



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Lab. Transducción de Señales Moleculares



INSULINA REGULA LOS NIVELES INTRACELULARES DE CALCIO EN EL CARDIOMIOCITO

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Lavandero
Facultad Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Directores de Tesis:

Prof. Dr. Sergio Lavandero G
Prof. Dr. Enrique Jaimovich
Centro FONDAP de Estudios
Moleculares de la Célula
Universidad de Chile

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO.

ARIEL EDUARDO CONTRERAS FERRAT

Santiago de Chile, 2006

Esta memoria de título, se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Centro de Excelencia FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y fue financiado por el Proyecto **FONDAP 15010006**. Investigador responsable: Dr. Sergio Lavandero.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia (Claudio, Sergio, Marcela y Padres), por el amor y protección desde siempre, por el apoyo en el camino que decidí recorrer y por la fortaleza que nos mantiene unidos frente a las adversidades. Gracias madre querida por tu ternura y abnegación.

Agradezco a mis íntimos amigos, Felipe Astorga y Alejandro Rojas, por las interminables discusiones a cerca de todo aquello que nos hace estar Vivos.

En forma especial, al profesor Dr. Sergio Lavandero por la confianza en sus estudiantes, por el compromiso con la formación profesional y por la fuerza que imprime en el desarrollo científico. También al profesor Dr. Enrique Jaimovich por su ayuda y entusiasmo en cada paso de nuestro trabajo.

Al sólido maestro Cristián Ibarra, infinitas gracias por iniciarme en el fantástico mundo del Calcio.

Al laboratorio en pleno: profesor Dr. Guillermo Díaz-Araya, sorprendente Mario Chiong, Genial Francisco Moraga, Fidel, Clara, Paola M, Paola R, Paola N, José Miguel, Juan Pablo, José Luis, David, Miguel, Hernán, Oveja, Cristian, Maritza, Alfredo y todos.

Particularmente a Jessica y Barbra, valentina, Diego, Daniela, Roberto y Santa Inés. Finalmente, como no agradecer al fantástico grupo de los "losers": maestro de maestros, mi querido amigo Dagoberto, Rodrigo, Pablo y quien escribe.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	<i>iii</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	<i>vii</i>
RESUMEN	<i>ix</i>
SUMMARY	<i>xi</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Insulina	1
1.2. Receptor de insulina y su sistema de transducción	2
1.3. Características estructurales y funcionales de los cardiomiocitos	7
1.4. Acción de insulina en corazón de mamíferos	7
1.5. Desregulación de la acción de insulina en el corazón:	9
1.6. Calcio en cardiomiocitos	10
1.7. Insulina y calcio	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVO GENERAL	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Reactivos químicos.....	16
5.2. Animales	17
5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos	17
5.4. Inmunofluorescencia.....	18

5.5. Ensayos de unión de [¹³¹ I]-insulina	19
5.6. Determinación del [Ca ²⁺] _i	19
5.7. Análisis Western blot	21
5.8. Expresión de resultados y análisis estadísticos	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Distribución subcelular del receptor de insulina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata	22
6.2. Caracterización del receptor de insulina en cardiomiocitos de rata por ensayos de radioligando	27
6.3. Efecto de insulina en la activación de la proteínas kinasa ERK en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.	28
6.4. Efecto de insulina en los niveles de [Ca ²⁺] _i en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata	30
6.5. Rol del Ca ²⁺ _v tipo L y del RyR en la movilización del [Ca ²⁺] _i inducida por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos	37
6.6. Participación de reservorios intracelulares de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico en la movilización del [Ca ²⁺] _i inducido por insulina	41
6.7. Participación de la vía transduccional dependiente de PI3K y de PLC	42
6.8. Identificación de la liberación del pool de Ca ²⁺ dependiente del receptor de IP ₃	43
6.9. Activación de subunidad βγ de proteína G heterotrimérica inducida por insulina	45
7. DISCUSIÓN	48
9. BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis y estructura de insulina.....	2
Figura 2. Estructura del receptor de insulina (RI).....	3
Figura 3. Nodos críticos en la señalización mediada por insulina	6
Figura 4. Regulación del metabolismo energético del corazón por insulina	9
Figura 5. Proceso de excitación-contracción en el cardiomiocito	12
Figura 6. Detección del RI en cardiomiocitos de rata neonata.....	24
Figura 7. Detección del RI en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata adulta	26
Figura 8. Caracterización de los receptores de insulina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata por ensayo de radio-ligando.....	28
Figura 9. Efecto de insulina en la fosforilación de ERK1/2 y detección de IR en extractos de cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos.....	29
Figura 10. Controles básicos en la adquisición de imágenes seriadas	30
Figura 11. Efecto de la concentración de insulina en los cambios de los niveles $[Ca^{2+}]_i$ en el tiempo	31
Figura 12. Estudio de la concentración de insulina sobre los niveles $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos	33
Figura 13. Caracterización de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ producida por insulina 1 nM en cardiomiocitos neonatos depende de la activación del RI	35
Figura 14. Efecto de insulina en los niveles intracelulares de calcio en cultivos primarios de fibroblastos cardiacos neonatos.....	36
Figura 15. Participación del Ca^{2+}_v tipo L y del RyR en el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.....	40
Figura 16. Efecto de insulina sobre los reservorios intracelulares de Ca^{2+}	42
Figura 17. Efecto de la inhibición de PI3K y PLC en la señal del $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina.....	43

Figura 18. Efecto de la inhibición del 2-APB y xestospongina en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos	45
Figura 19. Participación de las subunidades $\beta\gamma$ de una proteína G heterotrimérica en la generación de la señal $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina	47
Figura 20. Modelo de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ propuesto.....	61

ABREVIATURAS

2-APB:	2-amino etoxidifenil borato
Ad- β ARKct:	Adeno- β ARKct
Ad-GFP:	Adeno-GFP
ATP:	Adenosina trifosfato
BAPTA-AM:	BAPTA-acetometil éster
BSA:	Seroalbúmina de bovino
Ca ²⁺ :	Calcio
[Ca ²⁺] _i :	Calcio intracelular
Ca ²⁺ /CaM:	Calcio calmodulina
CaM:	Calmodulina
CaMK:	Proteína kinasa dependiente de Ca ²⁺ /CaM
Ca ²⁺ _v tipoL:	Canal de Ca ²⁺ tipo L sensible a voltaje.
cAMP:	Adenosina monofosfato cíclico
Cf:	Cafeína
Cn:	Calcineurina
CICR:	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
DAG:	Diacilglicerol
DHPR:	Receptor de dihidropiridina
DMEM:	Medio Eagle's modificado Dulbecco
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK:	Proteína kinasa regulada extracelularmente
Fluo-3 AM:	Fluo-3 acetometil éster
Gen:	Genisteína
HEPES:	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etansulfónico
IGF-1:	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1
Ins:	Insulina
[¹³¹ I]-Ins:	Insulina marcada en tirosina con yodo ¹³¹
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R:	Receptor de IP ₃
IR:	Receptor de Insulina
KRPHG:	Krebs Ringer fosfato HEPES glucosa
La:	Lantano
mRNA:	RNA mensajero
M199:	Medio 199
MAPK:	Proteína kinasa activada por mitógenos
MEC:	Matriz extra celular
PBS:	Tampón fosfato salino

PI3K:	Fosfoinositido-3-Kinasa
PLC:	Fosfolipasa C
PKA:	Proteína kinasa A
PKC:	Proteína kinasa C
PTX:	Toxina <i>Bordetella Pertussis</i>
RNA:	Ácido ribonucleico
RSE:	Retículo sarco-endoplasmático
ROI:	Región óptica de interés
RyR:	Receptor de rianodina
SERCA:	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarcoplásmico
Th:	Tapsigargina
TXP:	Toxina Pertussis
U-73122:	Inhibidor de PLC
La:	Lantano
LY292004	Inhibidor de PI3K
Xesto:	Xestospongina

RESUMEN

Insulina y su receptor (RI) regulan el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos en el corazón. La activación de este receptor por su ligando endógeno desencadena una serie de eventos reguladores de la homeostasis energética del cardiomiocito. Se desconoce el efecto de insulina sobre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, un importante regulador de la contracción y de la transducción de señales en el cardiomiocito. Nuestro objetivo consistió en investigar el mecanismo mediante el cual insulina regula los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos.

Los resultados de inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron que el RI está presente en la membrana plasmática, citoplasma y región perinuclear en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas, mientras que en cardiomiocitos adultos sólo se localizó en la membrana plasmática y sus inmediaciones. Los análisis Western blot revelaron que el RI está presente en extractos totales de cardiomiocitos y que al estimularlos con insulina 1 nM se activó la proteína quinasa ERK, un blanco río abajo conocido para el RI. Usando fluo-3AM y microscopía confocal se estableció que insulina aumentó en forma rápida (tiempo máximo: 1s) y transitoria (28 ± 6 seg) los niveles $[Ca^{2+}]_i$, alcanzando una respuesta máxima de $214 \pm 31\%$ $[(\Delta F/F) \cdot 100]$ ($n=10$) y dependiente de la concentración (0.1-1000 nM). Esta señal fue completamente bloqueada por genisteína (inhibidor inespecífico de tirosinas kinasas). Nifedipino (inhibidor del canal Ca^{2+}_vL type) bloqueó la señal rápida de Ca^{2+} , dejando en evidencia una segunda señal mas lenta y de menor intensidad. Por otro lado, rianodina (inhibidor

del canal de Ca^{2+} RyR) produjo un efecto similar al de nifedipino, sugiriendo una entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. La inhibición de PI3-K (LY294002), de PLC (U-73122) y la expresión adenoviral de un péptido secuestrador de subunidades $\beta\gamma$ de proteína G heterotrimérica (Ad- β ARKct), modificaron la cinética de la señal producida por insulina 1nM, registrándose señales rápidas de 1 seg de duración para cualquiera de estas condiciones. La inhibición de la proteína $G_{i/o}$ con toxina pertussis solo modificó parcialmente el perfil cinético de la señal. De esta forma, nuestros resultados sugieren que aumenta los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a través de un mecanismo que involucra, en una primera etapa a la vía de transducción: IR- Ca^{2+} vLtype-RyR- Ca^{2+} , y luego a la vía: IR- $G\beta\gamma$ -PI3K-PLC-IP₃- Ca^{2+} .

SUMMARY

Insulin and its receptor (IR) regulate lipid and carbohydrate metabolism in the cardiac tissue. IR activation triggers a series of regulatory signaling events for cardiomyocyte energy homeostasis. Whether insulin changes intracellular calcium levels, an important second messenger for myocardial contraction remains unknown. Our aim was to investigate the mechanism by which insulin could regulate intracellular calcium levels in cultured neonatal rat cardiomyocytes.

Immunofluorescence and confocal microscopy studies showed that the IR was detected in cytoplasmic membrane, cytoplasm and perinuclear region in primary cultured neonatal cardiomyocytes while in cultured adult rat cardiomyocytes was only located on or nearby the cytoplasmic membrane. Western blots analysis also revealed the presence of IR and the activation of ERK, a target in IR signaling molecule downstream of the IR, in total extract obtained from cardiomyocyte treated with insulin. Using Fluo3-AM and confocal microscopy, we detected that insulin increases fast (maximum after 1 sec) and transient (28 ± 6 sec) intracellular Ca^{2+} levels, reaching a maximum of $214 \pm 1\%$ $[(\Delta F/F) \cdot 100]$ ($n=10$). This effect was also concentration-dependent (0.1–1000 nM). This signal was completely blocked by genistein (a general tyrosine kinase inhibitor). Nifedipine (a Ca^{2+}_v L-type channel inhibitor) blocked the first and fast signal of $[Ca^{2+}]_i$, revealing a more slower and smaller second component of the signal. Ryanodine (RyR channel Ca^{2+} blocker) produced an similar effect than nifedipine, suggesting a Ca^{2+} entry from the extracellular space. The inhibition of PI3K by LY-294002, phospholipase C by U-73122 and the G protein $\beta\gamma$ subunits by adenoviral

expression of a sequestering peptide (Ad β arkct), modified the time-course of the insulin-induced signal, detecting fast increases in calcium levels for any of the studied experimental conditions. The inhibition of the $\alpha_{i/o}$ subunit of G protein with pertussis toxin only modified partially the calcium kinetic pattern. Our results collectively suggest that insulin increases the $[Ca^{2+}]_i$ levels by two signaling pathway, a first one involving the IR- Ca^{2+} vLtype-RyR- Ca^{2+} and a second conformed by IR-G $\beta\gamma$ -PI3K-PLC-IP₃- Ca^{2+} .

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Insulina

Insulina es una hormona peptídica sintetizada por las células beta del páncreas endocrino y es secreta a la circulación en respuesta a aumentos en los niveles de glucosa circulante a través de un mecanismo que involucra transportadores de glucosa (GLUT), razón ATP/ADP, K^+ , Ca^{2+} , entre otros (1). El mRNA de insulina se traduce en el retículo endoplasmático de las células β del páncreas como pre-proinsulina y durante su tránsito por el aparato de Golgi se procesa en su extremo amino-terminal generando proinsulina. En las vesículas de secreción se almacena insulina y péptido C en cantidades equimolares. La insulina madura consta de dos cadenas peptídicas unidas por tres puentes disulfuro. Las cadenas A y B, de 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente, están unidas por dos puentes disulfuro. También hay un puente disulfuro entre las cisteínas 6 y 11 de la cadena A, formando una estructura final de 51 aminoácidos con una masa molecular de 5,8 kDa (2) (Figura 1). La concentración de insulina en el plasma varía entre 0,01 y 10 nM dependiendo si se efectúa la determinación antes o después de la ingesta de alimentos. Insulina posee una vida media de 5 min, lo que permite un efectivo control de su concentración plasmática regulando finamente su bioactividad en diferentes tejidos y tipos celulares (3).

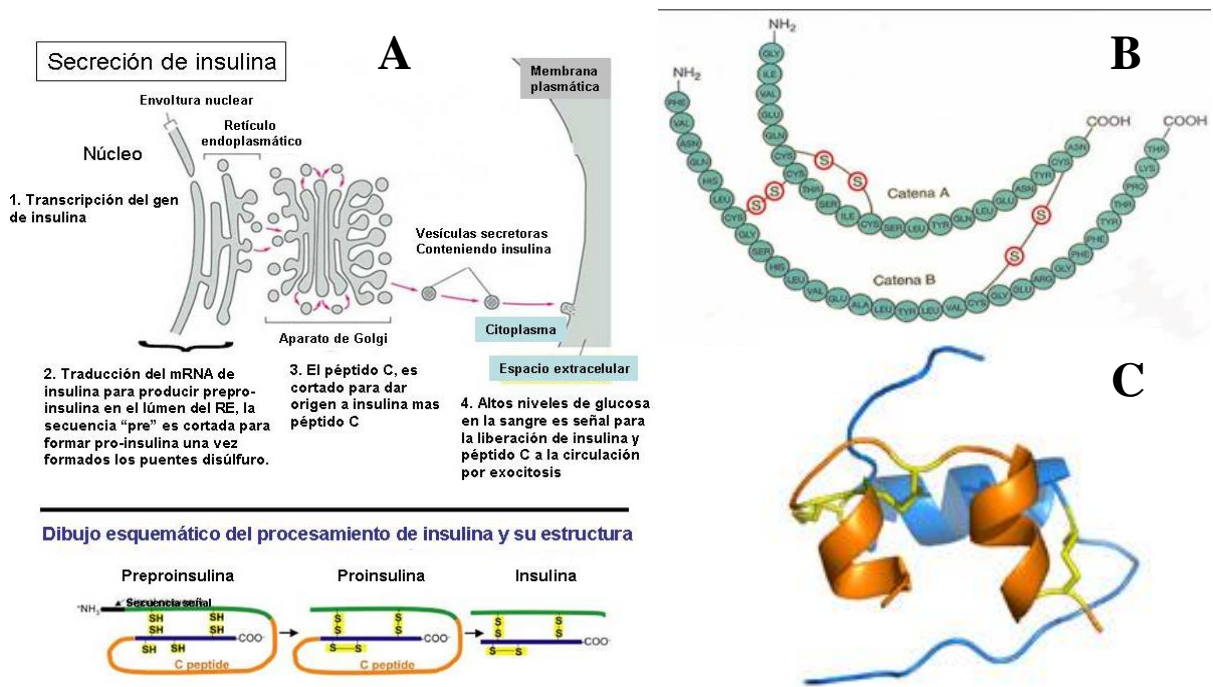


Figura 1. Síntesis y estructura de insulina.

