“PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA “

Clave del proyecto: **CIN2016A10106**

Universidad del valle de México

Ciclo escolar: 2015-2016

AUTORES:

Maya Torres Tiffany Sharon

Olivares Hernández María Isabel

Rodríguez Méndez Erika

Sotelo Galaviz Axel Arturo

ASESORES:

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes

M. en C. Juan Antonio Salas Hernández

Área de conocimiento : Ciencias biológicas, químicas y de la salud.

Disciplina: Biología

Modalidad: Experimental

Lugar y fecha: Naucalpan, Estado de México a 19 de febrero de 2016.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Introducción	1
Planteamientodel problema	2
Hipótesis	3
Justificación	3
Objetivo General y Objetivos específicos	4
Fundamento teórico	4
Metodología	10
Resultados	13
Conclusiones	17
Bibliografía	18

RESUMEN

Gracias a estudios realizados en modelos experimentales de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), actualmente se sabe que el incremento en los niveles de insulina durante la diabetes conduce a la sobre-expresión de receptores AT1 específicos para la hormona Angiotensina II (Ang II), siendo esta la causa principal del desarrollo de hipertensión y aterosclerosis. Con base en lo anterior, la presente propuesta de investigación se propuso el estudio del papel del estrés oxidativo generado por la Ang II en la resistencia a la insulina en un modelo de células aisladas (C9) de tejido hepático normal de ratas macho de la cepa *Sprague dowley*; todo lo anterior realizado en instalaciones del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV-IPN. Se pudo determinar que las células C9 responden favorablemente al estímulo con Ang II e insulina; tanto la Ang II como la insulina son capaces de inducir la activación de proteínas que están involucradas en sus propias vías como cinasas Erk y enzimas Akt inhibiendo la fosforilación de esta última en nuestro modelo celular.

Palabras clave: Diabetes Mellitus, insulina, angiotensina, estrés oxidativo.

ABSTRACT

Thanks to studies in experimental models of type 2 diabetes mellitus (DM2), it is now known that the increase in insulin levels in diabetes leads to over-expression of specific AT1 receptors for the hormone angiotensin II (Ang II) It is the main cause of the development of hypertension and atherosclerosis. Based on the above, the present research proposal to study the role of oxidative stress generated by Ang II in insulin resistance in a model of isolated cells (C9) normal liver tissue strain male rats was proposed Sprague Dawley; all this done in facilities of the Department of Biochemistry of the CINVESTAV-IPN. It was determined that the C9 cells respond favorably to stimulation with Ang II and insulin; both Ang II and insulin are able to induce activation of proteins that are involved in their own way as kinase Erk and Akt phosphorylation by inhibiting enzymes latter in our cellular model.

Keywords: Diabetes Mellitus, insulin, angiotensin, oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) también conocida como “diabetes no dependiente de insulina” o “diabetes del adulto”, es la enfermedad crónico-degenerativa más común en el ser humano, que de acuerdo a la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), afecta actualmente a más de 387 millones de personas en todo el mundo y que para el año 2035 potencialmente afectará a más de 592 millones (http://www.idf.org). En México, la DM2 constituye la segunda causa más importante de mortalidad, solo después de las enfermedades cardiovasculares. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012, el 9.2% de la población mexicana la padece y la OCDE reporta que de sus países miembros, México ocupa el 1er lugar en prevalencia de DM2 en la población de entre 20 y 69 años (de acuerdo a la Federación Mexicana de Diabetes, A. C.).

A medida que la prevalencia de diabetes aumenta a proporciones epidémicas en todo el mundo, las complicaciones vasculares de la diabetes se han convertido en uno de los problemas de salud más comunes. En este contexto, los pacientes con DM2 tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiaca isquémica, aterosclerosis y nefropatía. Diversos estudios han evidenciado un papel preponderante de la hormona Angiotensina II en muchas de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la DM2. La Ang II es la hormona efectora del sistema renina-angiotensina (SRA), encargado de la homeostasis cardiovascular y renal. Diversas líneas de evidencia, tanto clínica como experimental, han sugerido que la Ang II es un promotor de la resistencia a la insulina y de la DM2. Se ha demostrado que la Ang II ejerce sus acciones en tejidos sensibles a la insulina, como el tejido hepático, el adiposo y el muscular en donde afecta las acciones de la insulina a nivel de su receptor y de proteínas que participan en la respuesta celular. De manera por demás interesante, también se ha demostrado que condiciones de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina promueven el desarrollo de complicaciones cardiovasculares por promover una sobrexpresión de los receptores de Ang II y de su actividad, lo que sugiere fuertemente una relación estrecha entre SRA, resistencia a la insulina y DM2.

