se vieron modificadas en el músculo; sin embargo, el descenso en la activación la vía de señalización de la insulina en el músculo durante la gestación es persistente en este y otros estudios previos, lo que sugiere la influencia de otros mecanismos

en la inhibición de la señalización de la insulina mediante la disminución de AKT-fosforilada en el músculo

Un estudio en ratas encontró que los defectos en la transducción de señal de la insulina observados en el hígado y el músculo de ratas gestantes se debía en parte a que la autofosforilación del receptor de insulina en respuesta a un estímulo de insulina disminuyó 30% en el músculo en el día 20 de gestación (Saad MJ, 1997), sin embargo, en este estudio usaron un anticuerpo anti-fosfotirosinas, que determina de manera general el estado fosforilado de una proteína. Además, el artículo de Saad MJ carece de una proteína de referencia para los experimentos de inumodetección, lo que resta confiabilidad a los resultados reportados.

Por otro lado, se ha encontrado que la abundancia del receptor de insulina trunco en plasma está inversamente relacionada a la sensibilidad a la insulina en condiciones fisiológicas, por lo que se ha asociado el aumento de esta forma del receptor de insulina (IR- β') con una mayor tendencia a desarrollar resistencia a la insulina (Yuasa T, 2016).

En conjunto, estos antecedentes sugieren que la regulación del receptor de insulina a diferentes niveles puede tener un rol en la resistencia a la insulina observada en el último tercio de la gestación en ratonas, especialmente en el músculo esquelético, donde la baja actividad de PTEN observada, no explica la inhibición de la vía de señalización de la insulina en este modelo de estudio.

PLANTEAMIENTO

La resistencia a la insulina es la pérdida de sensibilidad a esta hormona, que se ve reflejada en una disminución en la capacidad de los tejidos blanco de activar las funciones fisiológicas de la insulina. En múltiples modelos animales, incluido el humano, se ha observado que durante el último tercio de la gestación se desarrolla resistencia a la insulina.

Estudios previos realizados en ratonas gestantes encontraron una disminución en la fosforilación Tir308 de la proteína AKT en el hígado, músculo y el tejido adiposo, indicando una menor señalización de la insulina. En el hígado y en el tejido adiposo, esta disminución correlaciona con incrementos en la expresión de PTEN, una proteína inhibitoria de la vía de señalización de la insulina, lo que sugiere fuertemente que la inactivación de AKT en estos tejidos se encuentra ligado a un aumento en esta proteína. Sin embargo, la fosforilación y expresión total de PTEN, no se vieron modificadas en el músculo esquelético, por lo que este mecanismo no explica la disminución de la expresión de la forma activa de AKT en este tejido.

Dado que el receptor de insulina es un paso esencial en la vía de señalización de la insulina, esta molécula es sensible a múltiples mecanismos de regulación, los cuales pueden verse alterados en condiciones tanto fisiológicas, como patológicas. Específicamente, el receptor de insulina puede ser desfosforilado por la acción de fosfatasas y escindido por proteasas, disminuyendo así su actividad como transductor de la señal de la insulina. Estos mecanismos inhibitorios han sido descritos como partícipes en el desarrollo de múltiples modelos de resistencia a la insulina, por lo que se consideran potenciales mecanismos responsables de la disminución en la activación de AKT y resistencia a la insulina observadas en el músculo esquelético de ratonas durante el último tercio de la gestación.

En este estudio se propone analizar los cambios en la expresión y fosforilación del receptor de insulina, además de la expresión de la forma truncada de la cadena β del receptor de insulina (IR- β'), buscando determinar el rol de estos factores en la resistencia a la insulina observada hacia el final de la gestación en condiciones fisiológicas, específicamente en el tejido muscular.

HIPOTESIS

Existe una desregulación en la expresión y fosforilación del receptor de insulina y mayor abundancia de la cadena β truncada del receptor de insulina en el músculo esquelético de ratonas C57/BL6 en el día 17 de la gestación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles del ARNm del gen del receptor de insulina, los niveles de proteína del receptor de insulina total y su forma fosforilada, además de la abundancia de su forma trunca en músculo esquelético de ratonas C57/BL6 en el día 17 de la gestación y ratonas control no gestantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

En el músculo esquelético de las ratonas gestantes y no gestantes:

- Determinar los niveles de expresión del ARNm de la isoforma B del receptor de insulina.
- Evaluar los niveles de expresión de la proteína total de la cadena β del receptor de insulina.
- Evaluar los niveles de activación del receptor de insulina al medir los niveles de expresión de la cadena β fosforilada en el residuo Tir1150.
- Determinar la abundancia de la forma truncada del receptor de insulina.

METODOLOGÍA

Modelo Animal

Para este estudio se usaron ratones hembra y macho de la cepa C57/BL6 provistos por la empresa Harlan Laboratories. Los ratones se mantuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y fueron manejados de acuerdo a los principios de cuidado animal NOM-062-ZOO-1999; (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría (Proyecto 031/2015) y por el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (242).

Durante todo el experimento, los ratones se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* sin modificaciones en la dieta regular rica en nutrientes, y bajo ciclos de 12 horas de luz - 12 horas de oscuridad. Para cada lote de ratones, dos ratonas hembra de ocho semanas de edad fueron dispuestas en cajas de cruce con un ratón macho por 24 horas. Posteriormente, el ratón macho fue removido de la caja y el peso de las hembras fue monitoreado diariamente. Aquellas ratonas hembra que presentaron un aumento de peso significativo dentro de la primera semana posterior a la cruce, fueron determinadas como ratonas gestantes y fueron aisladas en cajas individuales. Las ratonas que resultaron preñadas fueron sacrificadas en el día 17 de la gestación, mientras que las ratonas no preñadas fueron sacrificadas el mismo día como el grupo control.

Curvas de sensibilidad a la insulina

Al día 17 de la gestación, se les administró a las ratonas gestantes como no gestantes en no ayuno, insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Lilly) a una concentración de 1 Unidad Internacional por kilogramo de peso del ratón (1UI/kg), vía inyección intraperitoneal. Se tomó una pequeña muestra de sangre de la vena de la cola del ratón, e inmediatamente se determinó la concentración de glucosa

plasmática con ayuda de un glucómetro y tiras reactivas (Freestyle Optium, Abbott). Esta medición se realizó antes de la inyección, 15 y 30 minutos después de esta, tiempos denominados como minuto 0, minuto 15 y minuto 30, respectivamente. Este procedimiento se realizó en 9 ratonas no gestantes y en 14 ratonas gestantes. Los valores de concentración de glucosa plasmática se registraron para posteriormente obtener una curva de sensibilidad a la insulina.

Obtención de tejido

Transcurridos 30 minutos posteriores a la inyección de insulina, las ratonas fueron anestesiadas a nivel sistémico vía inhalación con sevoflurano (Sevorane, Abbott), para su posterior sacrificio y disección de tejidos, donde se obtuvieron fracciones de aproximadamente 150 mg de músculo esquelético del cuádriceps femoral.

Una fracción destinada a la extracción de proteína total se colocó en un tubo de 1.5 ml para su inmediata congelación en nitrógeno líquido, mientras que una segunda fracción destinada a la extracción de ARNm total fue colocada primero en 1ml de TRIzol Reagent (Ambion, Life Technologies), para después también ser congelado en nitrógeno líquido. Todas las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su utilización experimental.

Análisis de expresión transcripcional

Extracción de ARNm total

De todas las muestras de músculo esquelético previamente congeladas en 1 ml de TRIzol a -80°C, se extrajo el ARNm total siguiendo un protocolo basado en crear un gradiente de concentración con TRIzol y cloroformo.