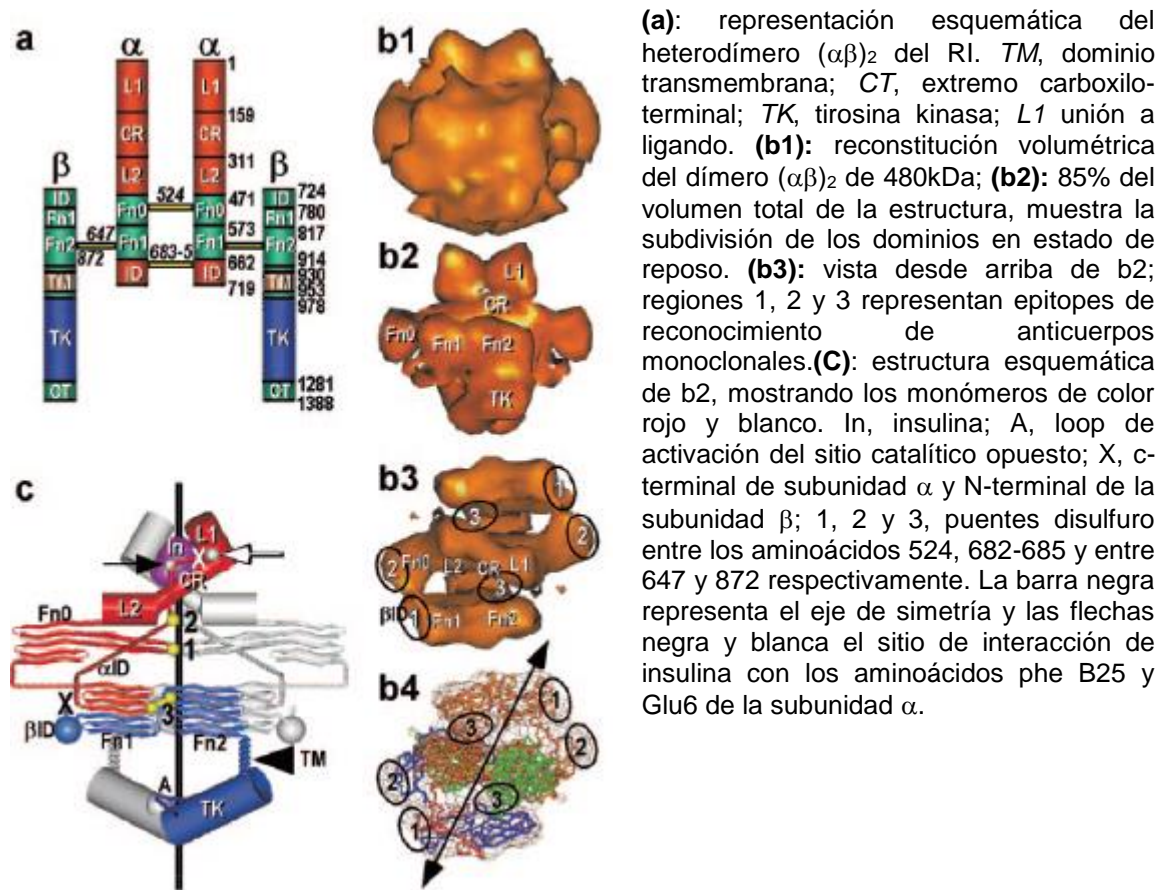
En (A) se muestra la secreción de insulina hacia la circulación desde las células β del páncreas endocrino. El proceso comienza con su síntesis a nivel del retículo endoplasmático, formando preproinsulina. Luego continúa el período de vesiculación y destinación al aparato de Golgi donde este péptido se procesa a proinsulina en las vesículas de secreción y por acción de proteasas vesiculares se forma insulina y péptido C. (B) y (C) muestra la estructura primaria y nativa de insulina, respectivamente.

1.2. Receptor de insulina y su sistema de transducción

Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de transmembrana con actividad tirosina kinasa intrínseca. A diferencia de los otros miembros monoméricos de esta familia, el receptor de insulina es un heterodímeros $(\alpha\beta)_2$ unidos por puentes disulfuro. La subunidad α , de 135 kDa, está orientada hacia el espacio extracelular para pensar la presencia de su ligando. En cambio la subunidad β , de 95 kDa, contiene una porción extracelular, una región de transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa (4). La unión

de insulina a su receptor ocurre a través de la subunidad α y produce un cambio conformacional de la proteína que genera la actividad tirosina kinasa intrínseca de la subunidad β y desencadenamiento de su cascada de transducción (Figura 2). Poco se conoce a cerca de las modificaciones post-traduccionales que presenta el receptor de insulina, aunque evidencias en adipocitos 3T3-L1 y otros tipos celulares han descrito que la N-glicosilación del receptor dependiente de la concentración de glucosa externa. Los diferentes niveles de glicosilaciones del receptor serían importantes tanto en la interacción ligando-receptor como su bioactividad (5).

Figura 2. Estructura del receptor de insulina (RI).



Los efectos de insulina en las células blanco, están mediadas por una compleja y altamente integrada red de transducción que controla diversos procesos celulares. En presencia de insulina, el receptor se autofosforila y luego su actividad kinasa intrínseca fosforila al sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), una proteína adaptadora asociada a la activación de dos principales vías transduccionales: PI3K/PKB y Ras-Raf-MEK-ERK. Ambas vías son responsables de las acciones metabólicas, regulando la expresión de algunos genes, crecimiento y diferenciación celular dependientes de insulina (6). Se han desarrollado modelos nodales que nos han ayudado a entender las múltiples interacciones de insulina en los diferentes sistemas. Un nodo crítico es un punto en una red de transducción que es esencial para la función biológica gatillada por la interacción ligando receptor, la cual ofrece divergencias para el entrecruzamiento entre sistemas y permite controlar finamente la respuesta obtenida. Así, para el receptor de insulina se han descrito tres nodos críticos en su sistema de transducción, las proteínas IRS-1, PI3K y AKT/PKB (7).

La importancia del primer nodo de transducción (IRS-1,2,3 y 4) radica en que es activado fundamentalmente por el propio RI, desencadenando la unión y activación de efectores proteicos río abajo. Mas aún, tanto el RI como IRS-1 comparten el mismo mecanismo de regulación: son activados por fosforilación en residuos de tirosina y son regulados negativamente por proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) y por fosforilación en residuos de serina (8) (9) .

PI3K es la enzima constituyente del nodo crítico numero 2. Ella está formada por dos subunidades, una regulatoria y otra catalítica, cada una de las cuales presenta distintas isoformas (10). La activación de la subunidad catalítica

depende de la interacción de dos dominios SH2 de la subunidad regulatoria con dos motivos específicos tipo fosfotirosina de la proteína IRS. De esta manera la proteína activa cataliza la formación de fosfoinositido 3-fosfato (PIP3), a partir de los fosfoinositidos de membrana plasmática. Así, proteínas que contengan dominios de homología tipo pleckstrina (PH), podrán ser reclutadas en la superficie interna de la membrana plasmática para desencadenar su acción (11).

El último nodo crítico de transducción descrito para la acción de insulina es Akt/PKB, una proteína serina/treonina kinasa ubicada río abajo de PI3K. Esta enzima media varias de las acciones metabólicas de insulina a través de la fosforilación de un amplio rango de sustratos incluyendo, otras kinasas, proteínas de señalización y factores transcripcionales (12).

Los nodos de transducción IR/IRS, PI3K y AKT/PKB son los llamados nodos críticos porque existen sólidas evidencias *in vivo* e *in vitro* que los vinculan con los principales efectos de insulina en una amplia variedad de modelos (13)(Figura 3). Esto no descarta que en determinados modelos de estudios, otras proteínas involucradas en la transducción de señales mediada por insulina puedan también actuar como nodos críticos de transducción, como ocurre por ejemplo con las familias de las PKCs, Rho GTPasa, Ras, p38-MAPK, entre otras (14).

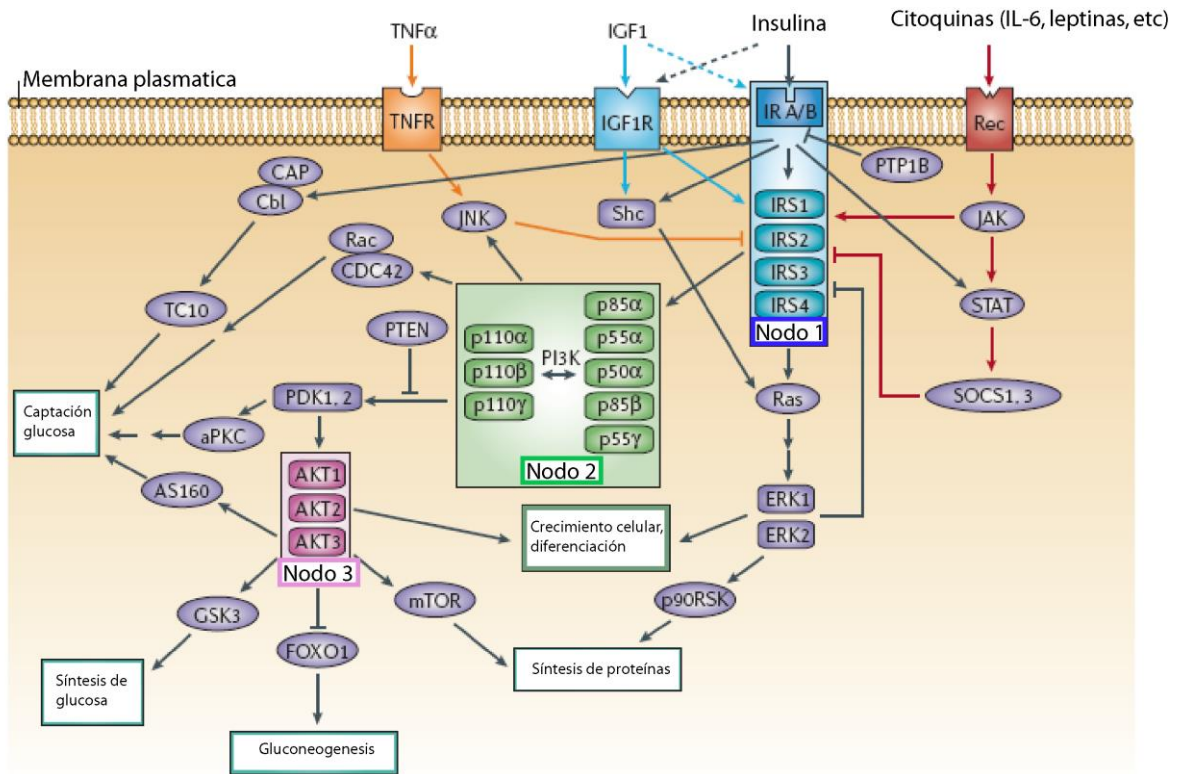


Figura 3. Nodos críticos en la señalización mediada por insulina

Se han descrito tres nodos críticos en la señalización río abajo del receptor de insulina: **a)** Las isoformas 1-4 del sustrato del receptor de insulina (IRS) (caja azul), **b)** fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) con algunas de sus subunidades catalíticas y reguladoras (caja verde) y **c)** tres isoformas de Akt/proteína kinasa B (caja rosada). La proteína kinasa C atípicas (aPKC), sustratos de PKB de 160 KDa (AS160), Cas-Br-M (murine) con homología de secuencia ectópica transformante retroviral (Cbl), proteína asociada a Cbl (CAP), proteína del ciclo de división celular 42 (cdc42), proteínas kinasa reguladas extra celularmente (ERK1/2), glicógeno sintetasa kinasa 3 (GSK3), c-jun-N-terminal kinasa (c-JNK), blanco de rapamicina de mamífero (mTOR), son considerados Intermediarios efectores río abajo o moduladores de estos tres nodos críticos. Estas vías de transducción controlan el transporte y síntesis de glucosa, gluconeogénesis, síntesis de proteínas y crecimiento celular, entre otros. Con flechas naranjas, celestes y rojas se esquematizan los entrecruzamientos regulatorios con las vías de transducción del factor de necrosis tumoral (TNF α), IGF-1 y citoquinas, respectivamente. Taniguchi CM., et all, nature review, mol cell bio, Vol 7, 85-96, February 2006.

1.3. Características estructurales y funcionales de los cardiomiocitos

El corazón está formado principalmente por dos tipos celulares estrechamente vinculados. Los cardiomiocitos dan cuenta de la función contráctil de este órgano y corresponden al 33% del número total de células mientras que los fibroblastos cardiacos actúan modelando la matriz extracelular (MEC) cardiaca y dan cuenta del 66% restante de células (15). Los cardiomiocitos son células altamente especializadas que inmediatamente después del nacimiento cesan de dividirse y experimentan una diferenciación acelerada que en aproximadamente 10 días se convierten en células diferenciadas (16). Los fibroblastos tienen la capacidad de proliferar en respuesta a estímulos tróficos, mecánicos y de estrés tisular y sintetizan los componentes de la MEC tales como colágeno fibronectinas y laminina (17).

Las patologías cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad y morbilidad en nuestro país, por esta razón existe gran interés en investigarlas a fin de conocer sus mecanismos fisiopatológicos y así encontrar nuevos y mejores blancos terapéuticos.

1.4. Acción de insulina en corazón de mamíferos

Los principales órganos blancos de acción de la insulina en mamíferos son el músculo esquelético, tejido adiposo y el hígado, sitios donde se regula el metabolismo intermediario para la mantención de la homeostasis sistémica. Sin embargo hay otros tejidos, incluyendo el corazón, que expresan el RI (18).

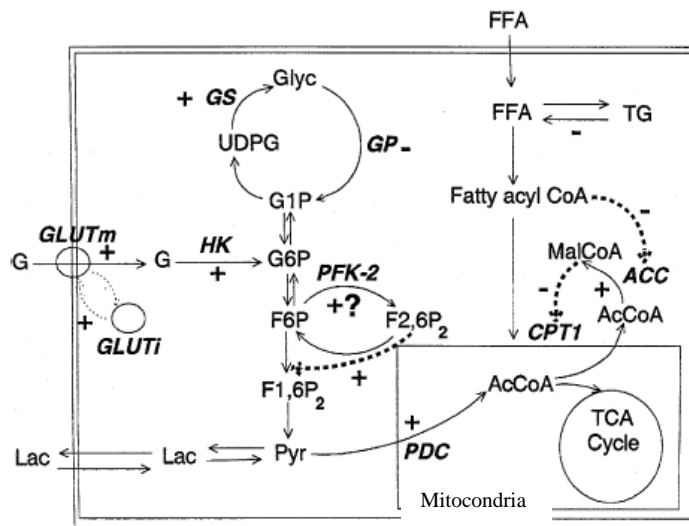
Considerando la importancia de insulina en sus principales tejidos blancos, y la gran cantidad de investigaciones en torno a estos modelos celulares, es necesario conocer mas a cerca de las acciones de insulina en el resto de los tejidos blancos como el corazón, la musculatura lisa vascular y sistema nervioso central, para llegar a obtener un mayor y mejor entendimiento de la acción de insulina en estos sistemas. Mas aún, el receptor de insulina se ha logrado detectar en una amplia gama de células especializadas en donde su rol no esta del todo claro (19). Debido a que el corazón es una bomba que está en constante funcionamiento, posee una gran demanda energética de ácidos grasos y glucosa, presenta una cantidad importante de mitocondrias que efectúa el metabolismo oxidativo aerobio y que moviliza al Ca^{2+} constantemente para su actividad contráctil, es menester imprimir grandes esfuerzos en determinar el rol de insulina en cardiomiocitos.

Insulina permite el ingreso de sustratos metabólicos al corazón que juegan un importante rol en el balance energético de los cardiomiocitos, a través de su acción en el tejido adiposo, músculo esquelético y tejido hepático (20). En la Figura 4 se muestra algunos de los efectos directos de insulina sobre el corazón a nivel de:

- a) Transporte de glucosa: a través de los transportadores facilitativos para glucosa GLUT-1 y GLUT-4,
- b) Metabolismo del glicógeno,
- c) Oxidación de piruvato,
- d) Regulación de glicólisis,
- e) Metabolismo de ácidos grasos.
- f) Regulación de la expresión de proteínas del miocardio.

Se ha descrito que insulina aumenta la expresión de GLUT1/4, 6-fosfofructo-1 kinasa (PFK1), 6-fosfofructokinasa-2 (PFK2), glicógeno sintasa, piruvato deshidrogenada, pero disminuye la de glicógeno fosfatasa y lipasas sensibles a hormonas. Sin embargo, insulina también posee algunos efectos indirectos como es la regulación de la perfusión a través del aumento de la producción de óxido nítrico del endotelio vascular (21) (22).

Figura 4. Regulación del metabolismo energético del corazón por insulina



G, glucosa; GLUT, transportadores de glucosa; HK, hexokinasa-II; G6P/G1P, glucosa 6 o 1 fosfato; F6P, fructosa 6 fosfato; F16P/F26P, fructosa 1,6 ó 2,6 bifosfato; Pyr, piruvato; Lac, lactato; TG, triacilglicerol; AcCoA/MalCoA, acetil/malonil CoA; FFA, ácidos grasos libres; UDPG, uridina glucosa bifosfato; Glyc, glicógeno; GS, glicógeno sintasa; GP, glicógeno fosforilasa; ACC, acetil CoA carboxilasa; CPT-1, carnitin palmitoil transferasa-I; PDC, complejo piruvato deshidrogenada. Car. Res. 34 (1997) 3-24.

1.5. Desregulación de la acción de insulina en el corazón:

Alteraciones en la disponibilidad de insulina o en su ruta de señalización activan una serie de procesos fisiopatológicos, incluyendo cambios en la función metabólica asociados a resistencia a la insulina, obesidad, hipertensión arterial, hipertrofia cardíaca, así como cardiomiopatías en diabetes tipo I y tipo II (23). La captación basal de glucosa en el corazón aumenta en pacientes hipertensos y en animales con hipertrofia cardíaca (24). Sin embargo, la captación de glucosa en

respuesta a la insulina disminuye en corazones hipertrofiados provenientes de ratas espontáneamente hipertensas. Estos descubrimientos indican que la captación de glucosa basal o independiente a la insulina está acelerada, posiblemente en forma compensatoria y que la captación de glucosa dependiente de insulina está afectada en corazones expuestos a sobrecarga de presión, deteriorando el normal funcionamiento metabólico dependiente de glucosa (25).

Por otra parte, modelos experimentales de resistencia a la insulina presentan un patrón de fosforilación alterado de IRS-1, potenciando la fosforilación en residuos de serina por sobre la fosforilación en residuos de tirosina, lo que apaga la señal transduccional dependiente del receptor de insulina y de la activación de sus blancos moleculares río abajo (26).

1.6. Calcio en cardiomiocitos

El Ca^{2+} es un mensajero intracelular altamente versátil que opera en amplios rangos temporales regulando diferentes procesos celulares (27). Liberaciones rápidas de Ca^{2+} regulan procesos relacionados con respuestas puntuales y focalizadas, mientras que las respuestas a largo plazo son controladas por liberaciones transitorias y repetitivas del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a lo largo del tiempo, describiendo pulsos tipo “código” según la frecuencia y amplitud de la señal (28). Los cardiomiocitos cumplen un papel activo en la función cardíaca pues son las células encargadas de producir la contracción del tejido y que le permiten bombear la sangre hacia todo el organismo, siendo este proceso dependiente del Ca^{2+} . Sin embargo, el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también regula procesos celulares rápidos como la exocitosis

de neurotransmisores, la contracción muscular, y la transducción de señales, además de procesos lentos como la expresión génica o la síntesis protéica, hipertrofia y desarrollo tisular (29).