Se ha demostrado que la inhibición de SRA impide el desarrollo de DM2. Por ejemplo, ensayos clínicos han demostrado que pacientes con riesgo cardiovascular

o diabetes tratados con inhibidores de la enzima que sintetiza Ang II, como ramipril, enalapril o perindopril, mostraron una importante reducción en la incidencia de la diabetes en comparación con los pacientes tratados con placebo. El uso de antagonistas del receptor para la Ang II (el receptor AT_1) reducen también la incidencia de diabetes y mejoran la sensibilidad a la insulina en estudios clínicos y en modelos animales.

Sin embargo, los mecanismos exactos por los que la Ang II induce resistencia a la insulina siguen siendo en gran medida desconocidos. En este contexto, varios reportes han indicado que la infusión de Ang II puede conducir a resistencia a la insulina y por lo tanto a un aumento de los niveles plasmáticos de insulina (hiperinsulinemia), mientras que la administración de antagonistas del receptor AT_1 y de la enzima que sintetiza Ang II, mejoran de manera notable la sensibilidad a la insulina en pacientes hipertensos.

Diversos estudios sugieren que un posible mecanismo involucrado en desencadenar resistencia a la insulina en células del sistema cardiovascular, es el estrés oxidativo, sin que se tengan reportes de la participación de este mecanismo en células de respuesta metabólica como las adiposas, musculares y hepáticas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha incrementado de manera importante el índice de mortalidad por diabetes, llegando a ocupar uno de los primeros lugares en causa de mortalidad general en la población mexicana. Entre los objetivos para lograr disminuir rápidamente estos altos índices, es claro que la prevención, la detección temprana, el diagnóstico, control y tratamiento oportuno de este padecimiento, constituyen prioridades del sector salud en nuestro país. Sin embargo, también es claro que esta intensa lucha no ha sido suficiente para lograr este objetivo. El comprender los mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina constituye también un objetivo primordial para la comprensión de este fenómeno y para el desarrollo de futuras estrategias farmacológicas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos. Gracias a estudios realizados en modelos experimentales de DM2, actualmente se sabe que el incremento en los niveles de insulina durante la diabetes conduce a la sobre-expresión de receptores AT_1 específicos para la hormona Ang II, siendo esta la causa principal del desarrollo de hipertensión y

aterosclerosis. Por otra parte, estudios recientes han evidenciado que el tratamiento con fármacos que bloquean las acciones de la Ang II, reducen notablemente la resistencia a la insulina. Esto indica que además de tener un efecto importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, la Ang II participa directamente en la resistencia a la insulina. Es por ello que en el presente proyecto de investigación se propone el estudio del papel del estrés oxidativo generado por la Ang II en la resistencia a la insulina en un modelo de células hepáticas. A pesar del empleo de antioxidantes para reducir los efectos del estrés oxidativo en diferentes enfermedades, aún se desconoce si estos puedan revertir la resistencia a la insulina en células hepáticas.

HIPÓTESIS O CONJETURAS

La Ang II promoverá resistencia a la insulina a través de inducir estrés oxidativo en células de origen hepático, por lo que el empleo de agentes antioxidantes, como el resveratrol, revertirá el efecto de la Ang II en la resistencia a la insulina.

JUSTIFICACIÓN Y SUSTENTO TEÓRICO

Estudios recientes han determinado que la Ang II tiene un rol significativo en el desarrollo de resistencia a la insulina, por medio de mecanismos asociados con la inactivación del receptor de insulina (IR) y de su substrato IRS a través de la fosforilación en residuos de serina/treonina (Ser/Thr), proteínas fosfatasas de Tyr como PTP1B, y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la activación de NADPH oxidasa. El estrés oxidativo se puede definir como un estado de desequilibrio entre la producción y la eliminación de ERO. En condiciones fisiológicas las ERO se generan principalmente en las mitocondrias durante la oxidación de los ácidos grasos libres o glucosa para la síntesis de ATP, y participan en diferentes procesos fisiológicos como la regulación del tono vascular, de la adhesión vascular, de la amplificación de la respuesta inmune, de la apoptosis y de vías de señalización mediadas por receptores para hormonas y factores de crecimiento. Diversos estudios han demostrado que la sobreproducción de ERO por un incremento en los niveles plasmáticos de Ang II, promueve un estado de estrés oxidativo que se ha asociado a daño mitocondrial en tejido cardiovascular. Además, y de manera muy interesante la Ang II induce resistencia a las acciones de la insulina que se ha demostrado, desempeña funciones muy importantes a nivel