Primero, las muestras se descongelaron en hielo. Una vez estando completamente descongeladas, se pasaron a tubos estériles para su posterior homogenización que se realizó por 12 segundos con ayuda de un homogeneizador motorizado (POLYTRON PT 10/35, Kinematica). Se transfirió el homogenizado a tubos de 1.5

ml y se agregaron 200 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich), dejándolos en reposo por 5 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,500 rpm por 15 minutos a 4°C, resultando en la separación de la muestra en tres fases. Se recuperó cuidadosamente, sin tocar la fase intermedia, el sobrenadante que contiene el RNA. A continuación, se agregaron 700 μ l de isopropanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich) en cada muestra y se dejó en reposo por 10 minutos en hielo. Se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm por 10 minutos a 4°C.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante para conservar solamente la pastilla en el fondo del tubo. Se realizaron lavados a cada una de estas pastillas agregando 1 ml de etanol al 75% de grado biología molecular (Millipore), previamente refrigerado a -20°C, e inmediatamente se centrifugó a 8500 rpm por 5 minutos a 4°C. Este paso de lavado se repitió 3 veces.

Posterior al último lavado, se retiró por completo el etanol del tubo, y las muestras se dejaron secar por 60 minutos a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar. Una vez completamente seco, se resuspendió la pastilla en 100 μ l de agua desionizada pretratada con DEPC al 0.1%. Las muestras se congelaron a -80°C.

Cuantificación de ARN y retrotranscripción

Mediante el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), se determinó la cantidad y pureza del ARN obtenido de las muestras de tejido muscular. Se colocó 1 μ l de muestra sobre el lector del equipo y se realizó la lectura de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Solo se tomaron en cuenta las muestras que mostraron un cociente 260/280 mayor a 1.8 y una concentración de ARN total mayor a 100 μ g/ μ l. El ARN se retrotranscribió a ADNc usando el estuche de reactivos Reverse Transcription (Invitrogen) siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Los reactivos y concentraciones usadas se especifican en la siguiente tabla. El volumen de la reacción final fue de 20 μ l.

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5x	4 μ l

DTT (0.1%)	2 μ l
dNTP Mix 10 mM	1 μ l
Transcriptasa Reversa MuLV	1 μ l
Oligo dT	0.5 μ l
Random Primers	0.5 μ l
ARN (1000 ng) + Agua DEPC (0.1%)	11 μ l
Volumen total	20 μ l

Los tubos con la reacción se colocaron en un termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) siguiendo el siguiente protocolo: 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 37°C y 30 minutos a 4°C. Este ciclo se repitió dos veces.

qRT-PCR

Se evaluó la expresión relativa del ARNm del gen *InsR* que codifica para el receptor de insulina. Para esto, las muestras de ADNc se sometieron a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un termociclador cuantitativo y en tiempo real (qRT). Las reacciones se prepararon siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante del reactivo SYBR Green (Applied Biosystems). Los volúmenes y reactivos usados se detallan a continuación e indican los valores usados por cada tubo de reacción.

Reactivo	Volumen
Master Mix SYBR Green	5 μ l
cDNA (muestra)	1 μ l
Oligonucleótido sentido	0.5 μ l
Oligonucleótido anti-sentido	0.5 μ l
Agua DEPC (0.1%)	3 μ l
Volumen total	10 μ l

Este
constó de

experimento
una n = 7

para el grupo no gestante y una n = 12 para el grupo gestante, además se prepararon triplicados de cada muestra.

Cada tubo con la reacción se colocó en el equipo StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher) y se sometieron a 40 ciclos de reacción. El programa del equipo determinó automáticamente para cada gen el valor Ct, que indica el número de ciclo umbral en el que el equipo detecta señal de amplificación.

Los oligonucleótidos usados como cebadores fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Es importante resaltar que los oligonucleótidos para amplificar la secuencia el ARNm del gen *InsR* se diseñaron para amplificar específica y exclusivamente la isoforma B de este gen, la cual contiene el exón 11, a diferencia de la isoforma A. Fue necesario tomar esta consideración ya que solo la isoforma B es de interés, pues es esta la que participaría en el fenómeno metabólico que se está estudiando. La expresión relativa del ARNm de *InsR* fue analizada usando el método de doble-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$), que revela el cambio en la expresión del ARNm de interés, relativo a la expresión de un gen de referencia usado como control interno. En este caso se usó el gen que codifica para β -actina.

Las secuencias usadas para los oligonucleótidos son las siguientes:

ARNm NCBI Reference	Oligo	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Amplificación (pb)
InsR NM_001330056.1	Sentido	ACCTCTTCAGGCAATGGTGC	60.61	153
	Anti-sentido	CCTGTGCTCCTCCTGACTTG	60.04	
β -actina NM_007393	Sentido	CCACCATGTACCCAGGCATT	62.00	92
	Anti-sentido	AGGGTGTA AACGCAGCTCA	60.02	

Análisis de expresión traduccional

Extracción de proteína total

El tejido muscular en congelación se homogenizó en buffer de lisis (HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, pH 8.0) complementado con inhibidor de proteasas y fosfatasas (MiniComplete, Roche), y con ayuda de un homogeneizador mecánico (POLYTRON PT 10/35, Kinematica).

El homogenizado se centrifugó a 12,500 rpm por 45 minutos, para después recuperar cuidadosamente el sobrenadante, el cual fue almacenado a -80°C hasta el día de su uso.

Determinación de la concentración de proteínas

Posterior a la lisis del tejido, se siguió el método de Bradford para determinar la concentración de proteína total en los homogenizados, usando el kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Se preparó una curva estándar con albúmina bovina sérica (BSA, Sigma-Aldrich) en un rango de 0 a $12.5\ \mu\text{g/mL}$.

Se tomó $1\ \mu\text{L}$ de muestra y se diluyó en $799\ \mu\text{L}$ de agua desionizada, para después agregar $200\ \mu\text{L}$ de reactivo de Bradford e incubar por 5 minutos. Con ayuda de un espectrofotómetro se midió la absorbancia de las muestras y la curva estándar a una longitud de onda de 595 nm. Con los valores de la curva estándar de albúmina se hizo una regresión lineal que arrojó una ecuación para calcular la concentración de proteína en las muestras homogenizadas a partir del valor de absorbancia obtenido.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Mediante la separación de proteínas de las muestras homogenizadas por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior inmunodetección, técnica también conocida como Western Blot, se analizó la expresión relativa de las proteínas de interés: IR- β , p-IR- β e IR- β' (receptor de insulina total, su forma

fosforilada y su forma trunca, respectivamente). Para este experimento se usó una $n = 8$ para el grupo no gestante, así como para el grupo gestante.

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 10% (bis-acrilamida 30%, SDS 10%, Tris 1.5 M pH 8.8, persulfato de amonio 10%, TEMED). Una vez conocida la concentración de proteínas en los homogenizados, se preparó el volumen de muestra necesario para cargar 100 μg de proteína. Este volumen se resuspendió en buffer de carga (Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 0.01%, glicerol 10% y β -mercaptoetanol 14.3M) y agua desionizada, para posteriormente poner las muestras en tubos de 1.5 mL en un tanque de agua en ebullición por 5 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó el producto Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad Laboratories). La electroforesis de las muestras se realizó usando una cámara electroforética con buffer de corrida (Tris-base 50 mM, glicina 190 mM, SDS 10%), primero a 80 V por 30 minutos y después a 120 V por 2 horas más.