El acoplamiento excitación-contracción cardíaco es el proceso que relaciona la excitación eléctrica del cardiomiocito, determinada por la despolarización del túbulo T, con la contracción muscular mediada por las proteínas contráctiles actina y miosina. El Ca^{2+} es el encargado de iniciar, mantener y regular ambos procesos (30).

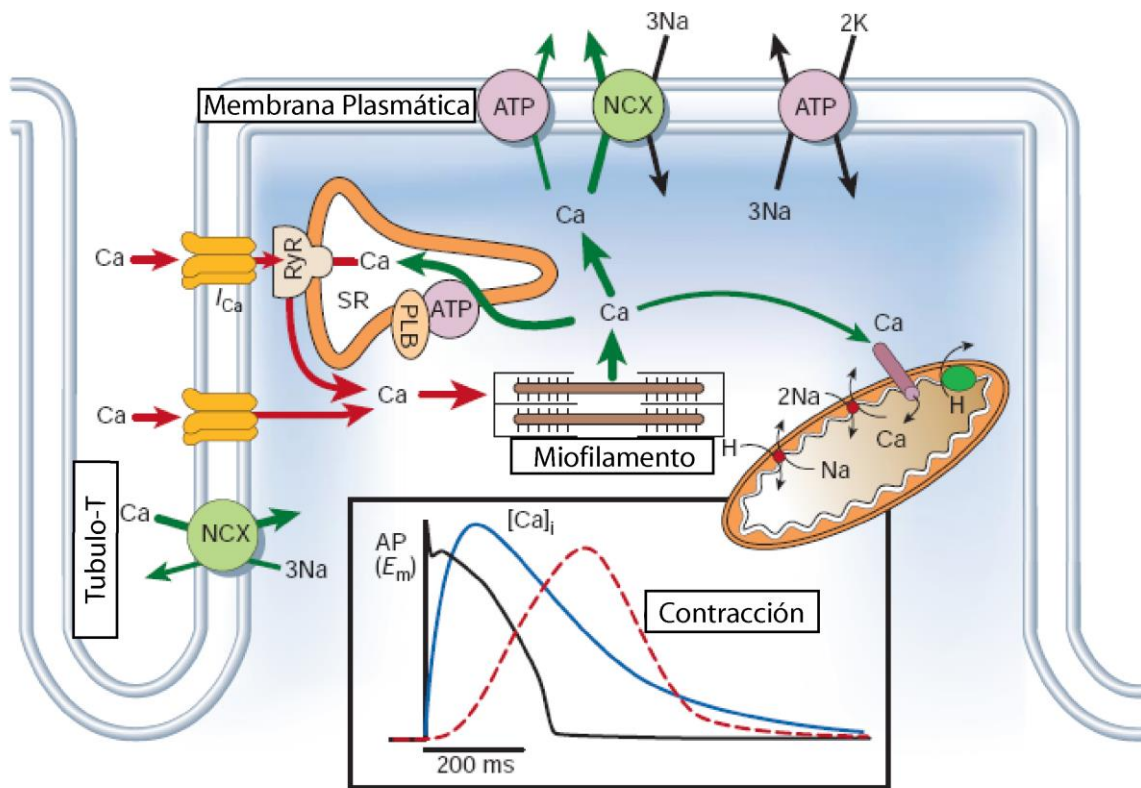


Figura 5. Proceso de excitación-contracción en el cardiomiocito

La figura muestra a los principales involucrados moleculares en la respuesta contráctil previa despolarización de la membrana plasmática de los cardiomiocitos. El fenómeno de CICR, se produce en las membranas del túbulo-T en una estructura celular denominada “diada”. El calcio que sale desde el receptor de rianodina, es el encargado de producir la contracción celular al regular proteínas del sistema contráctil o miofilamentos. En el gráfico de la figura se muestra en negro la despolarización de la membrana plasmática, en azul las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares y en rojo la contracción celular, todo versus el tiempo.

Durante la despolarización del túbulo T, los cambios del potencial de membrana en los cardiomiocitos son censados por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, sensibles a dihidropiridinas (DHPR). Con la despolarización, los canales de Ca^{2+} tipo L se abren permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula. El Ca^{2+} que entra actúa como agonista sobre los canales de calcio

sensibles a rianodina (RyR) ubicados en la membrana del retículo sarcoplásmico. La activación de los RyR gatilla su apertura, permitiendo que el calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico salga hacia el citoplasma, este proceso se conoce como liberación de calcio inducida por calcio (CIRC, del inglés: *calcium-induced calcium release*) (31). El Ca^{2+} liberado puede activar a otro RyR aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} , de tal forma que pueda unirse a la troponina C. Esta proteína, en un medio con poco calcio inhibe la interacción entre actina y miosina, pero en un medio con altos niveles de calcio, esta inhibición cesa y la actina se combina con la miosina utilizando ATP mediante una ATPasa dependiente de Ca^{2+} . La energía liberada por este proceso es transformada en trabajo mecánico, que resulta en el acortamiento de las miofibrillas y la contracción cardíaca (32) (figura 5).

1.7. Insulina y calcio

Hace aproximadamente 25 años atrás, se logró vincular por primera vez defectos en la contractibilidad cardíaca en animales diabéticos libres de injurias vasculares. En este sentido, los estudios realizados en el laboratorio de Sonnenblinck's, fueron claves para lograr describir anomalías en la función contráctil presentes en animales diabéticos (33). Este trabajo fue pionero en proveer un sólido marco de estudio racional para un largo número de publicaciones posteriores que secuencialmente fueron confirmando la estrecha relación entre déficit de insulina y mal funcionamiento cardíaco. No se conoce una relación entre insulina y Ca^{2+} en cardiomiocitos ni mucho menos un mecanismo

transduccional implicado. Sin embargo, se ha relacionado al Ca^{2+} participante en la función contráctil con la diabetes farmacológicamente inducida, así como también alteraciones de las rutas de transporte de Ca^{2+} en cardiomiopatía diabética (34). La utilización de sondas fluorescentes en cardiomiocitos aislados, han provisto valiosa información a cerca de mecanismos moleculares implicados en el fenómeno contráctil. Usando estas aproximaciones experimentales se ha reportado que la contracción del cardiomiocito esta afectada en corazones diabéticos (35). El acortamiento celular durante la contracción, la velocidad de contracción (dL/dt) y la velocidad de relajación en la contracción ($-dL/dt$) fueron mas baja en cardiomiocitos provenientes de corazones diabéticos, mientras que el tiempo que tardan en alcanzar el máximo de contracción esta significativamente aumentado (36). finalmente, las corrientes de Ca^{2+} y K^+ , la actividad de la bomba intercambiadora de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, SERCA y la función mitocondrial, también están afectadas en cardiomiocitos provenientes de corazones diabéticos (37). En resumen, varios estudios muestran que la función de los principales organelos que manejan Ca^{2+} están disminuidas en cardiomiocitos de corazones diabéticos, lo que causaría alteraciones en la movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diferentes sistemas de segundos mensajeros involucrados en el acoplamiento excitación-contracción, pueden también estar alterados generando deterioro metabólico.

2. HIPÓTESIS

Insulina aumenta los niveles intracelulares de calcio en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas por un mecanismo compuesto, dependiente del calcio extracelular y de reservorios intracelulares regulados por IP₃.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de insulina sobre los niveles intracelulares de calcio en cardiomiocitos de rata neonata.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Investigar la presencia y funcionalidad del receptor de insulina en cardiomiocitos.

4.2 Estudiar los efectos tempranos de insulina sobre los niveles intracelulares de calcio.

4.3 Determinar el mecanismo mediante el cual insulina aumenta los niveles intracelulares de calcio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos químicos

Insulina, Medio Eagle's modificado de Dulbecco (DMEM), medio 199 (M199), rianodina, taspigargina, Toxina *Bordetella pertussis* (PTX), 2-APB y anticuerpo IgG FitC conjugado de cabra anticonejo se compraron a Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Fluo-3 acetoximetilester (Fluo-3 AM), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-*N,N,N,N*-tetraacetico-acetoximethilester (BAPTA-AM), ácido plurónico se adquirieron a Molecular Probes (Eugene, OR). U-73122, LY294002, genisteina y xestospongina- C se adquirieron a Calbiochem (La Jolla, CA). ^{131}I 10 mCi se adquirió a CCHEN (Santiago, Chile). Anticuerpo anti ERK1/2 (K-23) y anti-subunidad β del receptor de insulina (C-19) y (29B4) fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Ketamina y xilazina utilizada fueron de uso veterinario. Laminina fue donada por el Dr Thomas K Borg (University of South Carolina, Columbia). Anticuerpo anti-caveolina-3 se adquirió a BD bioscience (Franklin Lakes, NJ USA 07417). Otros reactivos de grado químico y de biología molecular se compraron a Sigma Chemical Co.

Los vectores adenovirales (Ad) se propagaron y purificaron como se ha descrito previamente (38). Los transgenes Adeno- β ARKct (Ad- β ARKct), Adeno-GFP (Ad.GFP) y vector vacío fueron donados por el Dr W.J. Koch (Duke University Medical Center, Durham, NC). β ARKct es un péptido inhibidor de la señalización vía $G\beta\gamma$ (39). Los cardiomiocitos se infectaron con vectores adenovirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 300.

5.2. Animales

Las ratas utilizadas provinieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Todos los estudios con animales contaron con la aprobación del Comité de Bioética de nuestra institución. Esta investigación se realizó acorde a la guía “Guide for the care and use of laboratory animals” publicada por Instituto de Salud de Estados Unidos, (NIH publicación N°85-23, revisada en 1985).

5.3. Cultivo primario de cardiomiocitos

Cardiomiocitos neonatos se prepararon a partir de corazones de ratas Sprague-Dawley de 1 a 3 días de edad, como se ha descrito previamente (40). Para la detección de $[Ca^{2+}]_i$, los cardiomiocitos se sembraron a una densidad final de $0,7 \times 10^3/mm^2$ en cubreobjetos precubiertos con gelatina al 2%. Para el ensayo de inmuno western blott y desplazamiento de radio ligando, los cardiomiocitos se sembraron a una densidad de $2,1 \times 10^3/mm^2$ en placas de 35mm de diámetro pre incubadas con gelatina al 2%. Las células se privaron de suero por 24 h antes de realizar los experimentos, pasando a medio DME/M199 (4:1) libre de suero. Cardiomiocitos de ratas adultas se prepararon a partir de corazones de ratas adultas Sprague-Dawley (>250 g). Las ratas se anestesiaron con ketamina (67 mg/Kg) y xilazina (7 mg/Kg), los corazones fueron sacados, lavados con tampón Gerard ($0,19 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $1,01 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 10 mM HEPES , 128 mM NaCl , 4 mM KCl , $1,39 \text{ mM MgSO}_4$, $5,5 \text{ mM glucosa}$, $2 \text{ mM ácido pirúvico}$, pH 7,4) y profundidos retrógradamente a 4 mL/min con tampón Gerard que contenía 1 mM

CaCl₂ durante 3 min, seguidos de tampón Gerard con 1 mM EGTA durante 1 min y finalmente con tampón Gerard con hialuronidasa (p/v) 0,07% y colagenasa 0,07% (p/v) por 30 min. Los corazones digeridos se disgregaron en 5 mL de tampón Gerard, mezclados con 20 mL de solución de digestión, incubados a 37°C con agitación constante por 10 min, y los sobrenadantes se centrifugaron a 500 rpm por 30 s. El tejido remanente se digirió con 20 mL de solución de digestión. El sobrenadante, enriquecido en fibroblastos se desechó, mientras que la pella celular enriquecida en cardiomiocitos se resuspendió en tampón Gerard y se plaquearon en laminina 10µg/cm² a una densidad final de 1,0 x 10³/mm².

5.4. Inmunofluorescencia

El receptor de insulina se localizó por inmunofluorescencia indirecta. Los cardiomiocitos se lavaron tres veces con PBS, luego fijados con formaldehído al 4% en PBS por 10 o 20 min, según corresponda, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PBS por 5 o 20 minutos, según corresponda, y tratados con una solución de bloqueo 1% BSA en PBS por 30 min. Las células se incubaron con los anticuerpos anti-IR_β policlonal (C-19, 1:200), anti-IR_β monoclonal (29B4, 1:200), anti-caveolina3 monoclonal (1:300) en BSA al 1% filtrado por 2 h a temperatura ambiente. Luego, los cardiomiocitos se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado a fluoresceína-isotiocianato (1:200) y anti-raton Cy3 (1:300) por 1,5 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se les añadió Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) para prevenir blanqueamiento. Los cardiomiocitos se examinaron con un microscopio confocal (LSM pascal5, Carl Zeiss).

5.5. Ensayos de unión de [¹³¹I]-insulina

Insulina se marcó radioactivamente con I¹³¹ según el método de la cloramina T. Luego la hormona marcada se separó del [I¹³¹] remanente mediante cromatografía usando una resina DOWEX AGI-X8. Para la obtención de las membranas celulares totales, los cardiomiocitos se lisaron con 1 mM Tris-HCl pH 7.5 que contenía 2 mM EGTA y se centrifugaron a 10.000 g por 30 min at 4°C. Posteriormente las membranas se resuspendieron y congelaron a -80°C hasta su utilización en solución SET (0.25 M sacarosa, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl). Para los ensayos de radioligando, las membranas se resuspendieron y sonicaron en solución de ensayo (Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 0.25% BSA). La suspensión de membranas se incubó con Insulina-I¹³¹ en concentraciones crecientes (0,1-20 nM) a 4°C por 1,5 h en un volumen final de 250 µl en ausencia o presencia de insulina no marcada, 50 veces más concentrada que insulina-I¹³¹. Finalmente la radioactividad asociada a las membranas se determinó en un contador γ.

5.6. Determinación del [Ca²⁺]_i

Las imágenes de calcio intracelular se obtuvieron a partir de cardiomiocitos neonatos precargados con Fluo-3 AM (5,4µM) por 30 min a temperatura ambiente, usando un microscopio confocal (LSM pascal5, Carl Zeiss) equipado con laser Ar 488nm, 458nm, 514nm y un sistema de adquisición de imágenes (LSM pascal5). Los cardiomiocitos se lavaron tres veces con medio de reposo con Ca²⁺ (tampón

Krebs: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,6 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-Na, 5,6 mM glucosa, pH 7,4) para remover el medio de cultivo DMEM/M199, y cargados con Fluo-3 AM 5,4 μM (a partir de un stock 20 % de ácido plurónico en DMSO) por 30 min a T° ambiente. En seguida, los cardiomiocitos se lavaron ya sea con el mismo tampón o con medio de reposo nominalmente libre de calcio externo (tampón Krebs libre de Ca²⁺: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,0 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-Na, 5,6 mM glucosa, pH 7,4) y utilizados dentro de 2 h. Los cubreobjetos con las células se montaron en una cámara plástica de 1 ml de capacidad y puestos en el microscopio para las mediciones de fluorescencia, luego de excitar a una longitud de onda de 488 nm. Insulina se añadió directamente a la solución y las imágenes de fluorescencia se capturaron cada 0,985 segundos y analizadas cuadro a cuadro con el programa de adquisición de imágenes del microscopio confocal (LSM pascal5) o con el programa "ImageJ" (desarrollado por el National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892). Se usó generalmente un lente objetivo PlanApo 63X o 40X (apertura numérica 1.4). Las dimensiones de las imágenes fueron de 512 x 512 píxeles. El calcio intracelular se expresaba como porcentaje de fluorescencia relativa respecto a la fluorescencia basal (un valor estable por al menos 5 min en condiciones de reposo). La intensidad de la fluorescencia es proporcional al aumento en los niveles de calcio intracelular (41).

5.7. Análisis Western blot

El lisado celular, correspondiente a la extracción de proteínas totales, se cuantificó por el método de Bradford. Posteriormente, se cargaron entre 20 y 40 μg de proteínas, las que fueron separadas por SDS-PAGE al 10% y fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA al 4% en TBS-tween20 0,1% (TBST) por 1 h a T° ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo (1:1.000) y las membranas se incubaron con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche y luego lavadas 3 veces por 10 min en TBST e incubadas con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (1:5.000) por 1,5 h. Luego las membranas se lavaron tres veces por 10 min y las bandas de proteínas se detectaron usando solución de ECL exponiendo las membranas a film Kodak por 5-20 seg. Los films se escanearon y cuantificaron por densitometría.

5.8. Expresión de resultados y análisis estadísticos

La fluorescencia de los cardiomiocitos se expresó como porcentaje de fluorescencia relativa respecto al nivel de fluorescencia basal, representado como $\{(F-F_0)/F_0\} \times 100$, donde F representa el valor de fluorescencia en cada punto y F_0 representa el valor basal de fluorescencia. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm desviación estándar de, a lo menos, tres experimentos desarrollados en forma independiente. Se realizó análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA paramétrico) con un nivel de confianza aceptado inferior al 5% ($p < 0,005$).

6. RESULTADOS

6.1. Distribución subcelular del receptor de insulina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata

La presencia y distribución del receptor de insulina (RI) en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se investigó mediante experimentos de co-inmunofluorescencia en células fijadas tal como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron dos anticuerpos primarios, uno policlonal de conejo anti-RI que detecta un epítotope de 20 aminoácidos en la región carboxilo terminal de la cadena β del RI ($IR_{\beta A}$) y otro monoclonal anti-RI que detecta un epítotope de 29 aminoácidos de la cadena β ($IR_{\beta B}$). En condiciones basales, se detectó al RI en la membrana plasmática, citoplasma y región perinuclear. La figura 6A, muestra que el anticuerpo anti- $IR_{\beta B}$, a diferencia del anti- $IR_{\beta A}$, mostró un patrón punteado en la región citoplasmática. La colocalización de ambas señales fue $> 80\%$ en tres experimentos independientes, corroborando la distribución del RI antes señalada.