cardiovascular, como la contractilidad cardiaca, el tono vascular y el metabolismo de lípidos, glucosa y proteínas. Pero, ¿por qué estudiar si Ang II puede regular las acciones de la insulina en un tejido como el hepático? En el hígado, la insulina desempeña funciones vitales asociadas a la incorporación y almacenamiento de la glucosa. Se ha sugerido que la resistencia a la insulina en el hígado es un factor determinante en el desarrollo de hiperglucemia, con el aumento en la producción de glucosa hepática que se correlaciona con la hiperglucemia observada en pacientes diabéticos en ayunas. Además, el hígado es el principal sitio para la remoción de la insulina, un proceso que está mediado en parte, a través de la captación de insulina mediada por su propio receptor para su posterior degradación. Sin embargo, en células de origen hepático aún no se ha definido de manera clara si Ang II puede regular las acciones de la insulina y contribuir al estado de resistencia a través de inducir estrés oxidativo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de investigación consiste en estudiar si la Ang II a través de la activación de los receptores AT_1 desensibiliza la señal de insulina a través de promover estrés oxidativo en células de origen hepático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir las condiciones iniciales para observar la respuesta en células hepáticas a estímulos con insulina y Ang II, a través de la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de cada una.
- Establecer las condiciones por las que Ang II induce resistencia a Insulina
- Demostrar que el empleo de antioxidantes (resveratrol) revierte el efecto provocado por Ang II sobre las acciones de insulina

FUNDAMENTO TEÓRICO

INSULINA

Es una hormona peptídica que contiene 5.8 KDa y que es liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Su función principal es de mantener la concentración de glucosa en la

sangre e igualmente regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos.

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tyr (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de Tyr (3). El IR es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α se encuentran localizadas en el exterior de la membrana plasmática y contienen sitios de unión a la insulina, mientras que las subunidades β tienen una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en donde se localiza el dominio con actividad de cinasa de Tyr.

Uno de los mecanismos mas estudiados un poco difíciles de comprender es la regulación de transporte de glucosa en células adiposas y musculares. La insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K y de la cinasa Akt (8). Evidencias recientes indican que el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática depende de varios mecanismos entre los que se encuentra la participación de la AS160 (la cual contiene un dominio Rab/GAP). AS160 (sustrato de Akt de 160 KDa) es una proteína que en su estado no fosforilado y activo regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4, inhibiendo la exocitosis basal del transportador. AS160 es sustrato de Akt, y cuando es fosforilada por Akt, AS160 se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab del transportador GLUT4 a la membrana plasmática (Fig. 4) (8). En años recientes fue descrita en adipocitos una vía de transporte de glucosa independiente de PI3K, e involucra a la proteína Cbl y a las proteínas adaptadoras APS y CAP. La formación de un complejo proteico entre APS/CAP/Cbl, permite la fosforilación de ésta última proteína.

Angiotensina II

Las acciones de la angiotensina II (Ang II) son numerosas, desde un péptido vasoactivo a un péptido capaz de regular funciones celulares como la secreción de

citocinas y la proliferación celular. La (Ang II) es el producto principal de una serie de reacciones enzimáticas que ocurren en la circulación general. Algunas de sus acciones son sus funciones tisulares como la secreción de citocinas y la proliferación celular, se considera un agente muy potente que aumenta la presión sanguínea, actúa en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal estimulando la biosíntesis y secreción de aldosterona, incrementando la resolución de sodio e inhibiendo la secreción de renina, y en el sistema nervioso en donde estimula la ingestión de agua y aumenta la secreción de vasopresina

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

Este sistema actúa en forma endocrina para mantener la presión arterial y el balance hidroelectrolítico**.** Los componentes que forman este sistema son: la renina, el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina tipo 1 (ECA 1), la Ang II y los receptores de siete dominios transmembranales AT_1 y AT_2 estos receptores son los responsables de mediar las acciones endocrinas de la Ang II, como la contracción y la relajación del musculo liso vascular.

La renina es sintetizada y almacenada en el aparato yuxtaglomerular, que cataliza la liberación hidrolítica del decapéptido (Ang I) a partir del angiotensinógeno de 14 aminoácidos, sintetizado principalmente en el hígado. Posteriormente, la Ang I es convertida al octapéptido Ang II por la ECA1

SISTEMA LOCAL GENERADOR DE ANGIOTENSINA II (SLGAII)

se han encontrado los componentes para generar Ang II, junto con otras enzimas como la quimasa, la catepsina G o el activador tisular del plasminógeno. Este sistema opera en forma independiente del SRA y se evita afectar las respuestas fisiológicas desencadenadas para el mantenimiento de la presión arterial y el balance hidroelectrolítico.

La angiotensina II regula al AT1 por medio de una señal que incluye a la Activator protein-1 (AP1), quien contribuiría a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo, la angiotensina II induce la formación de Ros por medio de la NADPH oxidasa, la prevención del incremento de los ROS se asocia a una reducción de la muerte celular inducida por la AngII.