Una vez concluido el tiempo de corrida, se realizó la electrotransferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida, a membranas de nitrocelulosa, usando una cámara de transferencia con buffer de transferencia (Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 %, SDS 10%) y aplicando una corriente a 120 V por 90 minutos. Al terminar. Las membranas fueron lavadas en solución TBS-Tween (Tris-base 50 mM, NaCl, Tween 0.1%, pH 7.6) dos veces durante 5 minutos, para después ser incubadas en solución de rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich), que ratificó la correcta transferencia de proteínas a la membrana. Para desteñir las membranas, se lavaron de nuevo con TBS-Tween 0.1% hasta que la tinción fue removida.

Inmunodetección

Para detectar las proteínas de interés, se hizo uso de anticuerpos específicamente afines estas proteínas. Sin embargo, para evitar uniones inespecíficas, las membranas fueron bloqueadas al ser incubadas en solución de bloqueo (Tris-base 50 mM, NaCl, Tween 0.1%, BSA 5%, pH 7.6) durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el bloqueo, las membranas se incubaron con los

anticuerpos primarios enlistados en la siguiente tabla, durante 24 horas en refrigeración a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en agitación con TBS-Tween 0.1% tres veces durante 5 minutos y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes, también enlistados a continuación. Una vez más, las membranas fueron lavadas en agitación con TBS-Tween 0.1% tres veces durante 5 minutos.

El anticuerpo secundario contiene la enzima HRP, por lo que para detección de las bandas donde el anticuerpo se unió, se utilizó el estuche de reactivos Immobilon Western (Millipore Corp), el cual cataliza una reacción quimioluminiscente que se revela como una banda brillante, detectable con el equipo Fusion FX (Vilber).

Fotografías de las bandas fueron tomadas en colores inversos y la densitometría óptica de las bandas fue cuantificada usando el programa ImageJ (NIH).

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Marca	Dilución	Peso Molecular
Anti-IR-β	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	IR-β: 95kDa IR-β': 45kDa
Anti-phospho-IR-β (Tir1150)	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	95kDa
Anti-α-tubulina	Santa Cruz Biotechnology	1:2000	55kDa
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Marca	Dilución	
Anti-mouse IgG, HRP	Cell Signaling Technology	1:10,000	

Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico, se usó el programa Prism 8.0 (GraphPad Software). La prueba estadística aplicada para determinar diferencias significativas entre nuestros grupos de estudio fue la prueba t-Student, ya que los datos siempre mostraron una distribución normal, determinada por la prueba Shapiro-Wilk.

Para determinar significancia estadística en el análisis, se consideró un p valor menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Sensibilidad a la insulina en el día 17 de la gestación

Con el fin de determinar si durante el final de la gestación existe una alteración en la sensibilidad a la insulina en ratonas en estado de no ayuno, se realizaron experimentos de sensibilidad a la insulina en ratonas en el día de 17 de la gestación, que fueron comparados con los datos obtenidos de ratonas no gestantes de la misma edad (a partir de aquí, el grupo control). El valor promedio de concentración de glucosa plasmática en el minuto 0 (previo a la inyección) fue de 126 mg/dl para el grupo control y de 116 mg/dl para el grupo gestante, mientras que en el minuto 30 posterior a la inyección de insulina, los valores promedio fueron de 70 mg/dl para el grupo control y de 83 mg/dl para el grupo gestante. Los valores obtenidos se encuentran reportados en la Tabla 1.

No. Ratona	Concentración de glucosa plasmática (mg/dl)				Disminución de glucosa plasmática (%)	
	No Gestantes		Gestantes		No Gestantes	Gestantes
	Minuto 0	Minuto 30	Minuto 0	Minuto 30	Minuto 30	Minuto 30
1	136	74	133	128	45.59	3.76
2	125	56	144	92	55.20	36.11
3	150	79	124	112	47.33	9.68
4	116	62	78	89	46.55	-14.10
5	109	78	134	103	28.44	23.13
6	118	75	118	76	36.44	35.59
7	131	74	110	84	43.51	23.64
8	126	70	121	73	44.44	39.67
9	128	64	115	64	50.00	44.35
10			110	90		18.18
11			106	64		39.62
12			122	59		51.64
13			107	65		39.25
14			112	65		41.96
PROMEDIO	126.56	70.22	116.71	83.14	44.17	28.03

Tabla 1. Concentraciones de glucosa plasmática. Valores de concentración de glucosa plasmática obtenidos antes de la inyección de insulina (1 UI/kg) y 30 minutos después; se reportan valores absolutos y porcentaje de disminución de glucosa plasmática respecto a la concentración inicial. NOTA: La discrepancia entre el número de ratonas usadas para cada grupo experimental, se debe a que el desarrollo de resistencia a la insulina durante la gestación es variable entre individuos, así que para encontrar una diferencia significativa, es necesario contar con un grupo experimental más amplio para el grupo gestante.

La diferencia en la disminución promedio de la concentración de glucosa plasmática en respuesta a una dosis de insulina entre ambos grupos se presenta en la figura 1. En el grupo control, la concentración de glucosa plasmática al minuto 30 disminuye en promedio un 45% respecto a la concentración inicial en el minuto 0, mientras que en el grupo gestante se observa una disminución del 28%. Claramente la concentración promedio disminuye en menor proporción para el grupo gestante respecto al grupo control.

Estos resultados demuestran que existe un 17% más de resistencia a la insulina en ratonas al día 17 de gestación, comparado con ratonas de la misma edad no gestantes.

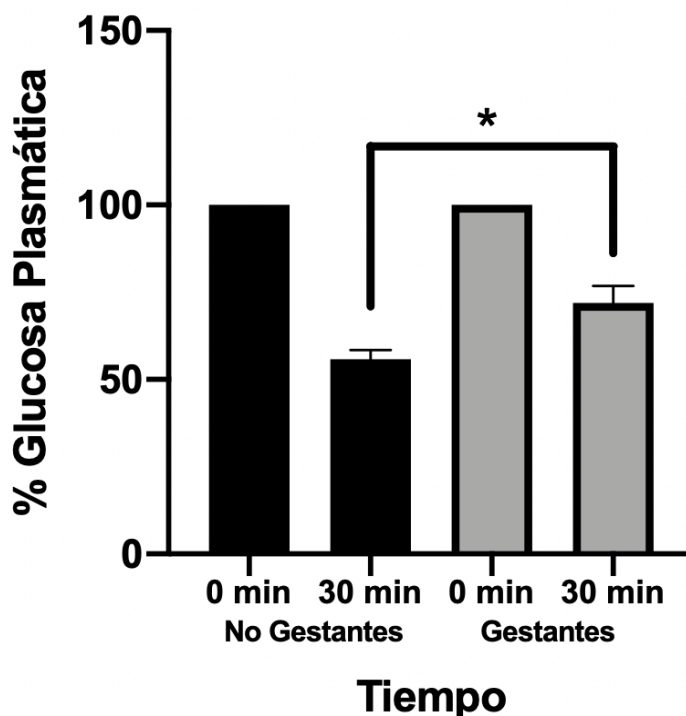


Figura 1. Disminución de la concentración de glucosa plasmática. Las barras en la gráfica representan el promedio porcentual de la concentración de glucosa plasmática y cómo disminuye respecto al valor de concentración inicial antes de la inyección de insulina, el cual representa el 100%. No gestantes (n=9), gestantes (n=14). Las barras muestran el error estándar. Prueba t de student ($p < 0.05$)

Expresión del ARNm del receptor de insulina en músculo

Se analizó por la técnica de RT-PCR la abundancia del ARNm del receptor de insulina, el cual es el primer paso en la transducción de la señal de la insulina. Los datos se normalizaron con la expresión del ARNm de β -actina que fue usado como gen de referencia. El análisis mostró un promedio de 1.06 U.A. (Unidades Arbitrarias) de expresión en el músculo de ratonas gestantes, relativa al grupo no gestante. La prueba estadística t-student no mostró una diferencia significativa en estos resultados.