Con el propósito de confirmar la presencia del RI en la superficie celular se realizaron ensayos de co-inmunofluorescencia en condiciones basales entre el RI y caveolina-3 (un marcador de membrana citoplasmática en cardiomiocitos) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti- $IR_{\beta A}$, el anticuerpo monoclonal anti-caveolina-3 y anticuerpos secundarios anti-conejo FITC y anti-ratón Cy3, respectivamente. Para lograr este objetivo se modificó el protocolo convencional del ensayo, disminuyendo los tiempos de fijación-permeabilización e incubación de los anticuerpos con el fin de obtener mayor estructuración de la membrana

citoplasmática e impedir una acumulación del anticuerpo en la región perinuclear. Los datos de microscopía confocal indican que el RI colocalizó con caveolina-3 en un 32 ± 3 % referido a la señal total de caveolina-3, considerando el mismo umbral de intensidad de fluorescencia para cada canal en cortes confocales de $1,2 \mu$ de espesor (Figura 6B). Al realizar una reconstitución tridimensional de la coinmufluorescencia del RI y caveolina-3 se apreció que la marca de las proteínas presentan interacción tanto en plano perinuclear como en cortes correspondientes a membrana citoplasmática (Figura 6C). En resumen, el IR se encuentra presente en el cardiomiocito de rata neonata con una distribución en membrana citoplasmática (colocalizada con microdominios caveolares), región perinuclear y citoplasma celular.

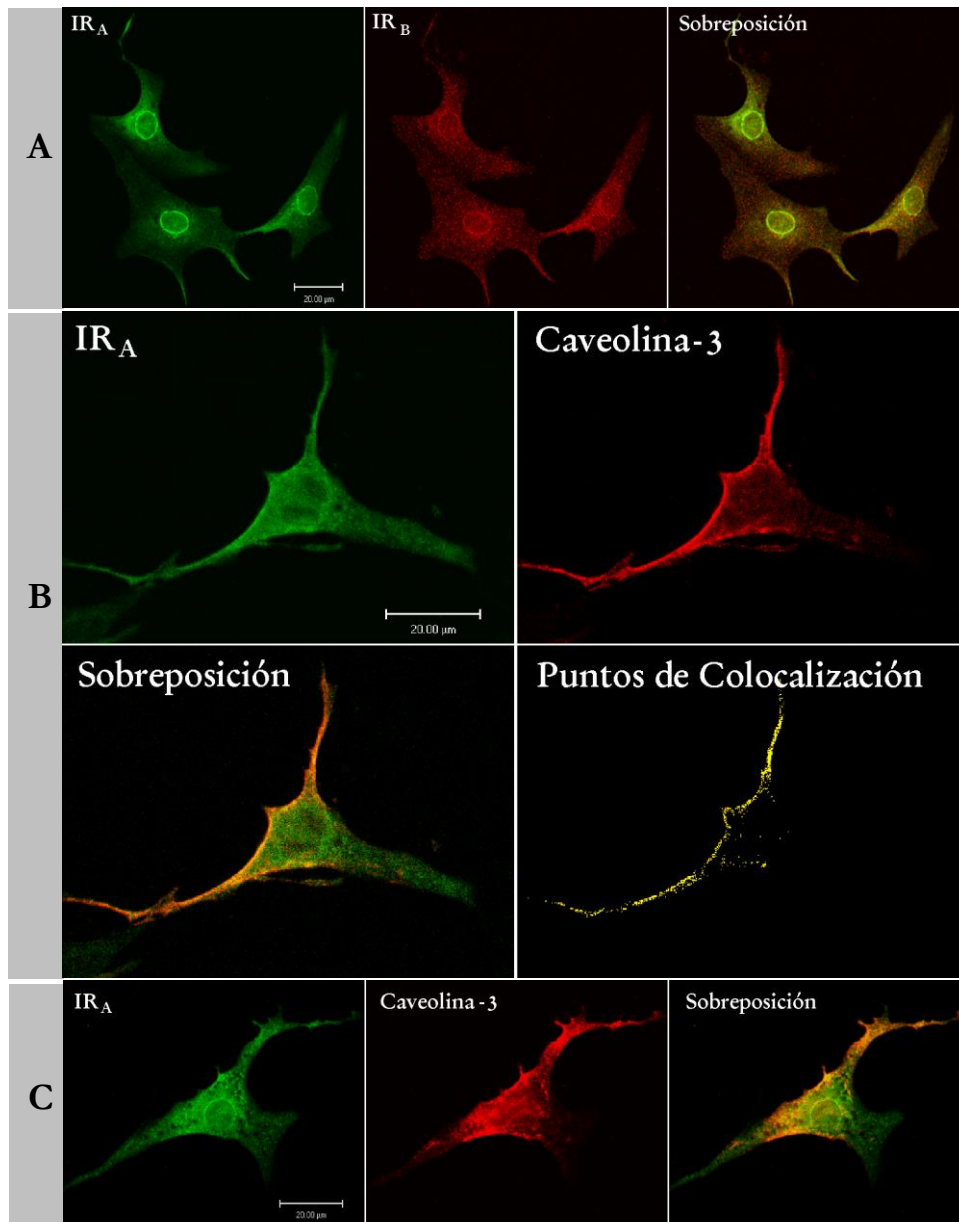


Figura 6. Detección del RI en cardiomiocitos de rata neonata

Los cardiomiocitos se fijaron según lo descrito en Materiales y Métodos. Los registros de imágenes se realizaron por microscopía confocal de barrido láser. **(A)** Coinmunofluorescencia para el RI utilizando un anticuerpo primario anti-IR β_A o anti-IR β_B y conjugados anti-conejo FITC o anti-ratón Cy3, respectivamente. La colocalización de ambos canales registra presencia perinuclear, citoplasmática y en la membrana citoplasmática en cortes confocales de 1,2 μm . **(B)** Los análisis de inmunofluorescencia para RI y caveolina-3 indicaron que hay un $33 \pm 3\%$ de colocalización de la marca total en la membrana citoplasmática referida a caveolina-3 y configurado para idénticas intensidades de fluorescencia entre ambos canales, cortes de 1,2 μm . **(C)** Reconstitución de 6 cortes confocales de 1 μm para RI (IR β_A) y caveolina-3. Los resultados muestran colocalización periférica y en la membrana citoplasmática apical. En los paneles B y C, las células se fijaron por 10 y 5 min con formaldehído y Triton X-100 al 0,1 % respectivamente y los anticuerpos primarios y conjugados se incubaron por 1,5 h a temperatura ambiente.

Considerando los resultados obtenidos en el modelo de cardiomiocitos neonato y dadas sus diferencias estructurales respecto al cardiomiocito adulto, una célula terminalmente diferenciada, se estudió la distribución del RI en cultivos primarios de cardiomiocitos adultos con el fin de comparar ambos modelos bajo los mismos criterios de inmunofluorescencia utilizados anteriormente. Para ello, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata adulta se fijaron e incubaron con los anticuerpos anti-IR β A o anti-IR β B y sus conjugados anti-conejo FITC o anti-ratón Cy3, respectivamente. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser revelaron la presencia del RI estructurado entre el sistema contráctil del citoplasma celular y membrana citoplasmática, con una pequeña componente perinuclear, de menor intensidad en comparación con los cardiomiocitos neonatos, presente en aproximadamente el 40% de los cardiomiocitos adultos aislados. Las imágenes confocales se adquirieron con criterios de configuración equivalentes para ambos canales de excitación, y corresponden a cortes ópticos de 1,3 μ m (Figura 7A). Para cuantificar la presencia del RI en la membrana citoplasmática de los cardiomiocitos de rata adulta se realizaron estudios de coinmunofluorescencia para el RI y caveolina-3. Los cardiomiocitos adultos se incubaron con anticuerpos primarios anti-IR β A o anti-caveolina-3 y posteriormente con los anticuerpos anti-conejo FITC o anti-ratón Cy3, respectivamente. A través del análisis de datos realizados con el software del microscopio confocal se cuantificó la colocalización entre RI y caveolina-3. Los resultados mostraron que hubo una colocalización de un 64 ± 7 % (Figura 7B) y permiten concluir que el RI está presente en la

membrana plasmática del cardiomiocito de rata adulta, estructurado entre el sistema contráctil del citoplasma celular y a diferencia del cardiomiocito neonato presentó una señal perinuclear de menor intensidad que se detectó en un 40% del total de células estudiadas.

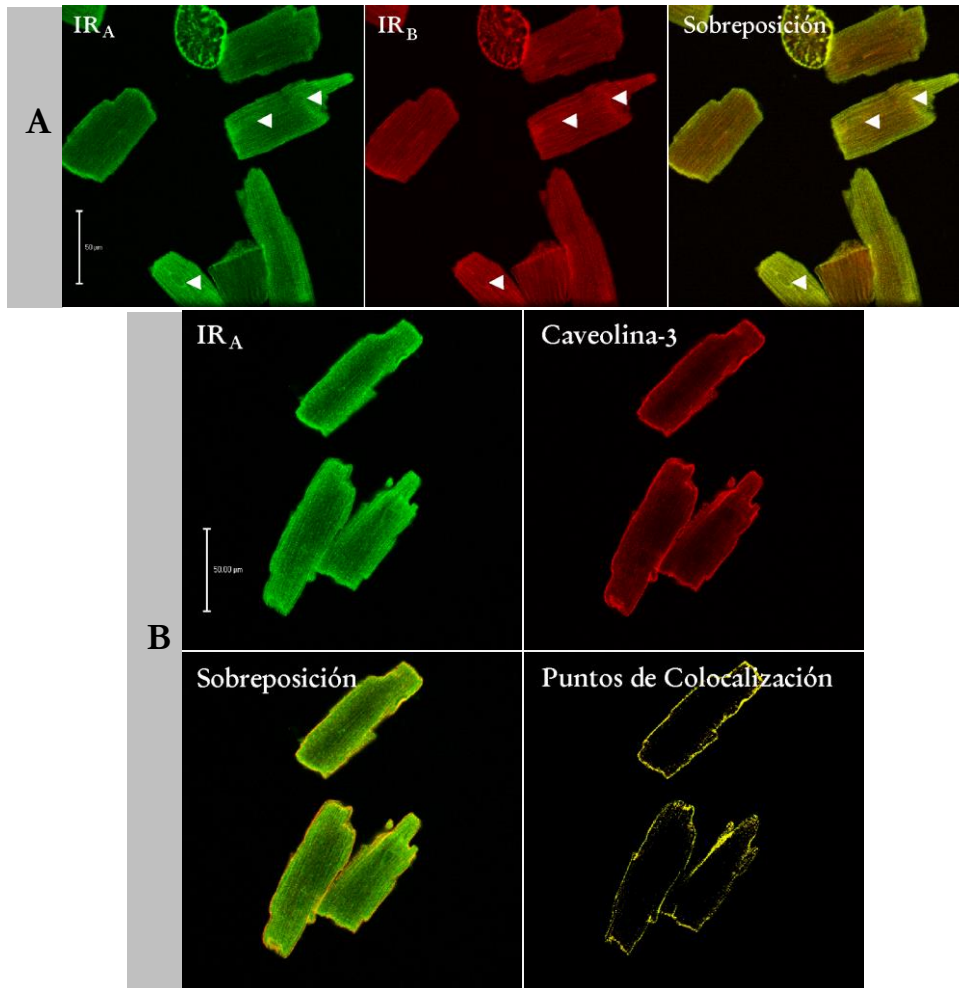


Figura 7. Detección del RI en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata adulta

Los registros de las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal de barrido láser. **(A)** Coinmunofluorescencia para el RI utilizando un anticuerpo primario anti-IR_{βA} o anti-IR_{βB} y conjugados anti-conejo FITC (verde) o anti-ratón Cy3 (rojo), respectivamente. La figura muestra localización en membrana citoplasmática y citoplasma celular. Las cabezas de flechas muestran una débil marca en la región perinuclear, 40% de las células analizadas. Cortes confocales de 1, 3 μm en el plano perinuclear. **(B)** Co-inmunofluorescencia para el RI y caveolina-3. Los resultados muestran una franca colocalización en la membrana citoplasmática en los cortes confocales de 1,3 μm en plano perinuclear, arrojando valores de 64 ± 7 % referido a la marca total de caveolina-3 y ajustando a intensidades de fluorescencia equivalentes para ambos canales de excitación.

6.2. Caracterización del receptor de insulina en cardiomiocitos de rata por ensayos de radioligando

Para determinar el número y afinidad de los RI en los cardiomiocitos de rata neonata se realizaron curvas de saturación utilizando concentraciones crecientes de [¹³¹I]-Y-ins. (0,1 – 20 nM), insulina no marcada (10 - 200 nM) y una fracción de membranas plasmáticas de cardiomiocitos (200 µg proteínas). Se obtuvieron las uniones totales, inespecíficas y específicas tal como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 8 muestra dichas uniones, observándose que la unión específica alcanza un nivel máximo cercano a 10 nM. El ajuste de la curva correspondiente a la unión de tipo específica arroja una constante de disociación equivalente a $2,4 \pm 0,7$ nM considerando un sitio de interacción. Al considerar la existencia de RI de alta y baja afinidad, realizando para ello un ajuste para dos tipos de interacción, las constantes de disociación obtenidas son de $1,1 \pm 0,1$ nM para los receptores de alta afinidad y $8,2 \pm 1,7$ nM para los de baja afinidad. Mientras que la Bmax para los receptores de alta y baja afinidad corresponde a $10,1 \pm 0,9$ y $8,4 \pm 1,3$ fmol/mg proteína respectivamente. Este último ajuste presenta un mejor coeficiente de correlación en comparación al análisis propuesto por un solo sitio de interacción ligando receptor.

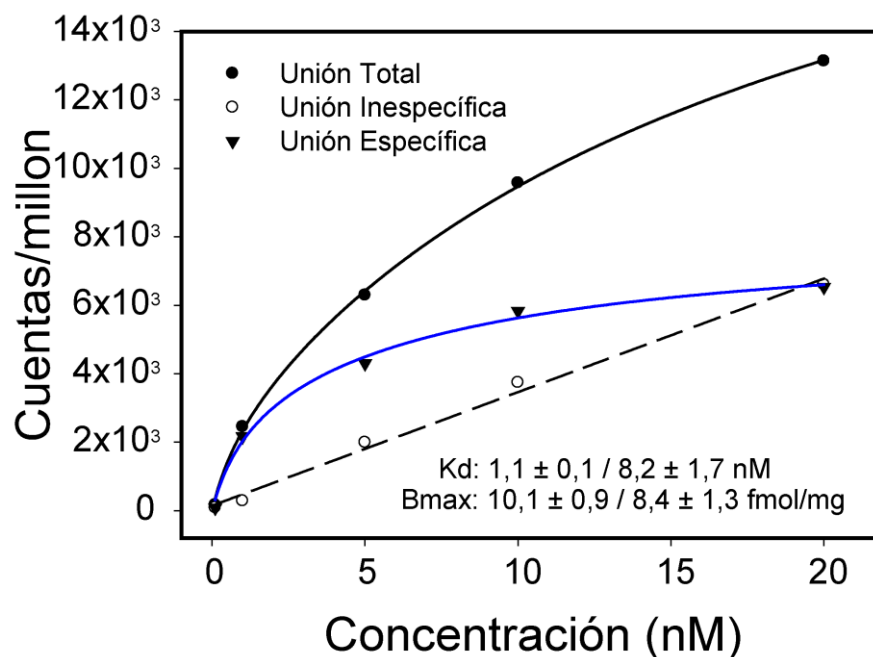


Figura 8. Caracterización de los receptores de insulina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata por ensayo de radio-ligando

Los ensayos se realizaron incubando [131 I]-insulina (0,1–20 nM) con una fracción de membranas plasmáticas de cardiomiocitos (200 μ g proteínas) en presencia o ausencia de insulina no marcada (10nM - 2 μ M) por 1,5 h. Los valores mostrados corresponden a las uniones totales (●), inespecífica (○) y específica (▼) de un experimento representativo de 3 realizados en forma independiente.

6.3. Efecto de insulina en la activación de la proteínas kinasa ERK en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata.

En células HepG2, se ha reportado que la activación del IR por insulina activa a ERK1/2 (42). A fin de determinar si los RI presentes en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatas son funcionales se investigó si insulina activa a las kinasas reguladas extra celularmente ERK1/2. Para ello cardiomiocitos se expusieron por 1, 3, 5 y 10 min a insulina (10 nM) y se prepararon extractos proteicos totales en la forma indicada en Materiales y Métodos. Luego mediante Western blots se determinaron los niveles de ERK1/2

fosforiladas y totales en estos extractos. Los resultados indican que insulina estimuló la fosforilación de ERK1/2 desde el primer minuto post estimulación equivalente a $1,9 \pm 0,8$ y $1,9 \pm 0,4$ veces sobre el control para ERK1 y ERK2, respectivamente, mientras que la activación máxima fue de $6,4 \pm 0,2$ y $6,7 \pm 0,9$ veces sobre el control, para ERK1 y ERK2 respectivamente, a los 5 min de estimulación (Figura 9A). No se encontraron diferencias significativas entre las activaciones de ERK1/2, considerando cada tiempo estudiado por separado. Por último se muestra que en estos extractos, usando un anticuerpo anti-subunidad beta del IR, se detectó una banda de 95 kDa por Western blot (Figura 9B).