El mecanismo de la activación oxidosa de NADPH por Ang II es complejo e incompletamente comprendido. Esta comprobado que la producción de ROS medida por angiotensina II en las células de musculo vascular (VSMCs) es medida por la activación de Nox1, como se muestra con la perdida de respuestas de ROS después de tratamiento con adenovirus que expresa anti sensación al Nox1, mientras que la Nox2 parece ser la responsia de angiotensina II en vasos de resistencia.

DAÑO O ESTRÉS OXIDATIVO

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O2), con los electrones que forman el enlace (p), antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee. El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos.

RADICALES LIBRES

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón

desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalizado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de que participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicálicas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS).

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo (HO)+
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2)
- Oxígeno singlete ($^1O_2$)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozo

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1. *Radicales libres inorgánicos o primarios*.

Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una

vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.

2. *Radicales libres orgánicos o secundarios*.

Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

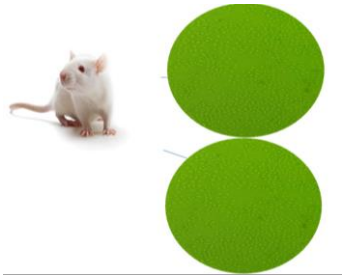
3. *Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno*. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, el hidroperóxidos orgánicos.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantin-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa.15,16 Y entre las sustancias y agentes es conocida ampliamente la relación de los productos cíclicos de naturaleza redox como son el paraquat, diquat, alloxano, estreptozozina y doxorubicina, con los radicales libres. También se producen radicales libres por la administración de paracetamol, tetracloruro de carbono y furosemida; por último no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el *shock* térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres. Existen algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son:

- Dieta hipercalórica.
- Dieta insuficiente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia y reperfusión.
- Ejercicio extenuante.

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Se empleó una línea celular C9 ATCC, que son células aisladas de un tejido hepático normal de ratas macho "*Sprague-Dawley*", cuya morfología es epitelial; y se utilizó para el estudio de las acciones de Insulina mediadas por el receptor de insulina [IR], Angiotensina II [Ang II] mediadas a través del receptor AT_1, y así mismo para el estudio del efecto de antioxidantes como el resveratrol sobre las acciones de la insulina.



El estudio de las acciones hormonales y el efecto de antioxidantes se realizó mediante la técnica de western blot.

Para observar la respuesta de las células a la insulina y la AngII, se realizó la siguiente metodología:

1. Resiembra y proliferación:

   Las células se cultivaron en medio F12-K suplementado con FBS (Suero Fetal Bovino) al 10% v/v, 100 ug/ml de estreptomicina, 100 ul/ml de penicilina, y 0.25 ug/ml de anfotericina B a 37°C , en una atmósfera de 95% de aire y 5% CO_2.

   Para los experimentos las células se resembraron en cajas de cultivos de 6 pozos, y antes de iniciar el experimento fueron mantenidas con medio sin FBS durante 6 horas.

2. **Experimento 1. Estímulos con Insulina 10 nm**

   Este ensayo se repitió 4 veces.

   Se realizó un curso temporal para observar las acciones de Insulina en función del tiempo, evaluado a través de la fosforilación de una proteína involucrada en su señalización (Akt fosforilada).

En una caja de 6 pozos se realizó lo siguiente:

I. Control: En este pozo no lleva ningún estímulo, y sirve de comparación para determinar el efecto de las demás células tratadas

II. Insulina 10nM (2 min)

III. Insulina 10nM (5 min)

IV. Insulina 10nM (10 min)

V. Insulina 10nM (20 min)

VI. Insulina 10nM (30 min)

Finalizado los 30 minutos, se detuvo la reacción en frio, y se empleó PBS, un buffer de fosfatos. Las células se lisaron con buffer Laemli 1X (el cual contiene SDS, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol y agua). Este mismo procedimiento se realizó para los siguientes experimentos.

3. Experimento 2. Estímulos con Ang II 100 nM

Este ensayo se repitió 4 veces.

Se realizó un curso temporal para observar las acciones de Ang II en función del tiempo, evaluado a través de la fosforilación de una proteína involucrada en su señalización (Erk1/2 fosforilada).

En una caja de 6 pozos se realizó lo siguiente:

I. Control: En este pozo no lleva ningún estímulo, y sirve de comparación para determinar el efecto de las demás células tratadas

II. AngII 100nM (2 min)

III. AngII 100nM (5 min)

IV. AngII 100nM (10 min)

V. AngII 100nM (20 min)

VI. AngII 100nM (30 min)

4. Experimento 3. Acción de la Ang II sobre la Ins

Este ensayo se repitió 4 veces.