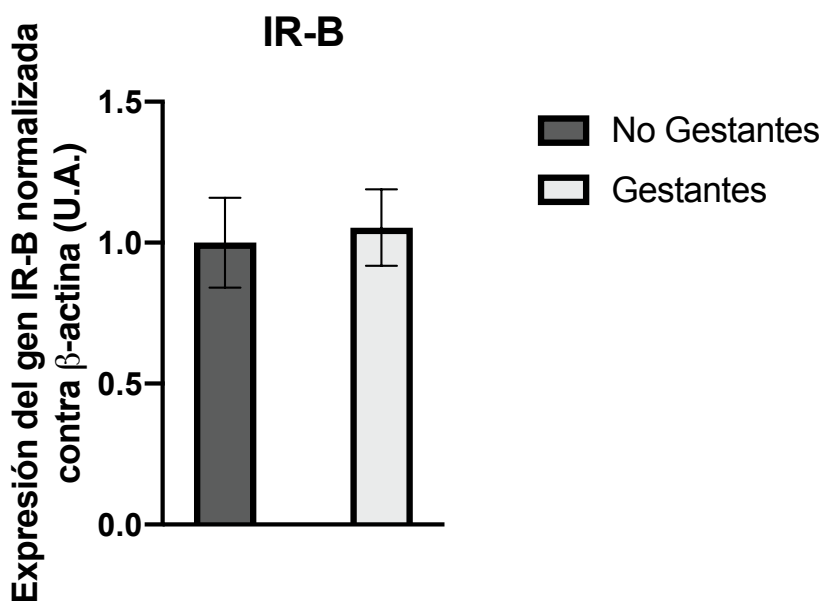


Figura 2. Expresión del ARNm de IR-B. Análisis por RT-PCR de la expresión total del ARNm de la isoforma B del gen InsR en muestras de músculo de ratonas en el día 17 de la gestación y no gestantes. No gestantes (n=7), gestantes (n=12). Las barras muestran el error estándar. Prueba t de student: no significativo.

Expresión de proteína total del receptor de insulina en músculo

Mediante la técnica de Western Blot, se evaluó la expresión de proteína total del receptor de insulina, usando anticuerpos para detectar la cadena β del receptor que tiene un peso aproximado de 95 kDa. Los datos se normalizaron con la expresión de la proteína de referencia α -tubulina, con un peso aproximado de 55 kDa. El análisis mostró un promedio de 4958 ± 401 D.O. (unidades de Densidad Óptica) en el grupo gestante y un promedio de 4191 ± 431 D.O. en el grupo control. La prueba estadística t-student no mostró una diferencia estadísticamente significativa en estos resultados.

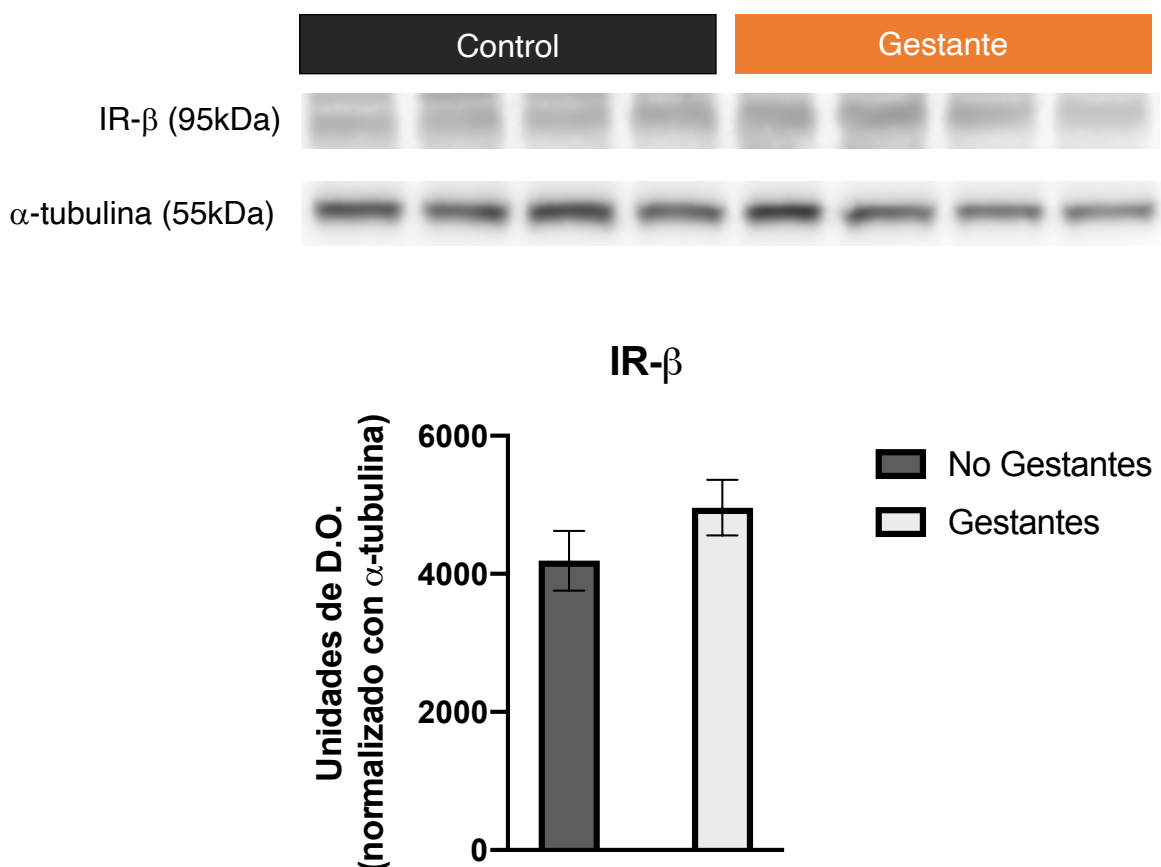


Figura 3. Expresión de proteína total de IR- β .

Análisis por Western Blot de la expresión de proteína total de la cadena β del receptor de insulina en muestras de músculo de ratonas no gestantes y en el día 17 de la gestación y. No gestantes (n=7), gestantes (n=12). Las barras muestran el error estándar. Prueba t de student: no significativo.

Fosforilación del receptor de insulina en músculo

Mediante la técnica de Western Blot, se evaluaron los niveles de fosforilación del receptor de insulina, usando anticuerpos para detectar la cadena β del receptor fosforilada en el residuo Tir1150 específicamente, la cual tiene un peso aproximado de 95 kDa. Los datos se normalizaron con la expresión de la proteína de referencia α -tubulina, con un peso aproximado de 55 kDa. El análisis mostró un promedio de 4254 ± 882 D.O. en el grupo gestante y un promedio de 2791 ± 419 D.O. en el grupo control. La prueba estadística t-student no mostró una diferencia significativa en estos resultados.