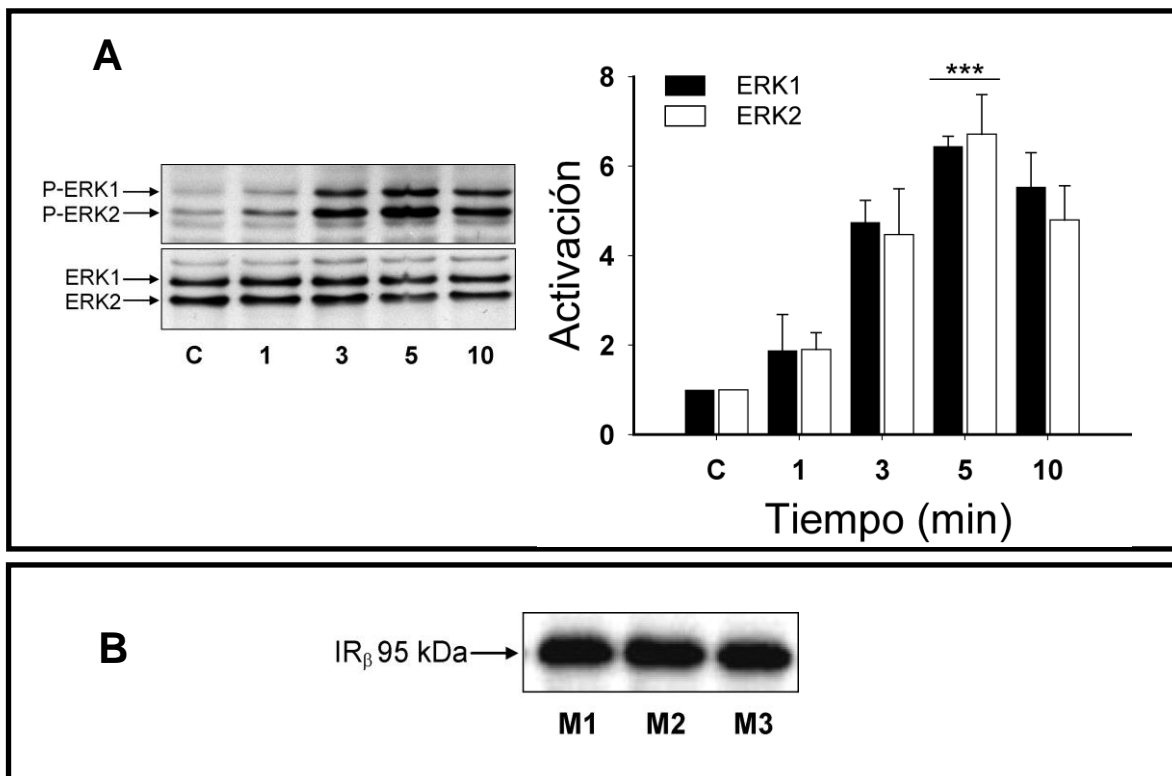


Figura 9. Efecto de insulina en la fosforilación de ERK1/2 y detección de IR en extractos de cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

(A) Fosforilación de ERK1/2 por insulina 10 nM a los tiempos indicados. El máximo efecto de $6,4 \pm 0,2$ y $6,7 \pm 0,9$ veces sobre el control, para ERK1 y ERK2, respectivamente, se logró a los 5 min de estimulación. Datos correspondientes a 3 experimentos independientes con $p < 0,05$. **(B)** Western blot para el receptor de insulina en tres muestras diferentes.

6.4. Efecto de insulina en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata

Para investigar los efectos de insulina sobre los niveles $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos neonatos, estas células se preincubaron con la sonda FLUO3-AM, se expusieron a distintas concentraciones de insulina (0,01 a 1000 nM) y se registraron los cambios temporales de fluorescencia en un microscopio confocal de barrido láser a través del software que comanda el microscopio confocal tal como se indica en Materiales y Métodos. La figura 10 muestra el comportamiento basal de los cardiomiocitos privados de suero por 24 h y el ruido de fondo que produce el láser en una región óptica de interés (ROI) ubicada en el espacio extracelular.

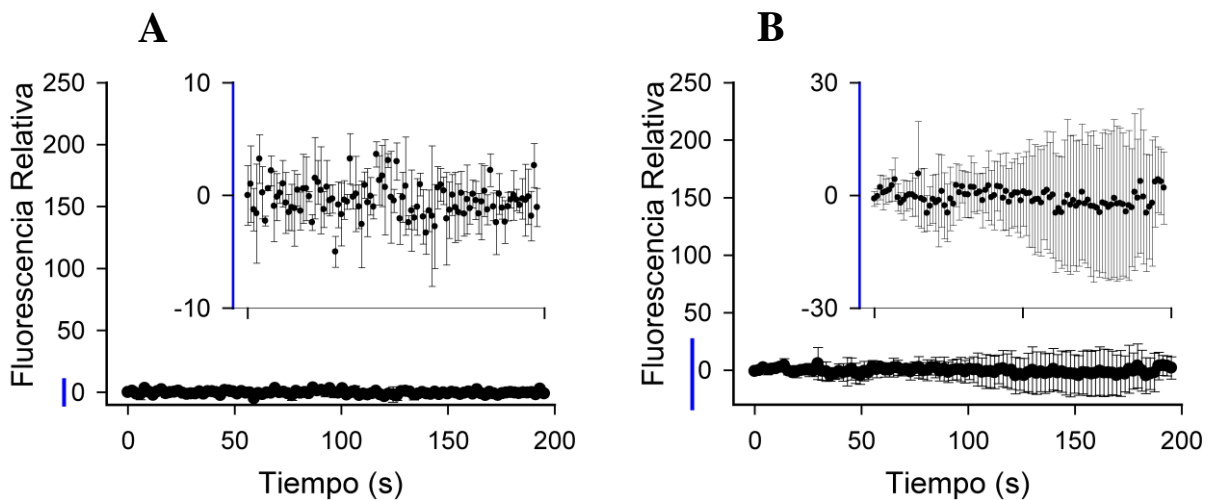


Figura 10. Controles básicos en la adquisición de imágenes seriadas

Se observa la escasa dispersión de datos como resultado del análisis ROI en el espacio extracelular para tres experimentos independientes (A). Actividad basal de cardiomiocitos neonatos aislados, privados de suero por 24 h correspondiente a un análisis ROI del citoplasma celular. La figura es representativa de 6 experimentos independientes (B). Las barras verdes en los ejes Y de los gráficos centrales corresponden a la magnitud de ampliación del eje Y en los gráficos secundarios.

La figura 11 muestra que insulina (1 μM) produjo una señal irregular y oscilatoria atribuible a la activación inespecífica de otras rutas de señalización transduccional. Al disminuir la concentración de insulina se detectó la aparición de una señal rápida y transitoria hasta con 0,1 nM de estímulo. Sin embargo, una concentración de 0,01 nM de insulina, no produjo movimientos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El análisis ROI entre núcleo y citoplasma, no acusó diferencias en el perfil cinético.

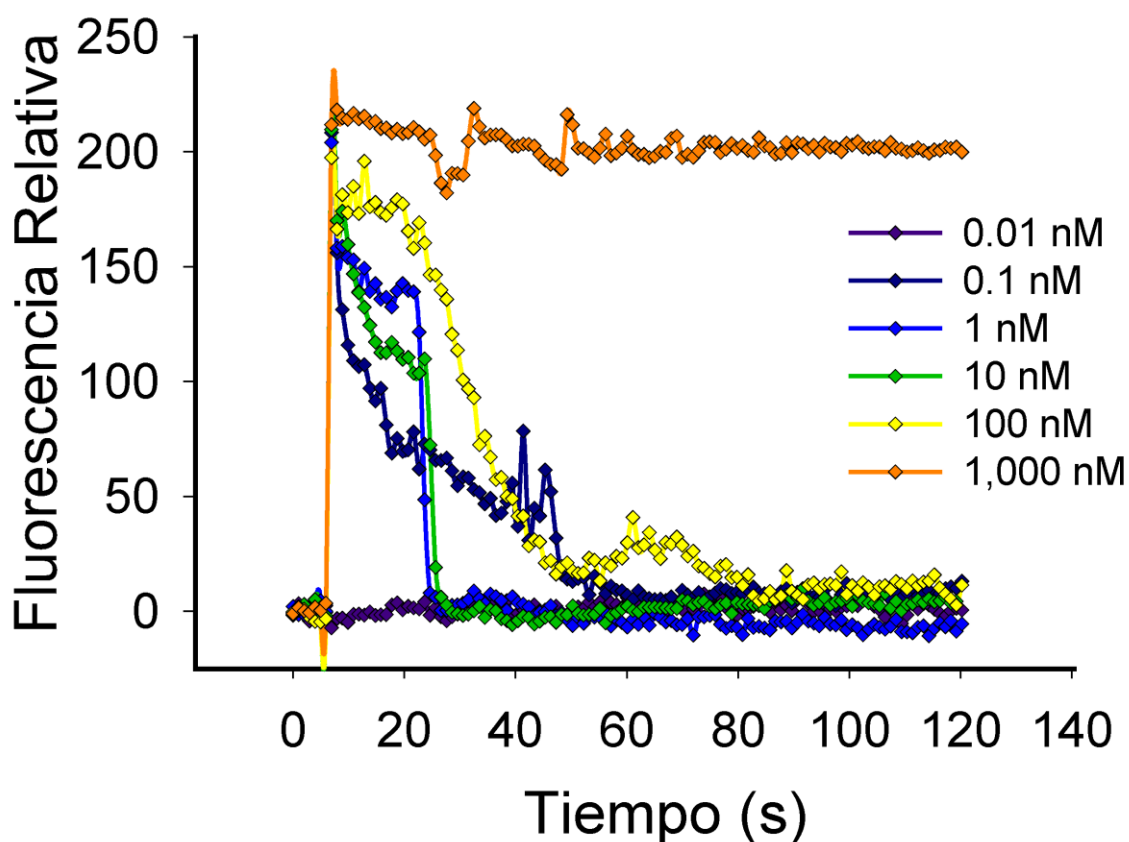


Figura 11. Efecto de la concentración de insulina en los cambios de los niveles $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el tiempo

Se muestra un perfil cinético representativo tras la estimulación con insulina según indica la leyenda. 1 μM de insulina genera una señal errática y de mayor duración, posiblemente producto de la activación inespecífica de otras vías de señalización. Insulina 100 y 10 nM, muestra una señal rápida y transitoria que regresa a nivel basal luego de entre 37 y 45 seg. Insulina 1 y 0.1 nM, induce una señal rápida y transitoria de 28 ± 4 seg. Una concentración de 0,01 nM de insulina no aumentó los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la mayoría de las células analizadas.

Para analizar el conjunto de los datos obtenidos se determinó el coeficiente de respuesta (coefR) que corresponde a las células que responden positivamente versus las células totales, siendo $>$ al 80% entre 0,1 y 1000 nM de insulina y $<$ al 0,1% para 0,01 nM como se indica en la figura 12. La figura 12B, indica una estimación de la concentración de insulina que produciría un 50% de respuesta positiva en los cardiomiocitos, la que resulto ser de 0,04 nM, según un ajuste sigmoideal estándar de la curva dosis-respuesta. Cabe destacar que este resultado es un simple estimativo, debido a que los registros responden a un fenómeno del tipo todo o nada bajo nuestros criterios experimentales. En cada etapa del estudio se analizaron entre 42 y 123 células correspondientes a un mínimo de cuatro y a un máximo de trece experimentos independientes. Estos resultados demuestran una alta sensibilidad del IR por su ligando en nuestro modelo de estudio, transformándose en una excelente aproximación experimental del comportamiento fisiológico de insulina en cardiomiocitos neonatos.

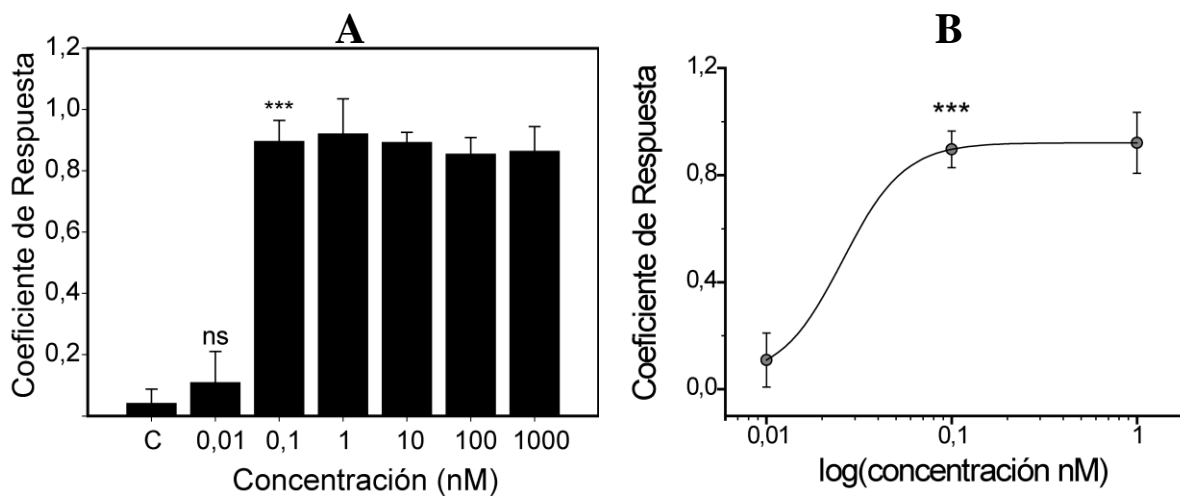


Figura 12. Estudio de la concentración de insulina sobre los niveles $[Ca^{2+}]$ en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

Las células se preincubaron por 30 min con la sonda para Ca^{2+} FLUO3-AM y luego se estimularon con insulina (0,01–1000 nM). Se apreció un claro efecto de insulina, desde 0,1 nM hasta 1 μ M (sobre un 80% de respuesta), mientras que 0,01 nM de insulina fue efectiva en menos del 20% de los casos (**A**). Se determinó una concentración estimativa de insulina que produciría el 50% de respuesta, resultando en un valor equivalente a 0,04 nM según el ajuste a una curva sigmoideal convencional (**B**). Los datos corresponden a un mínimo de cuatro experimentos independientes y al menos 42 células analizadas por cada punto, con un $p < 0,05$.

A partir de esta información, en los siguientes experimentos se utilizó una concentración de 1 nM de insulina. La figura 13 muestra la estimulación de los cardiomiocitos neonatos con insulina 1 nM, lográndose detectar una señal rápida, al primer segundo, y transitoria que se prolongó por 28 ± 6 seg con una intensidad de fluorescencia relativa respecto a los valores basales de $214 \pm 31\%$. Esta señal mostró un aumento prácticamente inmediato de la fluorescencia de la sonda, semejante a una respuesta de tipo excitación-contracción, que luego de 2 seg post estímulo continuó con un perfil de decaimiento más lento y sostenido de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, para finalmente terminar en intensidades de fluorescencia relativa cercana a los niveles basales.

Dado que se conoce que la interacción del ligando con el RI, estimula la actividad tirosina kinasa intrínseca provocando su transfosforilación y reclutamiento de varias proteínas transduccionales (43), se utilizó genisteina (100 μM), un inhibidor general de la actividad tirosina kinasa para investigar el efecto sobre el aumento de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Para ello las células se co-incubaron con FLUO3-AM y genisteina (100 μM) por 30 min y se capturaron las imágenes previa estimulación con insulina 1 nM. Los resultados indican que genisteina bloqueó por completo el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los cardiomiocitos, indicando que los movimientos del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en nuestro modelo experimental dependen de la activación del IR y de su actividad tirosina kinasa intrínseca. (Figura 13).

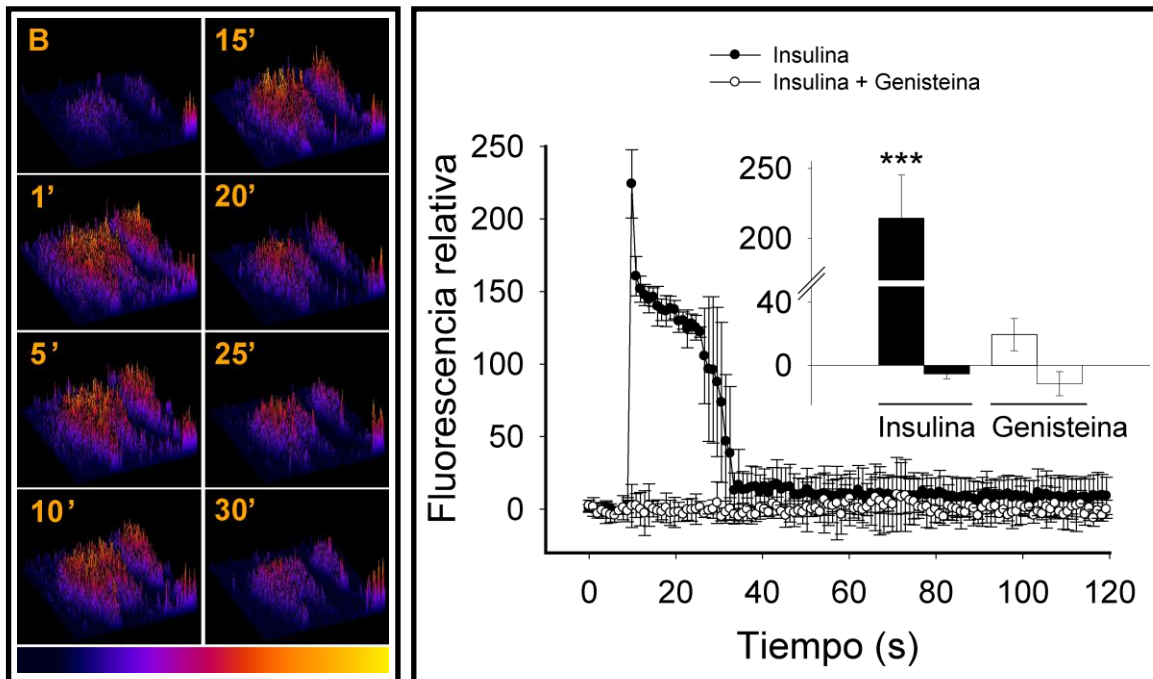


Figura 13. Caracterización de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ producida por insulina 1 nM en cardiomiocitos neonatos depende de la activación del RI

Se aprecia un cuadro resumen de la señal caracterizada de 10 experimentos independientes y su bloqueo por genisteina (100 μ M) en cardiomiocitos. El subgráfico muestra la comparación de la intensidad de fluorescencia entre cardiomiocitos estimulados con insulina 1 nM y cardiomiocitos pre tratados con genisteina 100 μ M y posteriormente estimulados con insulina 1 nM. Los datos corresponden a un mínimo de cuatro experimentos independientes con un $p < 0,05$.