Se realizaron pre-estímulos con Ang II 100 nm en función del tiempo, y finalizado los 30 min, se estimuló con Ins 10 nM por 10 min. En este caso se evaluó la fosforilación de Akt fosforilada con el fin de determinar un mecanismo de regulación de Insulina mediante la participación de Ang II.

En una caja de 6 pozos se realizó lo siguiente:

I. Control: En este pozo no lleva ningún estímulo, y sirve de comparación para determinar el efecto de las demás células tratadas

II. Ins 10 nM (10 min) [Control de Insulina, sin pre-tratamiento con Ang II]

III. AngII 100 nM (5 min) + Ins 10 nM (10 min)

IV. AngII 100 nM (10 min) + Ins 10 nM (10 min)

V. AngII 100 nM (20 min) + Ins 10 nM (10 min)

VI. AngII 100 nM (30 min) + Ins 10 nM (10 min)

5. Experimento 4. Efecto del resveratrol sobre las acciones de AngII

Se ha realizado 1 ensayo.

Las células fueron incubadas con resveratrol 25 um por distintos tiempos (6, 12 y 24 horas). Finalizado las 24 horas, se realizaron pre-estímulos con Ang II 100 nm por 30 min, y con Ins 10 nm por 10 min. En este caso se evaluó la fosforilación de Akt fosforilada con el fin de determinar un mecanismo de regulación de Insulina mediante la participación de Ang II, y cómo se revierte el efecto de Ang II con la presencia del antioxidante.

En una caja de 6 pozos se realizó lo siguiente:

I. Control: En este pozo no lleva ningún estímulo, y sirve de comparación para determinar el efecto de las demás células tratadas

II. Ins 10 nM (10 min) [Control de Insulina, sin pre-tratamiento con Ang II]

III. AngII 100 nM (30 min) + Ins 10 nM (10 min) [Control: sin pre-tratamiento con Resv.]

IV. Resv. 50 µM (6 horas) + AngII 100 nM (30 min) + Ins 10 nM (10 min)

V. Resv. 50 µM (12 horas) + AngII 100 nM (30 min) + Ins 10 nM (10 min)

VI. Resv. 50 µM (24 horas) + AngII 100 nM (30 min) + Ins 10 nM (10 min)

6. Western Blot

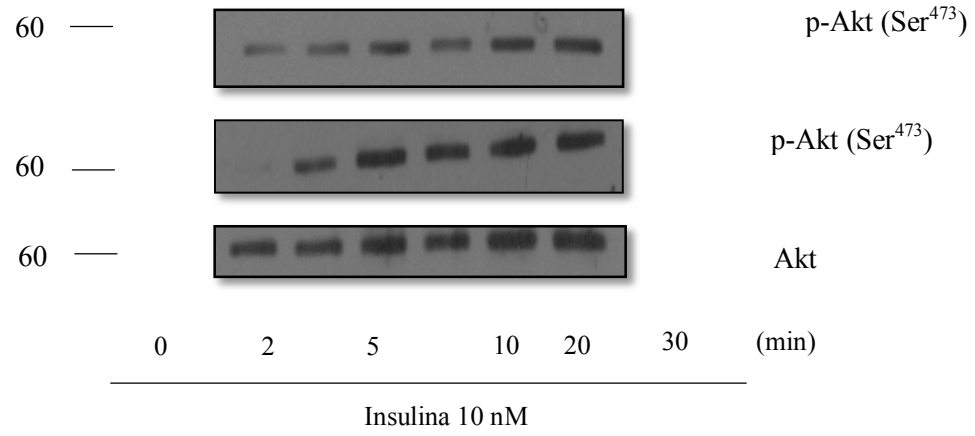
Las muestras recolectadas en tubos eppendorf se sonicaron dando pulsos a 40 Khz durante 20 segundos por muestra, además fueron calentadas a 99 °C durante 5 minutos y centrifugadas a 14500 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se cargaron en geles de poliacrilamida al 10 %, y se realizó la electroforesis en un tiempo de 20 minutos a 80 Volts, y un segundo tiempo de 75 minutos a 120 Volts. Las proteínas separadas por la electroforesis, fueron transferidas a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF), en un sistema de transferencia semi-seca a 15 Volts por 1 hora en buffer de transferencia.

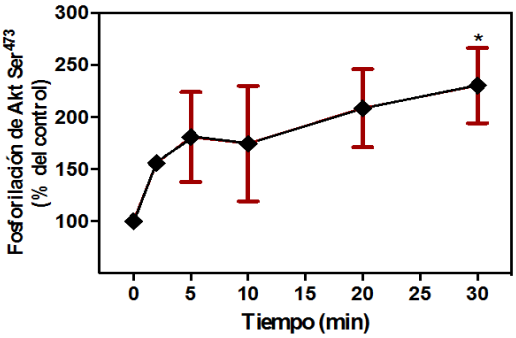
Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5 % en TBST, incubadas con anticuerpo primario de la proteína de interés (Akt y Erk fosforilados) toda la noche, y con anticuerpo secundario durante 1 hora. Los blots obtenidos fueron revelados utilizando un reactivo de detección de quimioluminiscencia, y cuantificados en un densitómetro.