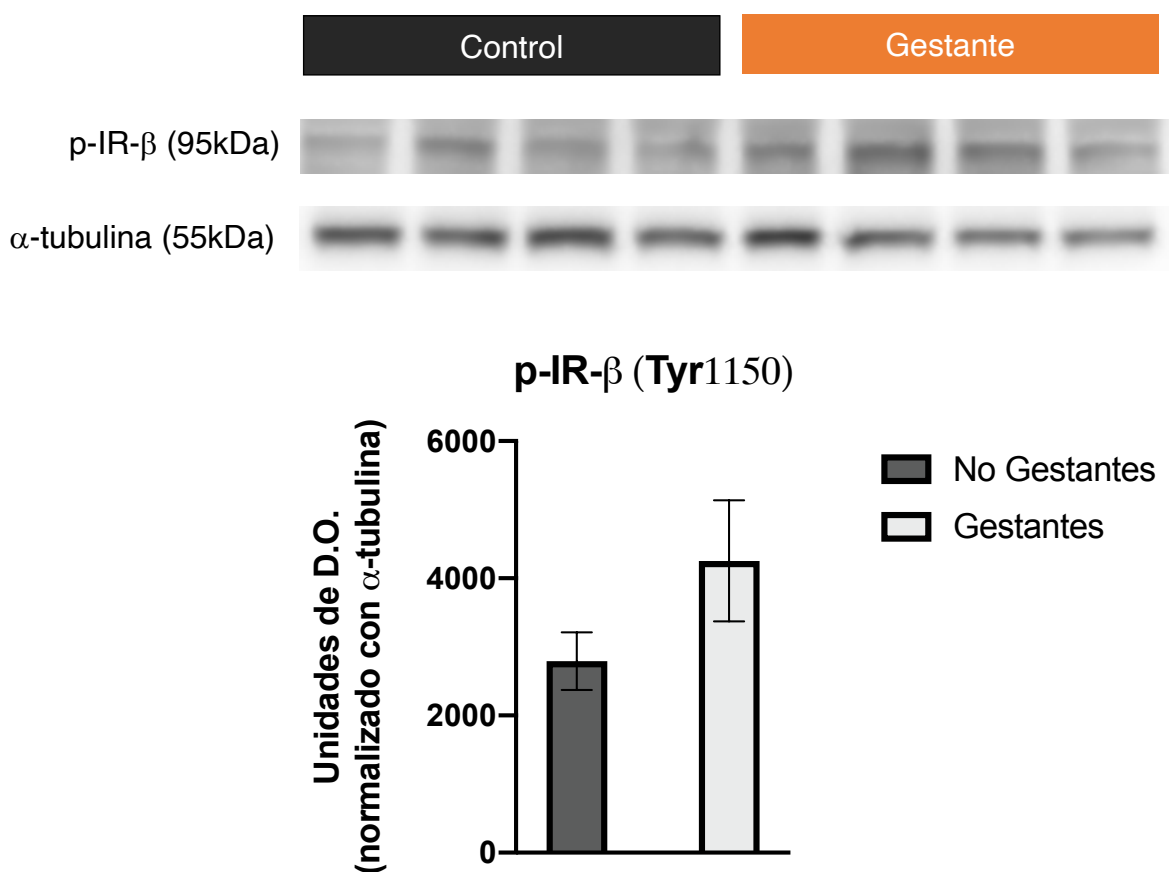


Figura 4. Fosforilación de IR- β .

Análisis por Western Blot de la expresión la forma fosforilada en el residuo Tir1150 de la cadena β del receptor de insulina, en muestras de músculo de ratonas no gestantes y en el día 17 de la gestación. No gestantes (n=7), gestantes (n=12). Las barras muestran el error estándar. Prueba t de student: no significativo.

Expresión del receptor de insulina truncado en músculo

Se evaluó la expresión proteica de la forma truncada del receptor de insulina, usando anticuerpos para detectar la cadena β , que revelan la forma truncada del receptor con un peso aproximado de 45 kDa. Los datos se normalizaron con la expresión de la proteína de referencia α -tubulina, de peso aproximado de 55 kDa. El análisis mostró un promedio de $24,610 \pm 3043$ D.O. en el grupo control y un promedio de $39,483 \pm 4911$ D.O. en el grupo gestante. En la figura 5, podemos ver representado este aumento promedio del 60% ($\Delta 14,873$ D.O.) en el grupo gestante, respecto al grupo control. La prueba estadística t-student mostró una diferencia significativa, demostrando que existe una mayor abundancia de la forma truncada del receptor de insulina en el músculo esquelético de ratonas gestantes, comparada con el grupo no gestante.

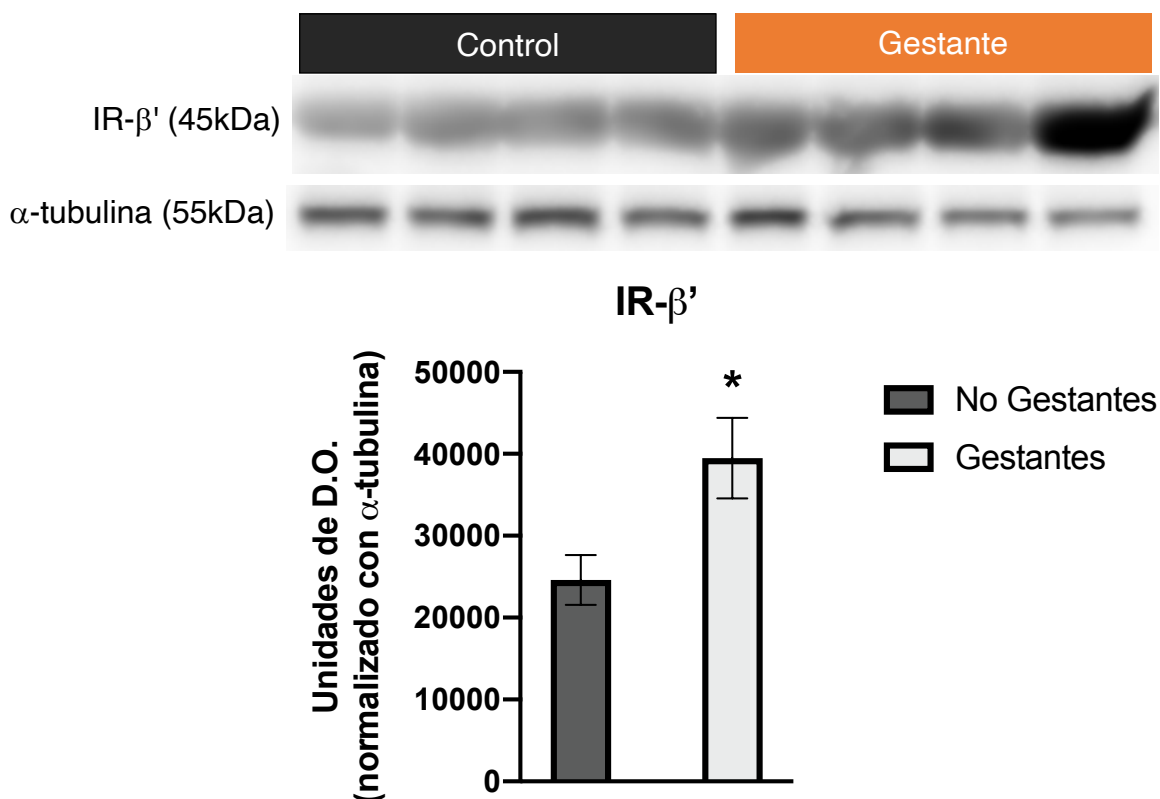


Figura 5. Expresión de la forma trunca IR- β '.