En nuestros experimentos se utilizó un aumento óptico de 400x ó 630x del microscopio confocal, lo que proporcionó un campo exploratorio suficiente para capturar el comportamiento simultáneo de entre 6 y 15 células independientes por experimento. Por esta razón, y tomando en cuenta que los cultivos primarios de cardiomiocitos contienen un porcentaje de entre un 5 y 10% de fibroblastos cardiacos, se consideró importante registrar el comportamiento de este tipo celular provenientes de un cultivo primario en pasajes de amplificación 2 ó 3, como patrón comparativo que nos permita distinguir si se analizó un cardiomiocito o un fibroblasto cardiaco. La Figura 14 muestra los perfiles cinéticos de los movimientos

de $[Ca^{2+}]_i$, para fibroblastos cardiacos post estimulación con 1 nM de insulina y se encontró una diferencia sustancial respecto al perfil que produjo el mismo estímulo en cardiomiocitos neonatos. Esta señal fue de mayor amplitud, con registros superiores a los 3 min y una cinética inicial de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ más lenta que tardó 13 ± 3 seg en llegar a un máximo de $209 \pm 7\%$ respecto al nivel basal (Figura 14).

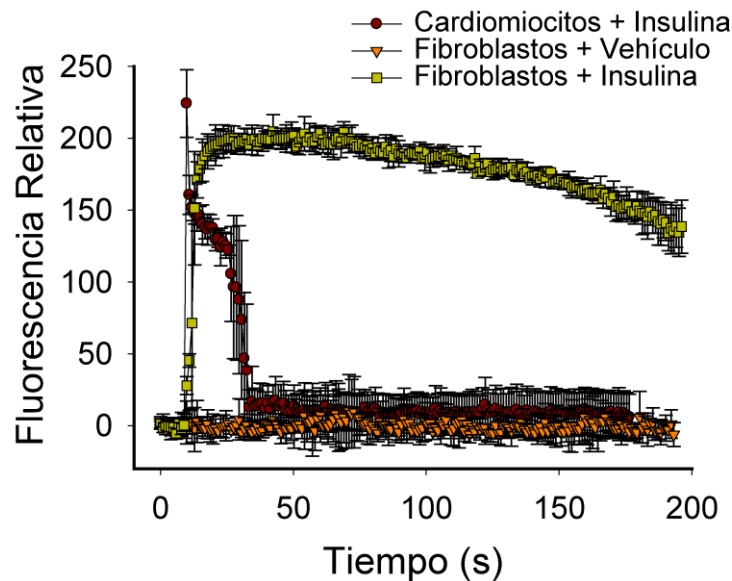


Figura 14. Efecto de insulina en los niveles intracelulares de calcio en cultivos primarios de fibroblastos cardiacos neonatos

Las células se preincubaron con la sonda para Ca^{2+} FLUO3-AM por 30 min, se lavaron con KRPHG y montaron en un microscopio confocal. Insulina produjo un rápido aumento del $[Ca^{2+}]_i$, el cual presentó una caída de la señal más lenta que en los cardiomiocitos neonatos, con un tiempo de restauración a valores basales superior a los 3 min post estímulo. La figura es representativa de tres experimentos independientes.

Un breve resumen de los efectos de insulina mostrados hasta esta etapa respecto a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida en los cardiomiocitos de rata neonata es:

- Insulina aumentó los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ de manera dependiente de su concentración, lográndose señales características que se oscilaron desde una señal compuesta, heterogénea, oscilatoria y de gran amplitud hasta una rápida y transitoria que se obtuvo al estimular las células con rangos de concentración fisiológicas de la hormona.
- Se estima que insulina 0,04 nM produciría una respuesta del 50% de los cardiomiocitos en nuestro modelo experimental, según el análisis de un amplio espacio muestral relativizado a un coefR celular.
- El movimiento de $[Ca^{2+}]_i$ estimulado por insulina dependió de la activación del IR y de la actividad tirosina kinasa intrínseca que posee.
- Si bien la insulina moviliza el $[Ca^{2+}]_i$ en los fibroblastos cardiacos neonatos, el perfil de activación fue muy distinto del observado en cardiomiocitos neonatos.

6.5. Rol del Ca^{2+}_v tipo L y del RyR en la movilización del $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos

Debido a la naturaleza de la señal registrada con insulina en cardiomiocitos y que estas células también se contraen por acción del $[Ca^{2+}]_i$, se investigó el efecto de nifedipino (1 μ M), una dihidropiridina que inhibe la activación del canal de Ca^{2+}_v tipo L, en el aumento de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ gatillados por insulina. Para ello, las células se preincubaron con FLUO3-AM por 30 min, se lavaron con medio KRPHG y se incubaron con nifedipino por 5 min antes de la estimulación con insulina (1 nM). Como muestra la figura 15A, los cardiomiocitos presentaron un

máximo de la señal de movimiento de $[Ca^{2+}]_i$ de menor intensidad ($92 \pm 13 \%$) y retrasada temporalmente (3-4 seg), en comparación con las células no tratadas con nifedipino y estimuladas con insulina 1 nM, indicando la desaparición una primera componente inmediata de tipo excitación-contracción. El vehículo salino que contiene la preparación hormonal no produjo cambios en el movimiento de calcio a las células pretratadas con nifedipino. La activación del canal de Ca^{2+}_v tipo L permite una pequeña entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, el cual puede activar al canal de Ca^{2+} RyR, ubicado estrechamente junto al canal de Ca^{2+}_v tipo L en una estructura morfológico-funcional denominada “diada”, desencadenando una rápida y masiva salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático hacia el citoplasma celular en un proceso conocido como “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (CICR). Los cardiomiocitos se incubaron con el alcaloide vegetal rianodina ($50 \mu\text{M}$ por 30 min) junto al FLUO3-AM. Rianodina en altas concentraciones bloquea la apertura del RyR, impidiendo la liberación del Ca^{2+} dependiente de esta vía. La figura 15B muestra que, a similitud de nifedipino, la señal máxima del $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina en cardiomiocitos pre tratados con rianodina fue de menor intensidad ($184 \pm 36\%$) y retrasada temporalmente (6 ± 1 seg) comparada con la generada por insulina en las células no tratadas (Figura 15B). Ya que rianodina se puede comportar como agonista o antagonista del canal de Ca^{2+} RyR, dependiendo de su concentración, se investigaron sus efectos sobre los cardiomiocitos al doble de concentración del alcaloide vegetal. Al estimular las células con insulina 1 nM, previa co-incubación por 30 min con FLUO3-AM y rianodina ($100 \mu\text{M}$) se detectó también una máxima señal de menor intensidad

($113 \pm 28\%$) y menos rápida (5 ± 1 seg) en comparación a las células controles (Figura 15C). Estos resultados aseguraron que las concentraciones utilizadas de rianodina fueron efectivamente inhibitorias del canal de Ca^{2+} RyR. Por último se apreció que tanto las células pretratadas con nifedipino y rianodina prácticamente no presentaron las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ encontradas en los registros de condiciones basales, debido al bloqueo farmacológico de su mecanismo de origen. Estos datos sugieren fuertemente que la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por insulina (1 nM) depende de, al menos, dos componentes. El primero de ellos es la entrada rápida de Ca^{2+} y liberación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde reservorios intracelulares, por un mecanismo conocido como CICR que involucra la activación del IR y su auto fosforilación en residuos de tirosina, la apertura del canal de Ca^{2+}_v tipoL y la consecuente entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular que finalmente estimula la apertura del canal de Ca^{2+} RyR y salida masiva del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico.

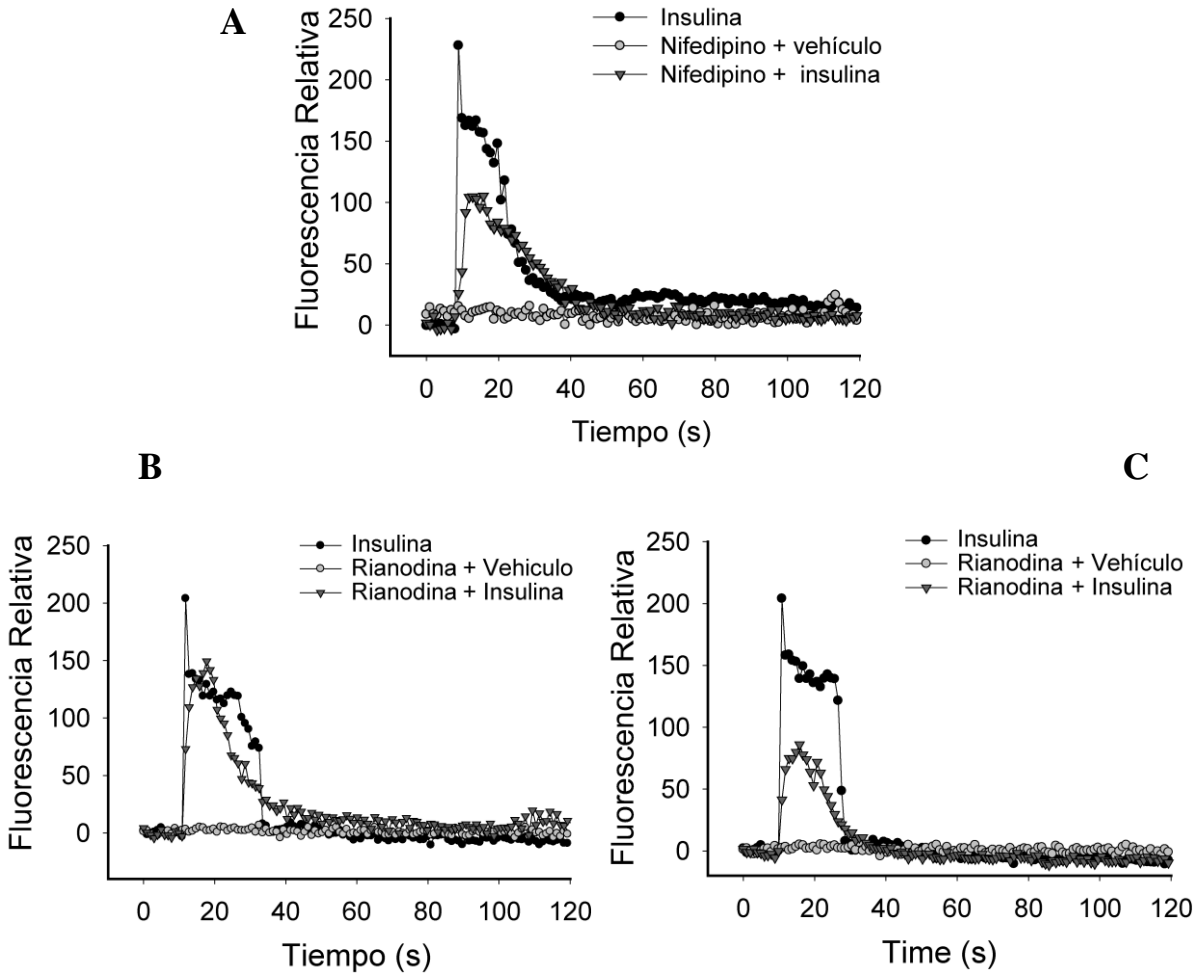


Figura 15. Participación del Ca^{2+} v tipo L y del RyR en el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata

(A) Los cardiomiocitos se preincubaron con la sonda para Ca^{2+} FLUO3-AM por 30 min y luego con nifedipino ($1 \mu\text{M}$) por 5 min previos a la estimulación con insulina (1 nM). Tras la estimulación con la hormona, se detectó un aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que resultó tener un máximo de menor intensidad y rapidez en relación a las células controles. (B) y (C): estos experimentos se realizaron en forma similar al mostrado en A, excepto que las células se incubaron por 30 min con rianodina ($50 \mu\text{M}$, B) o ($100 \mu\text{M}$, C). Para ambas concentraciones, la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presentó un máximo de menor intensidad y rapidez en relación a las células no tratadas. Rianodina ($100 \mu\text{M}$) gatilló un aumento menor de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que las células expuestas a rianodina ($50 \mu\text{M}$). Las figuras son representativas de al menos tres experimentos independientes y 36 células analizadas.

6.6. Participación de reservorios intracelulares de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico en la movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por insulina

Se evaluó el efecto de insulina en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependientes de los reservorios intracelulares con el objetivo de descifrar la segunda componente de liberación de Ca^{2+} , utilizando herramientas farmacológicas previamente estandarizadas en nuestro laboratorio. Para ello, las células se preincubaron con FLUO3-AM por 30 min en conjunto con BAPTA-AM (100 μM), un quelante del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Luego las células se lavaron con medio KRPHG, se montaron en el microscopio confocal y se estimularon con insulina (1 nM). Los resultados muestran que BAPTA-AM bloqueó la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por insulina en el 100% de los ensayos realizados y la posterior despolarización de estas células con KCl (1 mM) produjo aumentos del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 16A). La aplicación del vehículo salino no produjo respuestas en las células pretratadas con BAPTA-AM. La Figura 16B muestra que la depleción de los reservorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con tapsigargina (1 μM), un inhibidor específico de la bomba Ca^{2+} -ATP_{asa} del retículo sarcoplásmico (SERCA) originó oscilaciones del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las que fueron bloqueadas con Lantano (1 μM). También luego de la depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , las células se estimularon con cafeína (5 mM), un facilitador del estado activado del RyR, y posteriormente con insulina (1 nM). Ninguno de estos dos estímulos aumentaron los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como se puede apreciar en la figura 16B, deduciéndose que los movimientos del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por insulina en cardiomiocitos neonatos depende de la liberación del Ca^{2+} desde el

retículo sarcoplasmático, ya sea mediante la liberación del pool de Ca^{2+} dependiente del canal de Ca^{2+} RyR, o dependiente de los receptores de IP_3 .

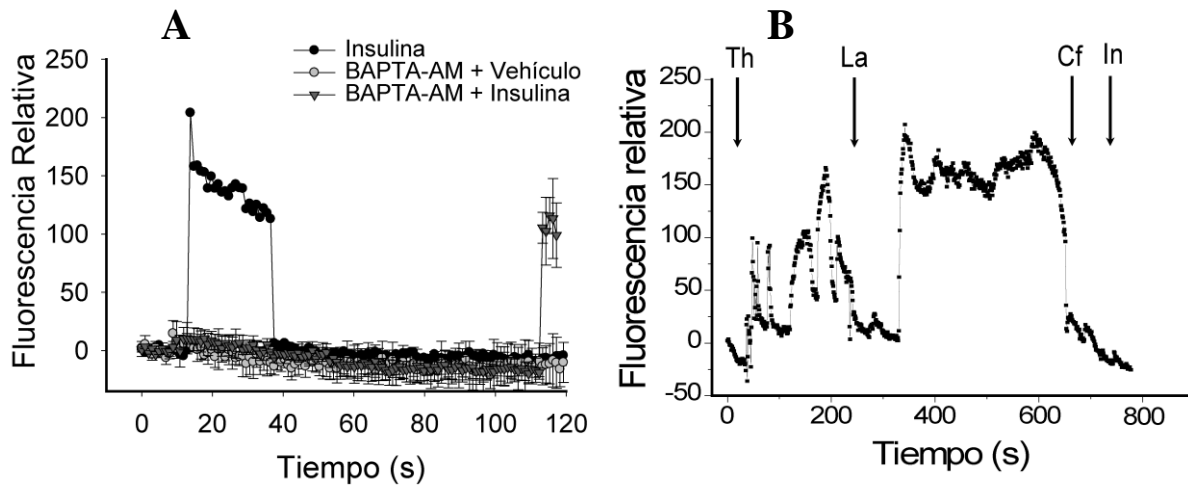


Figura 16. Efecto de insulina sobre los reservorios intracelulares de Ca^{2+}

(A) BAPTA-AM ($100 \mu\text{M}$), bloqueó completamente la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por insulina en la totalidad de los ensayos realizados. (B): depleción de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares producido por tapsigargina (Th, $1 \mu\text{M}$), se adicionó lantano (La, $1 \mu\text{M}$) para detener la entrada del Ca^{2+} extracelular. Cafeína (Cf, 5mM) e insulina (In, 1nM) no produjeron aumentos del $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

6.7. Participación de la vía transduccional dependiente de PI3K y de PLC

Se evaluó la participación de fosfoinositido 3-kinasa (PI3K) y de fosfolipasa C (PLC), utilizando los inhibidores LY294002 ($50 \mu\text{M}$) y U-73122 ($10 \mu\text{M}$), respectivamente. Como muestra la Figura 17A, el pretratamiento con LY202004 por 30 min provocó una respuesta seriada de pulsos rápidos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ análogos a una respuesta de tipo excitación–contracción. Se detectaron entre 2-12 pulsos/segundo dependiendo la célula analizada, los que presentaron un máximo de $203 \pm 54\%$ de intensidad de fluorescencia relativa respecto al basal. Al estimular con insulina las células pretratadas con U-73122 por 30 min, también se

detectaron señales de 1-2 pulsos rápidos de tipo excitación-contracción, que presentaron un máximo de 235 ± 55 % de intensidad de fluorescencia relativa respecto al basal (Figura 17B). Estos resultados sugieren que la inhibición de PI3K y PLC produjo la desaparición del componente más tardío y que probablemente se deba a la formación de IP_3 por PLC, previa activación de PI3K.