RESULTADOS

1. Experimento 1. Estímulos con Insulina 10 nm

Se evaluó la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de Insulina a nivel de Akt

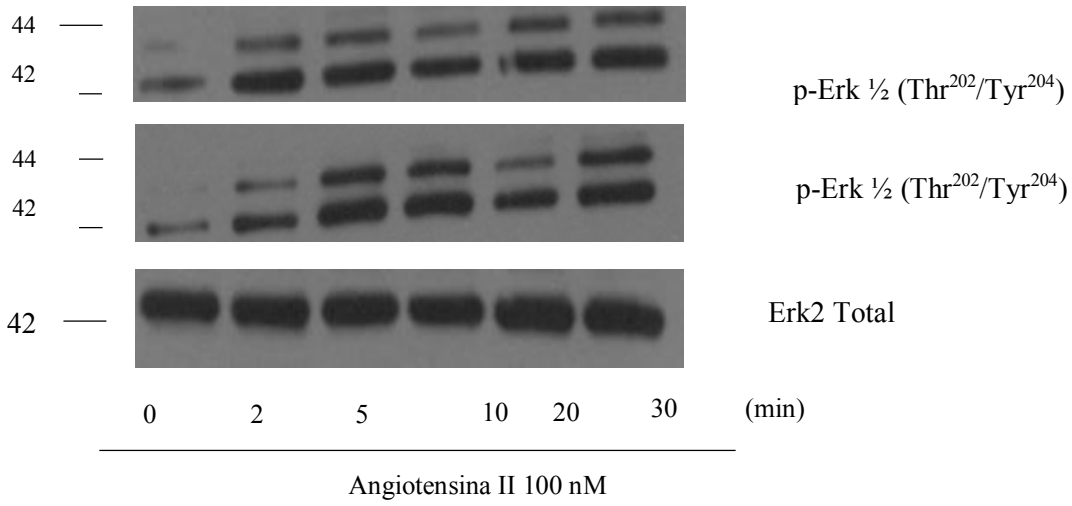


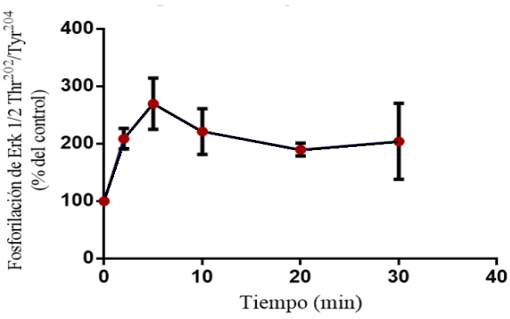


En esta primera fase los blots indican el peso molecular de la proteína de interés Akt 123 fosforilado en residuo de Serina 473 correspondiente a 60 KDa, y se observa un incremento en la señal, lo que da a entender que se presenta un aumento en la fosforilación de Akt inducida por Insulina en función del tiempo. Y en el gráfico se observa el mismo comportamiento, indicando que a partir de los 5 minutos Ins activa adecuadamente su cascada de señalización, sostenida por al menos 30 minutos, y de esta forma cumplir con sus acciones metabólicas como la síntesis de glucógeno, o inducir crecimiento y proliferación celular.

2. Experimento 2. Estímulos con Ang II 100 nM

Se evaluó la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de Angiotensina II a nivel de Erk.