Análisis por Western Blot de la expresión la forma truncada del receptor de insulina, en muestras de músculo de ratonas no gestantes y en el día 17 de la gestación. No gestantes (n=7), gestantes (n=12). Las barras muestran el error estándar. Prueba t de student ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Durante el último tercio de la gestación, existe una alta demanda de nutrientes de parte del feto. Por lo tanto, resulta necesario para la madre desarrollar mecanismos que mantengan satisfechos estos requerimientos nutricionales. Se ha propuesto que el desarrollo de resistencia a la insulina durante el último tercio de la gestación funciona como un mecanismo adaptativo, en donde la sensibilidad a la insulina de la madre se ve disminuida, lo cual provoca cambios metabólicos que garantizan el suministro adecuado de carbohidratos al feto. (Sonagra AD, 2014)

El estudio a nivel molecular de este fenómeno ha revelado que múltiples elementos de la vía de señalización de la insulina, pueden estar participando en el desarrollo de resistencia a la insulina gestacional, sin embargo, los mecanismos exactos detrás de este evento aún son poco claros.

Uno de los potenciales elementos clave en modelos de resistencia a la insulina ha sido el receptor de insulina, pues este es sensible a regulación a diferentes niveles: transcripcional, traduccional, y mediante modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación y la escisión proteolítica. Esto lo convierte en un blanco regulatorio de la vía de señalización de la insulina, cuya alteración puede conducir al desarrollo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, los resultados de este estudio proponen al receptor de insulina como un posible nodo regulatorio participe en el desarrollo de resistencia a la insulina al día 17 de gestación en el músculo esquelético de ratonas de la cepa C57/BL6.

Primeramente, los resultados obtenidos mediante los ensayos de sensibilidad a la insulina (Figura 1) corroboraron hallazgos previos y validó nuestro modelo de resistencia a la insulina gestacional, ya que el grupo de ratonas gestantes mostró una disminución en la respuesta hipoglucemiante estimulada por la administración de 1UI/kg de insulina humana, mostrando en promedio una disminución del 28% de la concentración inicial de glucosa, mientras que en el grupo no gestante disminuyó en promedio un 45%, demostrando así la presencia de resistencia a la insulina en el grupo gestante.

Ya que este estudio propone que el receptor de insulina podría estar participando en este fenómeno de resistencia a la insulina en la gestación, los experimentos se enfocaron en evaluar la regulación del receptor de insulina a distintos niveles. El análisis de la expresión del ARNm de la isoforma B del receptor de insulina (Figura 2) reveló que no existen diferencias entre el grupo gestante y el grupo no gestante, por lo que una desregulación a nivel transcripcional fue descartada. Al evaluar la expresión de la proteína total de la cadena β del receptor de insulina (Figura 3), no se encontró cambio en el grupo gestante cuando fue comparado con el grupo no gestante, sugiriendo que al menos los niveles de proteína de la cadena β no se alteran, ni forma parte de un mecanismo participe en la resistencia a la insulina gestacional.

Previamente ha sido ampliamente demostrado que el receptor de insulina es altamente sensible a regulación por fosforilación, pues su activación e inactivación dependen de estas modificaciones post-traduccionales (Wei L, 1995). Además, se ha reportado que pacientes con diabetes gestacional exhibieron una disminución en la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina en el músculo esquelético, indicando una menor activación de éste (Chu YL, 2014). Consecuentemente, se decidió evaluar la abundancia de el receptor de insulina en su forma fosforilada, específicamente en el residuo de tirosina 1150, la cual se considera como una forma activa. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa en este análisis (Figura 4), por lo que la activación del receptor de insulina parece no estar alterada durante la gestación. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Saad et. al. (1997), en donde se encontró que ratas al día 20 de gestación, mostraron una disminución del 30% en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, respecto al grupo de ratones vírgenes. Aunque ambos estudios fueron realizados en roedores, los experimentos en esta tesis fueron realizados en ratones, mientras que Saad e. al. trabajaron con ratas, por lo que es posible que la diferencia entre especies explique la discrepancia en los resultados reportados.

Ya que nuestros experimentos no mostraron diferencia significativa, es posible que la discrepancia se deba a diferencias técnicas experimentales, pues ellos utilizaron

un anticuerpo que determina el estado fosforilado de una proteína sin ser específico en el sitio de fosforilación, mientras que nuestro estudio usó un anticuerpo que detecta la fosforilación específica del sitio Tir1150.

Finalmente, se evaluó la abundancia de la forma trunca o soluble del receptor de insulina (Figura 5). Esta forma es el resultado de la escisión del receptor de insulina por acción de calpaínas, enzimas activadas en respuesta a diversos estímulos que realizan cortes proteolíticos en el receptor cuando este se encuentra ensamblado como un heterotetrámero y embebido en la membrana celular (Yuasa T, 2016). El grupo de ratonas gestantes mostró una mayor abundancia de esta forma trunca. En comparación al grupo no gestante, exhibió un aumento aproximado del 62%. Este hallazgo concuerda con reportes previos que demuestran la existencia de una correlación inversa entre la abundancia de la forma trunca del receptor de insulina en plasma y la sensibilidad a la insulina del individuo (Yuasa T, 2016), sugiriendo así que un aumento en la escisión del receptor de insulina podría estar regulando negativamente la señalización de la insulina en el músculo esquelético de ratonas gestantes.

Debido a que la forma trunca del receptor de insulina fue la única en este estudio que mostró estar significativamente aumentada en el grupo gestante, resulta necesario comprobar en estudios a futuro si la escisión del receptor de insulina se encuentra alterada. Para comprobarlo, se podría evaluar la expresión y activación de las calpaínas responsables de la escisión del receptor de insulina, las enzimas BACE-1 y γ -secretasa (Meakin PJ, 2018). También, ya que, al realizarse los cortes proteolíticos, parte del receptor de insulina queda en el espacio extracelular, resultaría interesante evaluar los niveles de la forma trunca del receptor en plasma de ratonas gestantes, y buscar si existe correlación entre estos valores y la sensibilidad a la insulina de estas ratonas.

Aunque se sugiere que el corte del receptor de insulina está asociado con la resistencia a la insulina en nuestro modelo *in vivo*, el mecanismo exacto que contribuye a este fenómeno es desconocido. Existen dos posibles mecanismos: que el corte del receptor de insulina disminuya la abundancia del receptor sobre la

superficie de la membrana celular y, por lo tanto, disminuya la amplificación de la señal de la insulina. Por otro lado, es posible que la subunidad soluble del receptor de insulina, producto del corte proteolítico, quede libre en circulación sanguínea y este sea capaz de unir moléculas de insulina, disminuyendo la cantidad de insulina libre en sangre, la cual es su forma activa. Este último mecanismo ha sido comprobado en un modelo previo de resistencia a la insulina (Hiriart M, 2014).

Finalmente, gracias a los avances en el estudio de la resistencia a la insulina gestacional, es importante considerar este evento fisiológico como un fenómeno multifactorial y, por lo tanto, puede haber múltiples factores involucrados en su establecimiento. Un ejemplo potencial son las proteínas substrato del receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2, que se ha demostrado son importantes coordinadores metabólicos en el músculo esquelético (Long YC, 2016), además de que han sido señaladas como partícipes en el desarrollo de distintos modelos de resistencia a la insulina. Específicamente, fosforilaciones en residuos de serina han sido asociadas con la resistencia a la insulina presente en tejido adiposo durante la última etapa de la gestación (Sevillano J, 2007), por lo que es altamente probable que un desequilibrio en los niveles de fosforilación en sitios específicos de las proteínas IRS, tengan un impacto en el desarrollo de insulinoresistencia en el músculo esquelético durante la gestación. De esta manera, no descartamos la participación de otros mecanismos inhibitorios en el desarrollo de resistencia a la insulina durante la gestación.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos al medir la concentración de glucosa plasmática 30 minutos después de una inyección de insulina, en ratonas en el día 17 de gestación, confirmaron la presencia de resistencia a la insulina durante este periodo.