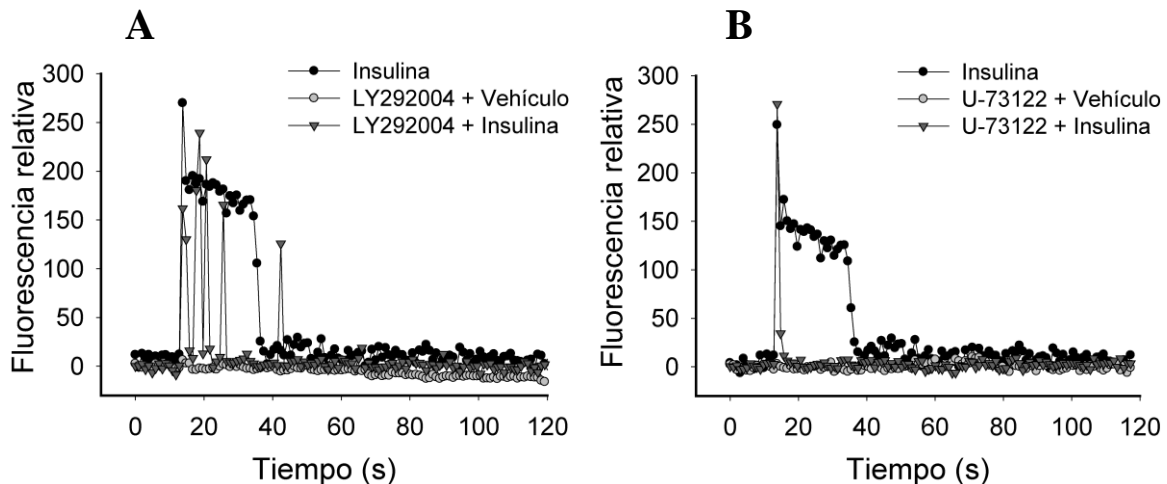


Figura 17. Efecto de la inhibición de PI3K y PLC en la señal del $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina

La figura muestra en (A), células tratadas con LY292004 ($50 \mu M$) por 30 min, las que presentaron oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ rápidas (1 seg) de tipo excitación-contracción, posteriores a la estimulación con insulina. En (B) se muestran células pretratadas con U-73122 ($10 \mu M$) por 30 min, las que presentaron un rápido aumento del $[Ca^{2+}]_i$ de 1 seg de duración tras ser estimulados con insulina. Los gráficos son representativos de, al menos, 4 experimentos independientes.

6.8. Identificación de la liberación del pool de Ca^{2+} dependiente del receptor de IP_3

Para continuar investigando si IP_3 participa en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina, se utilizaron 2-APB ($10 \mu M$) y xestospongina C ($50 \mu M$), ambos inhibidores farmacológicos del receptor de IP_3 . Los cardiomiocitos pretratados con 2-APB por 30 min produjeron múltiples aumentos rápidos de

[Ca²⁺]_i, consistentes con un proceso tipo excitación-contracción. Se registraron entre 6 y 12 incrementos rápidos de [Ca²⁺]_i de 1 segundo de duración según la célula analizada, alcanzando un máximo de 200 ± 47% de intensidad de fluorescencia relativa con respecto a los niveles basales (Figura 18A). Los cardiomiocitos pretratados con xestospongina por 30 min, produjeron el mismo efecto que las células pretratadas con 2-APB. En este caso, las células experimentaron entre 2 y 7 oscilaciones de [Ca²⁺]_i de 1 segundo de duración, alcanzando un máximo de 183±25% de intensidad de fluorescencia relativa con respecto a los niveles basales (Figura 18B).

Estos resultados sugieren colectivamente que la vía IR-PI3K-PLC-IP₃ daría cuenta de la segunda componente de liberación de [Ca²⁺]_i, retrasada de la primera.

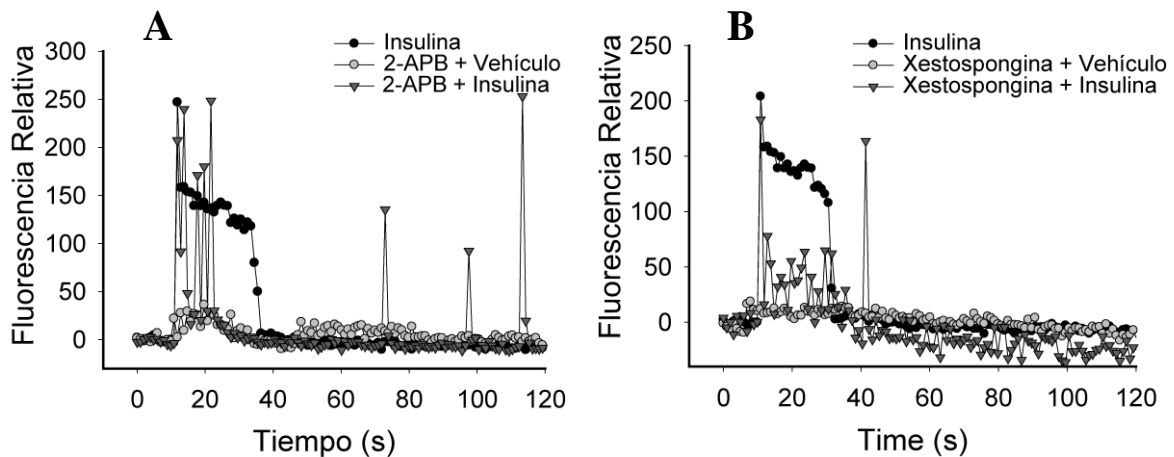


Figura 18. Efecto de la inhibición del 2-APB y xestospongina en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos

La figura muestra en **(A)**, células tratadas con 2-APB (10 μ M) por 30 min, las que presentaron oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ rápidas (1 seg) de tipo excitación-contracción, posteriores a la estimulación con insulina. En **(B)** se muestran células pretratadas con xestospongina (50 μ M) por 30 min, las que presentaron aumentos rápidos del $[Ca^{2+}]_i$ de 1 segundo de duración tras ser estimulados con insulina. Los gráficos son representativos de, al menos, 3 experimentos independientes.

6.9. Activación de subunidad $\beta\gamma$ de proteína G heterotrimérica inducida por insulina

En nuestro laboratorio hemos demostrado la participación de una proteína G heterotrimérica de tipo inhibitoria en los aumentos de calcio inducidos al estimular el receptor de IGF-1 con su ligando en los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos (44). Esta evidencia nos motivo a determinar la participación de una proteína G heterotrimérica en la vía de señalización dependiente de insulina. Para ello los cultivos de cardiomiocitos neonatos se transducieron con el adenovirus Ad β ark-ct que expresa un segmento carboxilo terminal de la β arrestina kinasa que posee gran afinidad por las subunidades $\beta\gamma$

de las proteínas G heterotriméricas. Las células se infectaron en medio de mantención por 36 h con el virus, a una multiplicidad de infección igual a 300 (MOI 300). Posteriormente los cardiomiocitos se lavaron con KRPHG, se incubaron con FLUO3-AM por 30 min, se montaron en el microscopio confocal para la adquisición de imágenes y se estimularon con insulina. Los cardiomiocitos presentaron una señal rápida de tipo excitación–contracción de entre 1 o 2 seg de duración que alcanzaron un máximo de $291 \pm 40\%$ de intensidad de fluorescencia relativa con respecto a los valores basales. La transducción de las células con un adenovirus vacío no produjo alteraciones en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ producida por insulina y la estimulación con vehículo salino en cardiomiocitos infectados con Ad β ark-ct, no provocó movimientos de $[Ca^{2+}]_i$. Al transducir los cardiomiocitos con el adenovirus AdGFP en las mismas condiciones se logró una infección efectiva superior al 95% a las 36 h (Figura 19A). La figura 19B, muestra cardiomiocitos pretratados por 12 horas con Toxina Pertussis (1 μ g/mL), que inhibe la actividad GTPasica de la subunidad alfa de proteína Gi por ADP ribosilación, la que produjo una disminución en la intensidad de fluorescencia del decaimiento de la señal post estímulo con insulina en comparación con las células no tratadas, aunque mantuvo el perfil cinético.

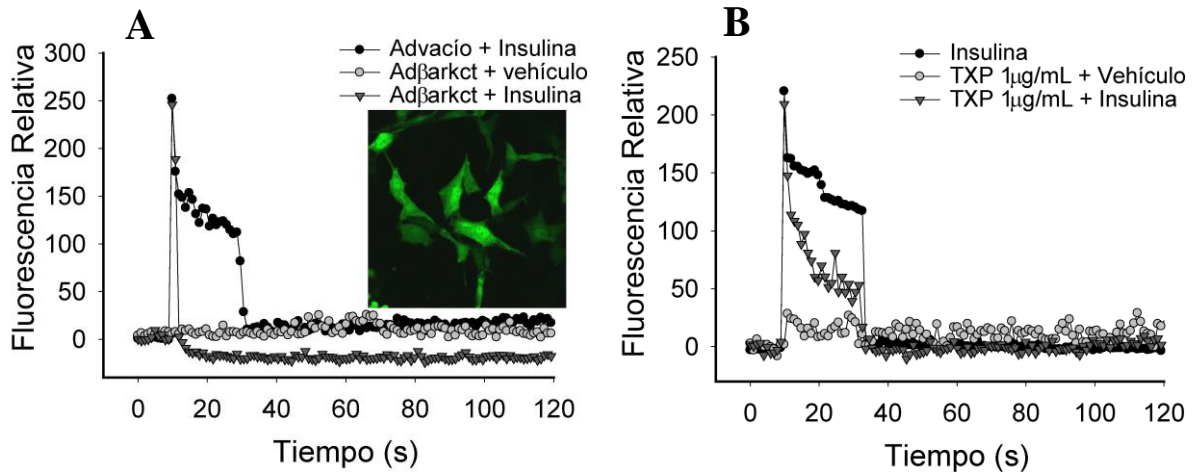


Figura 19. Participación de las subunidades $\beta\gamma$ de una proteína G heterotrimérica en la generación de la señal $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina

Los cardiomiocitos se transdujeron con los adenovirus Adβark-ct, Advacio, AdGFP o preincubados con toxina pertusis (TXP). En **(A)** se muestra el efecto del secuestro de las subunidades $\beta\gamma$ de una proteína G heterotrimérica por Adβark-ct. **(B)** muestra el efecto de insulina sobre células pretratadas con TXP (1μg/mL) en cardiomiocitos. Las figuras son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Las células pretratadas con TXP y estimuladas con el vehículo salino no presentaron señales positivas. Estos resultados sugieren que la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ dependiente del IP_3R , necesitaría de la co-activación de una proteína G heterotrimérica insensible o parcialmente sensible a toxina pertusis, la cual pone a disposición del sistema de señalización, las subunidades $\beta\gamma$ de dicha proteína G. Así, podemos incluir en este mecanismo de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ una activación consecutiva de diversas rutas transduccionales, que debería responder a la siguiente secuencia espacio-temporal: IR- $G_{\beta\gamma}$ -PI3K-PLC- IP_3 - Ca^{2+} .

7. DISCUSIÓN

Luego de estimular los cardiomiocitos con insulina, se detectó un rápido aumento del Ca^{2+} que alcanzó su máximo en el primer segundo post estímulo. El pretratamiento de los cardiomiocitos con nifedipino o rianodina sólo modificaron esta primera señal, observándose un aumento de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de menor intensidad y más lento. El pre tratamiento de los cardiomiocitos con inhibidores que impiden la señalización vía IP_3 (U-73122; LY-292004; Xestospongina y 2-APB), modificaron la señal que produce insulina, registrándose aumentos rápidos de Ca^{2+} de 1 segundo de duración. En los cardiomiocitos pretratados con taspigargina, no se observaron los aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gatillados por insulina sugiriendo que este efecto dependió de la salida del Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico ya sea a través del RyR o del IP_3R . La transducción de los cardiomiocitos con adenovirus Ad β ark-ct, produjo un aumento rápido de Ca^{2+} de 1 segundo, semejante a la respuesta detectada con los inhibidores de la vía de transducción dependientes de IP_3 . Finalmente, la participación de una subunidad α de proteína G heterotrimérica tipo inhibitoria en este proceso se demostró utilizando toxina pertussis, registrándose un efecto parcial pues sólo se modificó el perfil cinético de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por insulina. De esta manera, se puede postular que insulina produce un aumento rápido y transitorio del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular a través de un mecanismo compuesto, el cual involucra primero al Ca^{2+} externo y luego al Ca^{2+} interno.

Insulina es una hormona con rol protagónico en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, ayudando de esa manera a mantener la homeostasis energética en una gran variedad de organismos (45). Ratones knockout para el RI en cardiomiocitos, presentan una notable disminución del tamaño del corazón con persistencia de patrones de expresión génica fetal y alteraciones metabólicas tales como incremento de la glicólisis y disminución en la oxidación de ácidos grasos, condición característica de corazones inmaduros (46). Estos antecedentes permiten dimensionar la importancia que posee insulina y su receptor en el proceso de maduración de cardiomiocitos desde el estado neonato al adulto. Aunque existe variada información a cerca del papel fisiológico de insulina en distintos modelos experimentales, se desconocía si insulina aumentaba los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos. Investigaciones previas de nuestro laboratorio mostraron que IGF-I, también aumenta los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos de rata neonata (47), y músculo esquelético (48). En este último modelo, también ha sido caracterizada una señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina a través de un mecanismo que involucra a RI-Gi-DHPR-RyR (49). En esta memoria se ha demostrado que insulina es capaz de inducir un rápido y transitorio aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en cardiomiocitos de rata neonata, por un mecanismo que involucra tanto al Ca^{2+} externo como al Ca^{2+} interno. A pesar de que existen trabajos que revelan una relación entre insulina y la activación de canales catiónicos permeables a Ca^{2+} en células de ovario de hámster que expresan el RI humano (50), nuestros resultados muestran por primera vez una sólida vinculación entre insulina y $[Ca^{2+}]_i$ en el cardiomiocitos.

Nuestros resultados mostraron que el RI se detectó en membrana citoplasmática, citoplasma y región perinuclear. En adipocitos de rata y células Cos-7, el RI co-inmunoprecipita con caveolina-1 en fracciones de membrana (51), pero no existen evidencias que vinculen al RI y la región peri nuclear. La presencia del RI en esta última región plantea una serie de interrogantes a cerca de su posible funcionalidad y/o integración a un segundo pool de señalización mediado por el RI. En los últimos años se han comenzado a describir la existencia de diversas proteínas y mecanismos transduccionales rápidos originados en el núcleo celular en respuesta a primeros mensajeros que activan sus vías de señalización en la superficie de la célula. Así, isoformas de enzimas tales como PI3K, PLC y PKC, se han detectado en membranas nucleares, activando desde ahí sistemas de transducción localizados en este compartimiento celular (52). En este sentido, sería un gran desafío determinar el rol de RI en la región perinuclear, y si esta fuerte marca corresponde al receptor dentro de la célula o a invaginaciones de la membrana plasmática alrededor del núcleo celular. Al explorar la distribución del RI en el modelo adulto, este se detecto en la membrana citoplasmática y en el citoplasma celular, pero escasamente en la región perinuclear. Estos resultados sugieren que durante la diferenciación del cardiomiocito desde el estado neonato al adulto, el RI se redistribuye a la membrana citoplasmática. Hay antecedentes que demuestran la presencia del RI en microdominios caveolares en una amplia variedad de modelos celulares, incluyendo los cardiomiocitos (53). Se ha descrito que caveolina-1 interactúa físicamente con el RI a través de su dominio de andamiaje, aumentando la actividad del RI en células cos-7 mientras que en células adiposas produce una disminución de su actividad (54). Los estudios de

colocalización del RI en membrana citoplasmática con caveolina-3 mostró que hay una menor interacción IR/caveolina-3 en el cardiomiocito neonato que en el adulto (Figura 6, 7). Aunque se desconoce que significa esta asociación, hay evidencias que la estructura caveolar interviene en la propagación de una amplia variedad de señalizaciones intracelulares, incluida la del RI (55). Estos datos en conjunto, permiten plantear que el RI reside en la superficie celular colocalizando con caveolina-3 en condiciones basales y que esta residencia superficial es diferencial en cardiomiocitos neonatos y adultos.

Los ensayos de radioligando para caracterizar la interacción ligando receptor en nuestro modelo experimental, revelaron una constante de disociación (K_d) equivalente a $2,4 \pm 0,7$ nM, mientras que la densidad de receptores fue de $17,2 \pm 4,1$ fmol/mg de proteínas totales. Valores similares han sido descritos en diferentes tejidos de rata (56), presentando mayor afinidad al ligando los receptores de insulina de hígado y tejido adiposo. También existen estudios en líneas de adipositos 3T3 que revelan la existencia de receptores de alta y baja afinidad para insulina, los cuales al ser activados diferencialmente por distintas concentraciones de la hormona, generan respuestas independientes (57). El ajuste de los datos obtenidos en el ensayo de desplazamiento de radio ligando a un modelo de dos sitios de saturación, mostró la existencia de sitios de alta y baja afinidad para insulina en cardiomiocitos. La activación de ERK1/2 por insulina mostró que estos receptores son funcionales en concordancia con lo descrito en la literatura (58) (59).

El efecto de insulina sobre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, se exploró utilizando estudios cinéticos-imagenológicos a través de microscopia confocal de barrido

láser por cada 0,985 segundos. Insulina (1.000 a 0,1 nM) aumentó los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, con distintos perfiles cinéticos en cardiomiocitos neonatos (Figura 12). Se ha descrito en condrocitos que insulina produce aumentos transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ a través de la activación de PLC, como de la entrada de Ca^{2+} por canales voltaje dependiente (60). Insulina (1 μ M) produjo un rápido, sostenido e irregular aumento del $[Ca^{2+}]_i$, no así 100, 10, 1 y 0,1 nM. Para estas últimas concentraciones del estímulo, la señal fue rápida (con un máximo al primer segundo) y transitoria, tal como se muestra en la Figura 12. Esta respuesta dependiente de la dosis puede ser atribuida a una estimulación inespecífica de otros receptores presentes en la superficie celular, principalmente IGF-IR, los que también se activan por altas concentraciones de insulina (61). La respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ producida por concentraciones secuencialmente mas bajas de insulina, produjeron una clara estabilización de la señal, llegando a obtener respuestas reproducibles a concentraciones fisiológica de la hormona. La concentración de insulina 1 nM se escogió para todas las determinaciones de $[Ca^{2+}]_i$. Los cardiomiocitos estimulados con vehículo salino no presentaron aumentos del $[Ca^{2+}]_i$. Dado que nuestros cultivos primarios de cardiomiocitos pueden tener hasta un 5% de fibroblastos, se investigó si estas células responden a insulina, modificando sus niveles de $[Ca^{2+}]_i$. Los resultados revelaron que insulina 1 nM aumentaron los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos cardiacos neonatos. La señal registrada fue de gran amplitud y muy diferente a la cinética registrada en cardiomiocitos (Figura 14).