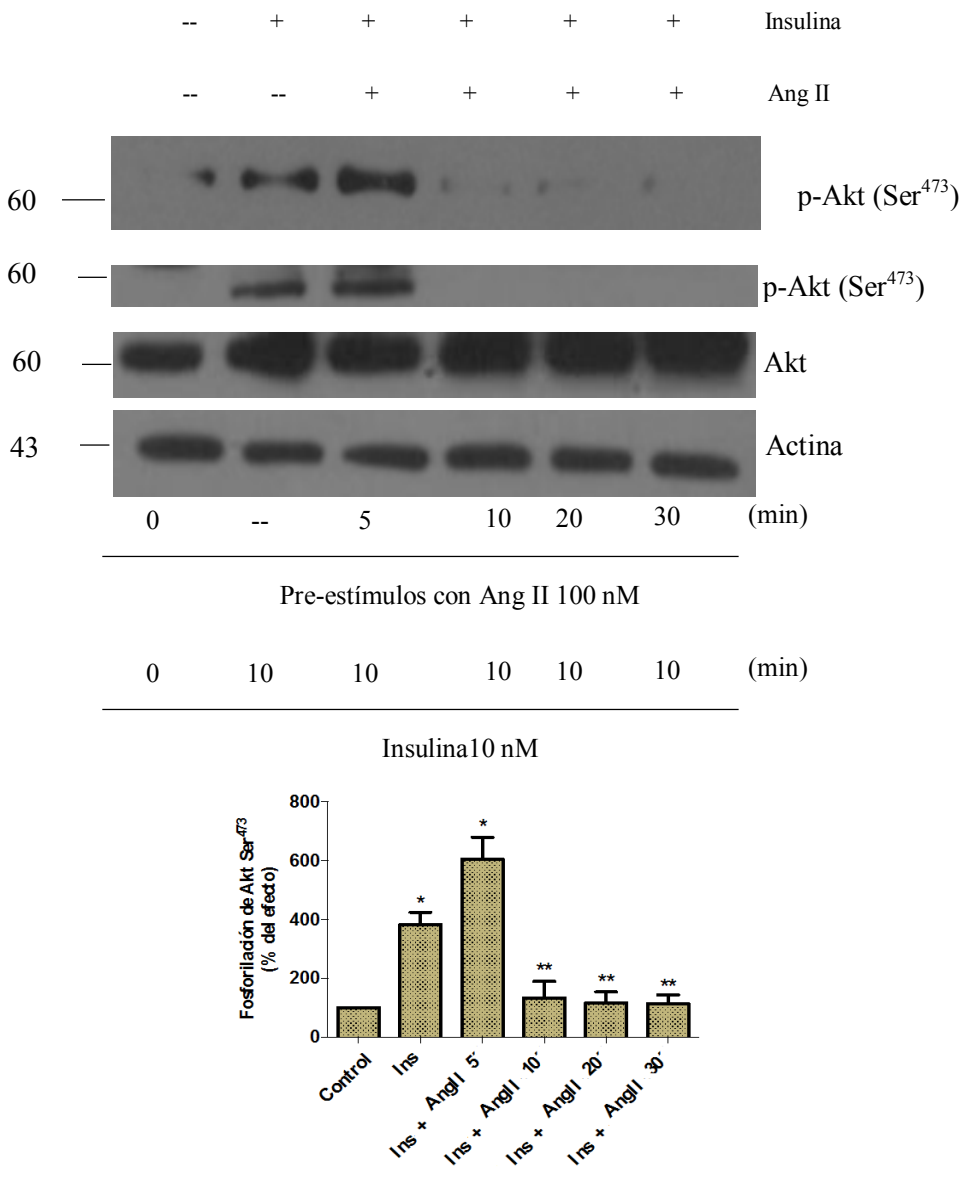


Angiotensina II 100 nM
n=4

En este segundo experimento los blots indican el peso molecular de la proteína de interés Erk 1/2 fosforilado en residuo de treonina 202/Tirosina 204 correspondiente a 42-44 KDa, y se observa un incremento en la señal a los 5 minutos, lo que da a entender que se presenta un aumento en la fosforilación de Erk inducida por Ang II en función del tiempo. Y en el gráfico se observa el mismo comportamiento, indicando que a partir de los 5 minutos Ang II activa adecuadamente su cascada de señalización, sostenida por al menos 30 minutos con respecto al basal, y de esta forma cumplir con sus acciones de promover crecimiento y proliferación celular, entre otras.