En el músculo esquelético:

- Los niveles de transcripción de la isoforma B del receptor de insulina (IR-B) no se ven modificados durante la gestación.
- La expresión de la proteína total de la cadena β del receptor de insulina (IR- β) en ratonas gestantes no cambia en comparación al grupo no gestante.
- Los niveles de fosforilación en el residuo de tirosina 1150 de la cadena β del receptor de insulina (p-IR- β) no mostraron cambios en el grupo gestante al comparar con el grupo no gestante.
- La abundancia de la forma trunca del receptor de insulina (IR- β') está aumentada en ratonas gestantes, lo cual se asocia con el aumento en la resistencia a la insulina observado en este grupo.

BIBLIOGRAFÍA

Adeva-Andany, M. M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., & Pazos-García, C. (2016). Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience reports*, *36*(6), e00416. <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB*, *7*(4), 261–269. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00122-9)

Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., & Ashcroft, S. J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*, *312*(5993), 446–448. <https://doi.org/10.1038/312446a0>

Augustine, R. A., Ladyman, S. R., & Grattan, D. R. (2008). From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *The Journal of physiology*, *586*(2), 387–397. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.146316>

Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes, obesity & metabolism*, *18 Suppl 1*(Suppl 1), 63–70. <https://doi.org/10.1111/dom.12716>

Bao, H., Liu, Y., Zhang, M., Chen, Z., Zhang, W., Ge, Y., Kang, D., Gao, F., & Shen, Y. (2021). Increased β -site APP cleaving enzyme 1-mediated insulin receptor cleavage in type 2 diabetes mellitus with cognitive impairment. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, *17*(7), 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/alz.12276>

Barthel A., Joost H. (2008) Insulin Receptor. In: Offermanns S., Rosenthal W. (eds) Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-38918-7_80

Barbour, L.A. & McCurdy, Carrie & Hernandez, T.L. & de la Houssaye, Becky & Draznin, Boris & Friedman, Jed. (2006). Reduced IRS1 and increased serine IRS1 phosphorylation in skeletal muscle of women with GDM. *Diabetes*. *55*. A39.

Barbour, L. A., McCurdy, C. E., Hernandez, T. L., Kirwan, J. P., Catalano, P. M., & Friedman, J. E. (2007). Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes care*, *30 Suppl 2*, S112–S119. <https://doi.org/10.2337/dc07-s202>

Baumgard, L. H., Hausman, G. J., & Sanz Fernandez, M. V. (2016). Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domestic animal endocrinology*, *54*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.07.001>

Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M. C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A., & Vigneri, R. (2017). Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocrine reviews*, 38(5), 379–431. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00073>

Bell, A. W., & Bauman, D. E. (1997). Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2(3), 265–278. <https://doi.org/10.1023/a:1026336505343>

Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 373(9677), 1773–1779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60731-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60731-5)

Biddinger, S. B., & Kahn, C. R. (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annual review of physiology*, 68, 123–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124723>

Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>

Catalano P. M. (2010). Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(3), 365–371. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0088>

Catalano P. M. (2014). Trying to understand gestational diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 31(3), 273–281. <https://doi.org/10.1111/dme.12381>

Catalano, P. M., Kirwan, J. P., Haugel-de Mouzon, S., & King, J. (2003). Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *The Journal of nutrition*, 133(5 Suppl 2), 1674S–1683S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1674S>

Catalano, P. M., Nizielski, S. E., Shao, J., Preston, L., Qiao, L., & Friedman, J. E. (2002). Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 282(3), E522–E533. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00124.2001>

Cherrington, A. D., Edgerton, D., & Sindelar, D. K. (1998). The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*, 41(9), 987–996. <https://doi.org/10.1007/s001250051021>

Chu, Y. L., Gong, Y. D., Su, Z. H., Yu, H. N., Cui, Q., Jiang, H. Y., & Qu, H. M. (2014). Relationship between tyrosine phosphorylation and protein expression of insulin receptor and insulin resistance in gestational diabetes mellitus. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 34(3), 393–397. <https://doi.org/10.1007/s11596-014-1289-x>

- Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(10), 769–776. <https://doi.org/10.1038/35096075>
- Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565–2582. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785–789. <https://doi.org/10.1038/378785a0>
- Czech M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature medicine*, 23(7), 804–814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
- Dong, X., Park, S., Lin, X., Copps, K., Yi, X., & White, M. F. (2006). Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 101–114. <https://doi.org/10.1172/JCI25735>
- Friedman, J. E., Ishizuka, T., Shao, J., Huston, L., Highman, T., & Catalano, P. (1999). Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes*, 48(9), 1807–1814. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.9.1807>
- Fernández-Mejía, CF. (2018) Bioqímica de Laguna y Piña. 8va edición.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., & Tanti, J. F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87(1), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.019>
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Henquin, J. C., Dufrane, D., & Nenquin, M. (2006). Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes*, 55(12), 3470–3477. <https://doi.org/10.2337/db06-0868>
- Herrera, E., Lasunción, M. A., Gomez-Coronado, D., Aranda, P., López-Luna, P., & Maier, I. (1988). Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 158(6 Pt 2), 1575–1583. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(88\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(88)90193-7)
- Hiriart, M., Sanchez-Soto, C., Diaz-Garcia, C. M., Castanares, D. T., Avitia, M., Velasco, M., Mas-Oliva, J., Macias-Silva, M., González-Villalpando, C., Delgado-Coello, B., Sosa-Garrocho, M., Vidaltamayo, R., & Fuentes-Silva, D. (2014). Hyperinsulinemia is Associated with Increased Soluble Insulin Receptors Release from Hepatocytes. *Frontiers in endocrinology*, 5, 95. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00095>

Hommelberg, P. P., Langen, R. C., Schols, A. M., van Essen, A. L., Snepvangers, F. J., Mensink, R. P., & Plat, J. (2010). Trans fatty acid-induced NF-kappaB activation does not induce insulin resistance in cultured murine skeletal muscle cells. *Lipids*, 45(3), 285–290. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3388-1>

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>

Huang H. (2021). Proteolytic Cleavage of Receptor Tyrosine Kinases. *Biomolecules*, 11(5), 660. <https://doi.org/10.3390/biom11050660>

Hubbard S. R. (2013). The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a008946. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>

Hutton J. C. (1994). Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. *Diabetologia*, 37 Suppl 2, S48–S56. <https://doi.org/10.1007/BF00400826>

Kampmann, U., Knorr, S., Fuglsang, J., & Ovesen, P. (2019). Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *Journal of diabetes research*, 2019, 5320156. <https://doi.org/10.1155/2019/5320156>

Kim, J. K., Michael, M. D., Previs, S. F., Peroni, O. D., Mauvais-Jarvis, F., Neschen, S., Kahn, B. B., Kahn, C. R., & Shulman, G. I. (2000). Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *The Journal of clinical investigation*, 105(12), 1791–1797. <https://doi.org/10.1172/JCI8305>

Kirwan, J. P., Varastehpour, A., Jing, M., Presley, L., Shao, J., Friedman, J. E., & Catalano, P. M. (2004). Reversal of insulin resistance postpartum is linked to enhanced skeletal muscle insulin signaling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(9), 4678–4684. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0749>

Knutson V. P. (1991). Proteolytic processing of the insulin receptor beta subunit is associated with insulin-induced receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry*, 266(24), 15656–15662

Lebovitz H. E. (2001). Insulin resistance: definition and consequences. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 109 Suppl 2, S135–S148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>

Lemaire, K., M.A. Ravier, A. Schraenen, J.W.M. Creemers, R. Van de Plas, M. Granvik, L. Van Lommel, E. Waelkens, F. Chimienti, G.A. Rutter, et al. (2009). Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:14872–14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906587106>

Leto, D., Saltiel, A. (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383–396 <https://doi.org/10.1038/nrm3351>

Lewis, G. F., Carpentier, A. C., Pereira, S., Hahn, M., & Giacca, A. (2021). Direct and indirect control of hepatic glucose production by insulin. *Cell metabolism*, 33(4), 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.007>

Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3441–3446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>

Li, Y. Y., Xiao, R., Li, C. P., Huangfu, J., & Mao, J. F. (2015). Increased plasma levels of FABP4 and PTEN is associated with more severe insulin resistance in women with gestational diabetes mellitus. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 21, 426–431. <https://doi.org/10.12659/MSM.892431>

Li, Y. Z., Di Cristofano, A., & Woo, M. (2020). Metabolic Role of PTEN in Insulin Signaling and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(8), a036137. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036137>

Long, Y. C., Cheng, Z., Copps, K. D., & White, M. F. (2011). Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Molecular and cellular biology*, 31(3), 430–441. <https://doi.org/10.1128/MCB.00983-10>

Luo, J., Sobkiw, C. L., Hirshman, M. F., Logsdon, M. N., Li, T. Q., Goodyear, L. J., & Cantley, L. C. (2006). Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell metabolism*, 3(5), 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.003>

Meakin, P. J., Mezzapesa, A., Benabou, E., Haas, M. E., Bonardo, B., Grino, M., Brunel, J. M., Desbois-Mouthon, C., Biddinger, S. B., Govers, R., Ashford, M. L. J., & Peiretti, F. (2018). The beta secretase BACE1 regulates the expression of insulin receptor in the liver. *Nature communications*, 9(1), 1306. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03755-2>

Myers, M. G., Jr, Backer, J. M., Sun, X. J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., & White, M. F. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10350–10354. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10350>

Nagarajan, A., Petersen, M. C., Nasiri, A. R., Butrico, G., Fung, A., Ruan, H. B., Kursawe, R., Caprio, S., Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M. C., Sun, L., Gao, G., Bhanot, S., Jurczak, M. J., Green, M. R., Shulman, G. I., & Wajapeyee, N. (2016). MARCH1 regulates insulin sensitivity by controlling cell surface insulin receptor levels. *Nature communications*, 7, 12639. <https://doi.org/10.1038/ncomms12639>

Papa, V., Russo, P., Gliozzo, B., Goldfine, I. D., Vigneri, R., & Pezzino, V. (1993). An intact and functional soluble form of the insulin receptor is secreted by cultured cells. *Endocrinology*, *133*(3), 1369–1376. <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.8396017>

Petersen, M. C., Madiraju, A. K., Gassaway, B. M., Marcel, M., Nasiri, A. R., Butrico, G., Marcucci, M. J., Zhang, D., Abulizi, A., Zhang, X. M., Philbrick, W., Hubbard, S. R., Jurczak, M. J., Samuel, V. T., Rinehart, J., & Shulman, G. I. (2016). Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, *126*(11), 4361–4371. <https://doi.org/10.1172/JCI86013>

Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*, *98*(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>

Posner B. I. (2017). Insulin Signalling: The Inside Story. *Canadian journal of diabetes*, *41*(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.07.002>

Previs, S. F., Withers, D. J., Ren, J. M., White, M. F., & Shulman, G. I. (2000). Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *The Journal of biological chemistry*, *275*(50), 38990–38994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006490200>

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature* **423**, 550–555 (2003). <https://doi.org/10.1038/nature01667>

Rahman, M. S., Hossain, K. S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E. O., Rahman, M. A., Hannan, M. A., Uddin, M. J., & Pang, M. G. (2021). Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *International journal of molecular sciences*, *22*(12), 6403. <https://doi.org/10.3390/ijms22126403>

Rorsman, P., & Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual review of physiology*, *75*, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>

Rorsman P, Renström E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* *46*, 1029–1045 <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>

Saad, M. J., Maeda, L., Brenelli, S. L., Carvalho, C. R., Paiva, R. S., & Velloso, L. A. (1997). Defects in insulin signal transduction in liver and muscle of pregnant rats. *Diabetologia*, *40*(2), 179–186. <https://doi.org/10.1007/s001250050660>

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5712), 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

Sevillano, J., de Castro, J., Bocos, C., Herrera, E., & Ramos, M. P. (2007). Role of insulin receptor substrate-1 serine 307 phosphorylation and adiponectin in adipose tissue insulin resistance in late pregnancy. *Endocrinology*, *148*(12), 5933–5942. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0352>

Shah, O. J., Wang, Z., & Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current biology* : *CB*, *14*(18), 1650–1656. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.026>

Soluble Insulin Receptor Study Group (2007). Soluble insulin receptor ectodomain is elevated in the plasma of patients with diabetes. *Diabetes*, *56*(8), 2028–2035. <https://doi.org/10.2337/db07-0394>

Sonagra, A. D., Biradar, S. M., K, D., & Murthy D S, J. (2014). Normal pregnancy- a state of insulin resistance. *Journal of clinical and diagnostic research* : *JCDR*, *8*(11), CC01–CC3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10068.5081>

Steiner, D. F., & Oyer, P. E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *57*(2), 473–480. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.2.473>

Sylow, L., Kleinert, M., Pehmøller, C., Prats, C., Chiu, T. T., Klip, A., Richter, E. A., & Jensen, T. E. (2014). Akt and Rac1 signaling are jointly required for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and downregulated in insulin resistance. *Cellular signalling*, *26*(2), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.007>

Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., & Kahn, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *7*(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>

Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *The Journal of cell biology*, *217*(7), 2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>

von Versen-Hoeynck, F. M., & Powers, R. W. (2007). Maternal-fetal metabolism in normal pregnancy and preeclampsia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *12*, 2457–2470. <https://doi.org/10.2741/2247>

Ward, C. W., & Lawrence, M. C. (2011). Landmarks in insulin research. *Frontiers in endocrinology*, *2*, 76. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00076>

Wei, L., Hubbard, S. R., Hendrickson, W. A., & Ellis, L. (1995). Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *The Journal of biological chemistry*, *270*(14), 8122–8130. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8122>

Wijesekara, N., Konrad, D., Eweida, M., Jefferies, C., Liadis, N., Giacca, A., Crackower, M., Suzuki, A., Mak, T. W., Kahn, C. R., Klip, A., & Woo, M. (2005). Muscle-specific Pten deletion

protects against insulin resistance and diabetes. *Molecular and cellular biology*, 25(3), 1135–1145. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1135-1145.2005>

Yuasa, T., Amo-Shiinoki, K., Ishikura, S., Takahara, M., Matsuoka, T., Kaneto, H., Kuroda, A., Matsuhisa, M., & Hashida, S. (2016). Sequential cleavage of insulin receptor by calpain 2 and γ -secretase impairs insulin signalling. *Diabetologia*, 59(12), 2711–2721. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4102-5>

Zhang, T., Fang, M., Fu, Z. M., Du, H. C., Yuan, H., Xia, G. Y., Feng, J., & Yin, G. Y. (2014). Expression of PI3-K, PKB and GSK-3 β in the skeletal muscle tissue of gestational diabetes mellitus. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(4), 309–312. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60045-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60045-6)