3. Experimento 3. Acción de la Ang II sobre la Ins

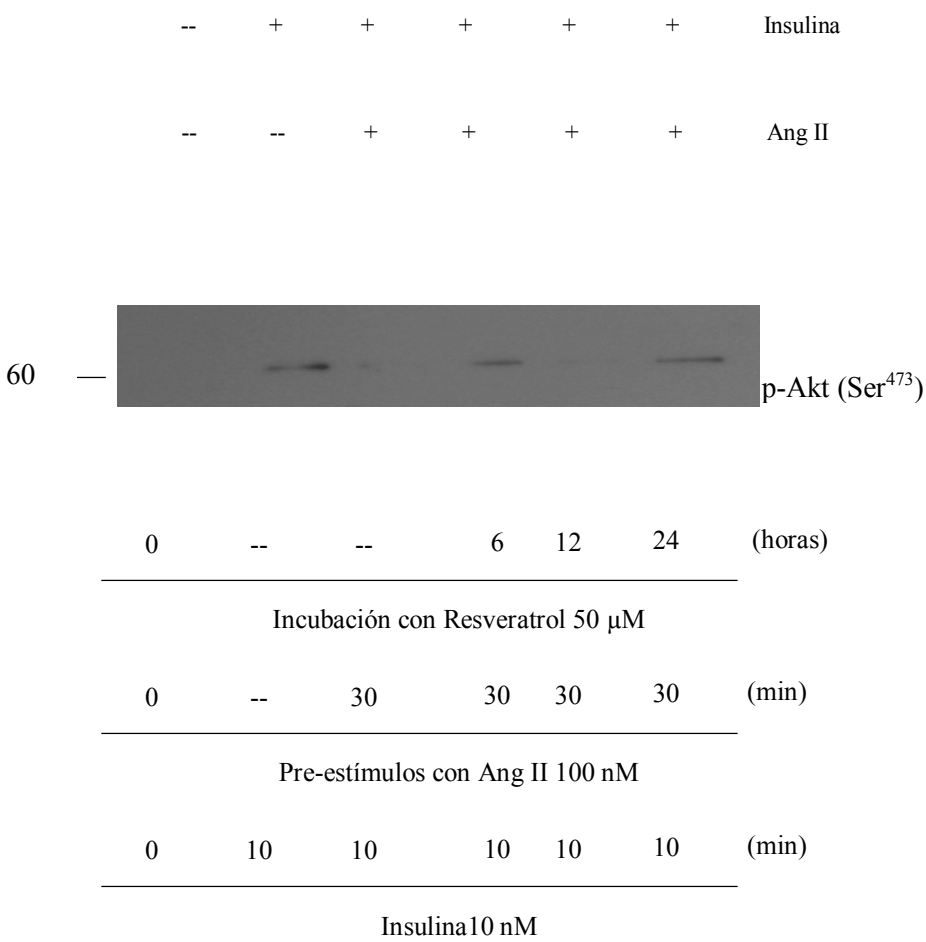
Se evaluó el efecto dela Angiotensina II sobre la vía de señalización de insulina, a través de la fosforilación de Akt.



En este tercer experimento los blots indican una disminución en la señal a partir de los 10 minutos, lo que da a entender que se presenta una reducción en la fosforilación de Akt inducida por Ins en función del tiempo. Y en el gráfico de barras se observa el mismo comportamiento, indicando que a partir de los 10 minutos Ang II promueve inhibición, como mecanismo de regulación, en las acciones de Insulina, en otras palabras Ang II causa resistencia a la Insulina, un estado en el que las células no responden adecuadamente a la Insulina y por ende se altera su señalización, generando alteraciones metabólicas, entre otras funciones.

4. Experimento 4. Efecto del resveratrol sobre las acciones de AngII

Se evaluó el efecto de la Angiotensina II sobre la vía de señalización de insulina, a través de la fosforilación de Akt, y cómo el resveratrol puede revertir éste efecto.



En este cuarto experimento el blot indica en el segundo carril una señal mayor con respecto al control (primer carril), esto indica la señal de insulina como control, en el tercer carril se observa una disminución en la señal, lo que da a entender que se presenta una reducción en la fosforilación de Akt inducida por Ins en función del tiempo en presencia de Ang II. Y en el cuarto, quinto y sexto carril, se observa una recuperación leve de la señal, con respecto al tercero, lo que da a entender que es posible que el antioxidante sea capaz de revertir el efecto de Ang II, evitando la inhibición de las acciones de insulina, y favoreciendo sus acciones a nivel metabólico

*Para llegar a esta conclusión se necesita realizar varias repeticiones en este experimento.

CONCLUSIONES

- Con base en los resultados de la primera fase, se puede determinar que las células C9 responden favorablemente al estímulo con Ang II e insulina.
- Ang II como insulina son capaces de inducir la activación de proteínas que están involucradas en sus propias vías como Erk y Akt.
- Ang II promueve regulación en la vía de señalización de insulina a partir de un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de Akt, determinando de esta manera que hay resistencia a la insulina según lo planteado por Arellano, et. al (2009), lo que puede causar deficiencias en la síntesis de glucógeno y otros efectos metabólicos.

FUENTES BIBLIOHEMEROGRÁFICAS E INTERNET

1. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A, Castillo-Hernandez JR: Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. Mol Cell Endocrinol 2009, 302(2):128-139.

2. Paneni F, Costantino S, Cosentino F: Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. World journal of diabetes 2015, 6(2):326-332.

3. Gutierrez,J.. (2002). Daño oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. 2002, de Rev Cubana Med Milit Sitio web: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf.

4. Garrido,A. & Griendling, K.. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. Molecular and Cellula Endocrinology, 302, pp.148-158

5. Olivares,J. & Arellano,A: Bases Moleculares de las acciones de la Insulina. 2008, 27(1): 9-18.

6. Página de la Federación Internacional de Diabetes: http://www.idf.org

7. Página de Federación Mexicana de Diabetes, A. C.: http://fmdiabetes.org

8. Encuesta Nacional de Salud: http://ensanut.insp.mx/