Los análisis ROI en citoplasma y núcleo celular no revelaron diferencias cinéticas para ninguna de las condiciones experimentales (datos no mostrados).

Estos resultados son diferentes a los obtenidos por nuestro laboratorio para IGF-1 (62). Este factor induce una respuesta rápida y transitoria de $[Ca^{2+}]_i$ que comienza en el núcleo y se propaga al citoplasma en cardiomiocitos neonatos mantenidos en medio que contiene una concentración fisiológica de Ca^{2+} en el medio extracelular. Estos resultados muestran que a pesar de la similitud estructural y/o funcional de las dos hormonas peptídicas, cada una es capaz de señalar hacia el intracelular de forma independiente en relación a la respuesta del $[Ca^{2+}]_i$.

Para investigar el mecanismo por el cual insulina aumenta los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, los cardiomiocitos fueron tratados con genisteína para inhibir la actividad quinasa del RI. Los resultados mostraron que genisteína bloqueó completamente los aumentos del $[Ca^{2+}]_i$ en la totalidad de los casos, sugiriendo que estos dependen de la activación del RI y de su actividad tirosina quinasa intrínseca (Figura 13).

Existen reportes que vinculan a la activación del RI en hepatocitos con cambios en la conductancia eléctrica de la membrana celular al ser estimulada con insulina (63). Maier et al., demostraron que insulina estimula corrientes de Ca^{2+} en cardiomiocitos adultos de manera dosis dependiente y que involucra la actividad tirosina quinasa del receptor (64). Tomando en consideración este tipo de reportes y la rapidez del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina, decidimos explorar la participación del mecanismo convencional de generación de la señal contráctil mediada por estímulos despolarizantes en cardiomiocitos neonatos. La contracción del cardiomiocito es un proceso que depende de Ca^{2+} , donde los Ca^{2+}_v tipo L y los RyR permiten el acoplamiento químico entre la despolarización de la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (65). En este proceso el Ca^{2+} que entra desde el espacio

extracelular actúa como mensajero permitiendo su propia liberación desde los reservorios intracelulares a través del RyR, para dar origen a la contracción muscular (66). Nifedipino y el alcaloide vegetal rianodina, fueron capaces de modificar drásticamente el perfil cinético del $[Ca^{2+}]_i$ inducido por insulina en cardiomiocitos neonatos. Nifedipino eliminó la respuesta rápida del $[Ca^{2+}]_i$ producida por insulina. Estos datos indican que el inicio rápido de la señal producida por insulina depende de la activación del Ca^{2+}_v tipoL. Por otro lado, rianodina 50 μM al igual que nifedipino produjo el bloqueo de la respuesta rápida del $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación con insulina, retrasando la señal en 6 ± 1 seg para alcanzar un máximo de 184 ± 36 % de intensidad de fluorescencia relativa con respecto al basal. Al aumentar la concentración de rianodina a 100 μM el retraso de la señal fue de 5 ± 1 segundos para alcanzar un máximo de 113 ± 28 % de intensidad de fluorescencia relativa con respecto a los valores basales (Figura 15). Estos datos indican que la componente rápida de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ estaría vinculada a un mecanismo que involucra la activación del Ca^{2+}_v tipoL y al canal de Ca^{2+} receptor de rianodina semejante al fenómeno descrito como CICR (67) y se resume por la siguiente ruta de señalización RI- Ca^{2+}_v tipoL-RyR- Ca^{2+} .

Para determinar el rol del Ca^{2+} almacenado en los reservorios intracelulares, se realizaron experimentos con BAPTA-AM y tapsigargina. El quelante del Ca^{2+} citoplasmático BAPTA-AM, inhibió por completo el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ producido por insulina, sugiriendo una íntima relación con los reservorios intracelulares y que la entrada de Ca^{2+} desde el extracelular a través del Ca^{2+}_v tipoL es insuficiente para saturar a BAPTA. En estas condiciones solo un estímulo

despolarizante fuerte (inducido por KCl), que produce una abrupta entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, fue capaz de saturar al BAPTA intracelular dando como resultado una detección del Ca^{2+} excedente por la sonda FLUO-3 (Figura 16A). La depleción de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} inducido por tapsigargina, produjo oscilaciones del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidas por la activación de mecanismos compensatorios que activan a canales de Ca^{2+} de la superficie celular con el fin de reestablecer la capacidad máxima de almacenamiento de Ca^{2+} reticular. Este efecto fue bloqueado por el catión La^{3+} , un inhibidor inespecífico de la entrada de Ca^{2+} desde el extracelular, el que permitió una cinética de depleción independiente del Ca^{2+} externo. Una vez alcanzada la depleción completa de los reservorios de Ca^{2+} reticular, se agregó un pulso de cafeína y segundos mas tarde un pulso de insulina 1. Ambos estímulos, fueron incapaces de incrementar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que demuestra que su aumento depende fundamentalmente del Ca^{2+} almacenado en el RSE del cardiomiocito neonato (Figura 16B).

Tal como se discutió anteriormente, el tratamiento con nifedipino y rianodina eliminó por completo el aumento rápido de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por insulina 1 nM y dejo en evidencia un componente mas lento y de menor intensidad (Figura 16), que desapareció al tratar los cardiomiocitos con BAPTA-AM (Figura 17A). Para determinar el mecanismo de liberación de esta componente independiente de Ca^{2+}_v tipoL / RyR y considerando resultados previos de nuestro laboratorio (68) (69), se investigó la participación de enzimas relacionadas con el metabolismo del IP_3 . La estimulación con insulina a cardiomiocitos pre tratados con LY-292004 provocó entre 2 y 12 pulsos rápidos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 1 segundo, semejantes al inicio rápido de la señal producida por insulina, lo que podría ser explicado por una

activación desregulada de la vía RI-Ca²⁺_v tipoL-RyR que posicionaría a una(s) isoforma(s) de PI3K involucrada(s) en la génesis de la segunda componente lenta de aumento de [Ca²⁺]_i y en la regulación del inicio de la señal. En los últimos años se han publicado importantes trabajos que describen nuevas funciones para PI3K γ . Al respecto, Patrucco et al., describieron en modelos de ratones transgenicos que PI3K γ participa en dos distintas rutas de señalización: una dependiente de su actividad kinasa que controla las rutas PDK; Akt/PKB; MAPK y otra, independiente de su actividad kinasa que regula la actividad de fosfodiesterasa 3B (PDE3B) y de esta manera la contractibilidad cardiaca (70). En este mismo sentido, Marcantoni et al., han descrito que PI3K γ modula positivamente la actividad de PDE3, observándose que cardiomiocitos neonatos PI3K^{-/-} son mas sensibles la estimulación del receptor β_2 -adrenérgico (71).

Por otro lado, los cardiomiocitos neonatos pretratados con U-73122, mostraron un único aumento rápido del [Ca²⁺]_i de 1 seg al ser estimulados con insulina. Estos resultados sugieren que el segundo componente de la señal producida por insulina en el cardiomiocito depende también de la activación de alguna isoforma de PLC implicada en esta ruta transduccional. En este sentido, se ha descrito una isoforma de PLC (PLC γ), que puede ser activada por factores de crecimiento en una amplia variedad de modelos, al producir la activación de la actividad tirosina kinasa intrínseca de sus receptores y posterior activación de PLC γ . En adición, cada vez existen mas referencias que vinculan la activación de otra isoforma de PLC (PLC β) a través de proteína Gq o subunidad $\beta\gamma$ de proteína

G (72). Resta en nuestro trabajo determinar cuál de estas dos isoformas de PLC media el efecto de insulina en los niveles de calcio.

Continuando con la ruta de liberación del pool de $[Ca^{2+}]_i$ dependiente del IP_3R , utilizamos xestospongina C, toxina obtenida de esponjas marinas que actúan como antagonistas competitivos del receptor de IP_3 (73) y 2-APB, un modulador de los procesos mediados por IP_3 (74) (75). Los resultados obtenidos muestran que con xestospongina y con 2-APB, se bloquea la segunda componente de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ dejando aumentos rápidos (1 segundo) que parecen ser repeticiones de la primera componente aquí descrita. Resultados similares han sido descritos por trabajos en nuestro laboratorio con estímulos de IGF-1 en cardiomiocitos y en músculo esquelético (76) (77). Tanto en cardiomiocitos de rata como de cuyes, la principal isoforma expresada del IP_3R es la tipo 2 (78). En cardiomiocitos de ratas neonatas tanto las isoformas 2 como la 3 han sido identificadas, pero con diferentes localizaciones subcelulares (79).

Hace aproximadamente 15 años atrás, Nishimoto et al., demostraron que TXP bloqueó tanto los de Ca^{2+} como la síntesis de DNA inducidas por IGF-1 en células Balb/c 3T3, describiendo por primera vez la participación de una proteína G sensible a TXP en la acción de IGF-1(80). Mas tarde se demostró que TXP actuaría como antagonista los efectos mitogénicos de IGF-1, pero no los efectos metabólicos de insulina, atribuyéndose a que IGF-1 mediaría sus efectos a través de proteína G_i , y que por otro lado, insulina lo haría a través de un tipo $G_q/11$ (81). Resultados similares se han encontrado en condorcitos, donde IGF-1 e insulina inducen aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ de manera dosis dependiente. Estos aumentos serian producidos a través de dos mecanismos que operan concertadamente; la entrada

de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo L y la movilización de Ca^{2+} desde retículo endoplasmático, mediada por IP_3 a través de la activación de PLC (82). Nuestros resultados indican que al estimular los cardiomiocitos neonatos con insulina previa incubación de las células con TXP, solo se afectó parcialmente la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por insulina (Figura 19B). Sin embargo, no se descarta la participación de otra proteína G insensible a TXP. Por esta razón decidimos expresar un péptido correspondiente a la región carboxi terminal de la kinasa del receptor β -adrenérgico, que presenta gran afinidad por subunidad $\beta\gamma$ de proteína G heterotrimerica (83). Los resultados mostrados en (Figura 19A), muestran que insulina solo produjo un aumento rápido del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eliminando por completo la segunda señal de liberación mas lenta.

8. CONCLUSIÓN

- El RI esta presente en cardiomiocitos de rata neonata y se distribuye en membrana citoplasmática, citoplasma celular y región peri nuclear.
- En cardiomiocitos de rata adulta, el RI se distribuye en el citoplasma celular y en la membrana citoplasmática teniendo en esta ultima locación mayor presencia que en el modelo neonato.
- El RI conserva funcionalidad en nuestro modelo y responde a parámetros convencionales de interacción ligando receptor.
- Insulina es capaz de aumentar los niveles $[Ca^{2+}]_i$ de manera dependiente de la dosis y este efecto involucra la actividad tirosina kinasa intrínseca del RI.
- Nifedipino y rianodina bloquearon la primera componente de aumento rápido del $[Ca^{2+}]_i$, sugiriendo la participación del Ca^{2+} externo en esta etapa.
- BAPTA inhibió por completo la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por insulina, indicando que el Ca^{2+} extracelular que participa en el primer aumento de Ca^{2+} no es capaz de saturar al quelante.
- La estimulación de los cardiomiocitos con insulina post depleción de los reservorios de $[Ca^{2+}]_i$ con tapsigargina no produjo señal, confirmando el concepto del punto anterior.
- La inhibición de PI3K modificó la cinética de $[Ca^{2+}]_i$ produciendo señales rápidas de 1 segundo de duración eliminando por completo una segunda componente mas lenta.

- En cardiomiocitos pretratados con el inhibidor de PLC, insulina solo aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ de forma rápida y transitoria, semejante a un fenómeno de tipo excitación-contracción.
- Xestospongina y 2-APB, impidieron la aparición de la segunda componente de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ luego de estimular los cardiomiocitos con insulina, lo que integra la participación del IP₃R en la señal registrada.
- Toxina pertussis modificó parcialmente el perfil cinético de la señal de $[Ca^{2+}]_i$.
- La expresión del péptido secuestrador de subunidad $\beta\gamma$ de proteína G a través de la transducción con Ad β arkct, logró inhibir por completo la segunda componente de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ sugiriendo la transactivación de un receptor acoplado a proteína G.
- Todos nuestros resultados en conjunto nos indican que insulina aumenta los niveles $[Ca^{2+}]_i$ a través de un mecanismo compuesto que involucra al pool de Ca^{2+} dependiente del RyR (RI-Cavtipo L- RyR- Ca^{2+}) y al pool de Ca^{2+} dependiente de la producción de IP₃ (RI-G $\beta\gamma$ -PI3K-PLC-IP₃-IP₃R- Ca^{2+}).

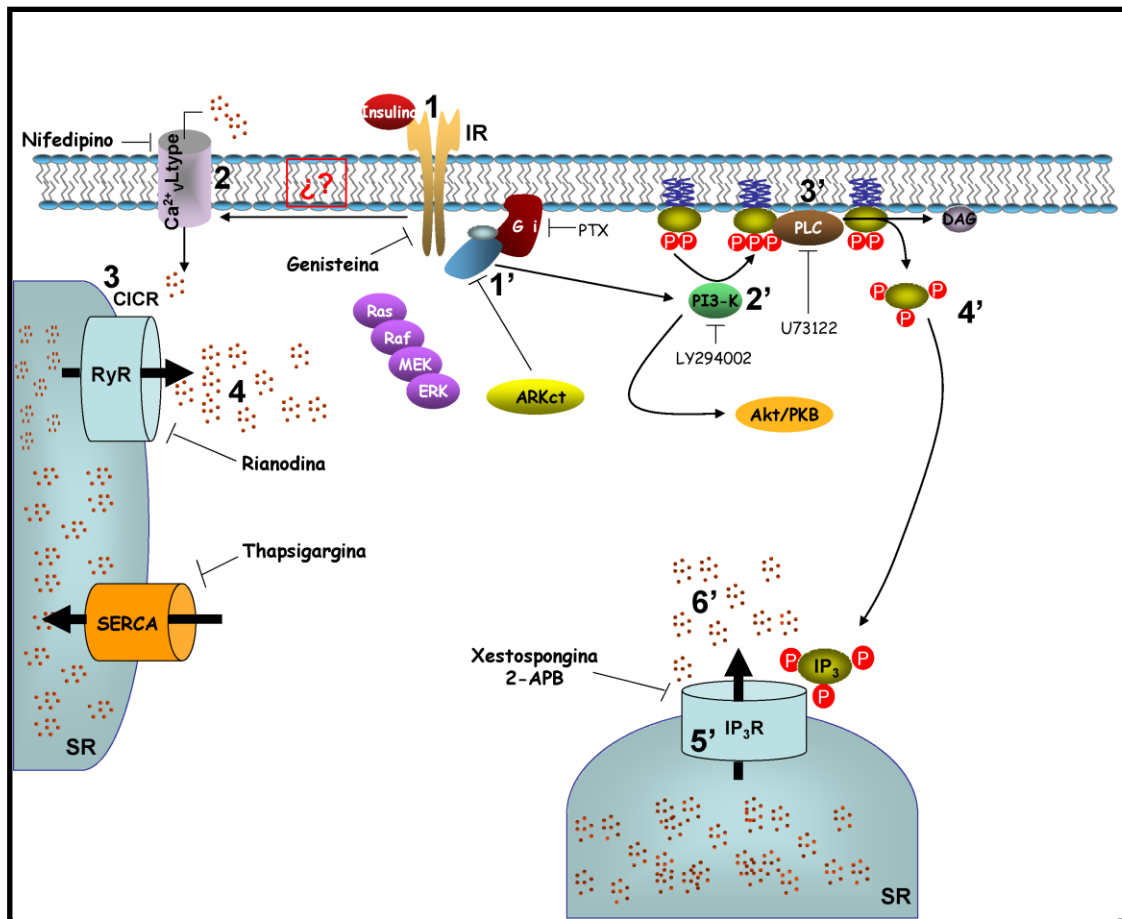


Figura 20. Modelo de liberación de $[Ca^{2+}]_i$ propuesto

Insulina aumenta los niveles $[Ca^{2+}]_i$ por un mecanismo compuesto, en el que participa tanto el Ca^{2+} externo como el Ca^{2+} interno. La figura muestra una esquematización secuencial de los eventos transduccionales involucrados en cardiomiocitos post estímulo con insulina 1 nM. De esta manera se puede resumir una primera componente tipo CICR de la forma [RI(1)- Ca^{2+} tipo L(2)-RyR(3)- Ca^{2+} (4)] y una segunda componente que depende de la producción de IP_3 según la vía [RI(1)- $G\beta\gamma$ (1')-PI3K(2')-PLC(3')- IP_3 (4')- IP_3R (5')- Ca^{2+} (6')].

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S** 2006 Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. *J Biochem (Tokyo)* 140:1-5
2. **MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P** 2005 Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:2211-2225
3. **Wang PR, Chien YW** 1996 Day-night differences in the kinetics and dynamics of insulin: diabetic versus normal Yucatan minipigs. *Chronobiol Int* 13:213-225
4. **Yip CC, Ottensmeyer P** 2003 Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* 278:27329-27332
5. **Hwang JB, Frost SC** 1999 Effect of alternative glycosylation on insulin receptor processing. *J Biol Chem* 274:22813-22820
6. **Gual P, Marchand-Brustel Y, Tanti JF** 2005 Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87:99-109
7. **Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR** 2006 Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96
8. **Nakagawa Y, Aoki N, Aoyama K, Shimizu H, Shimano H, Yamada N, Miyazaki H** 2005 Receptor-type protein tyrosine phosphatase epsilon (PTPepsilon) is a negative regulator of insulin signaling in primary hepatocytes and liver. *Zool J Linn Soc* 147:169-175
9. **Nawaratne R, Gray A, Jorgensen CH, Downes CP, Siddle K, Sethi JK** 2006 Regulation of insulin receptor substrate 1 pleckstrin homology domain by protein kinase C: role of serine 24 phosphorylation. *Mol Endocrinol* 20:1838-1852
10. **Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC** 2005 Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30:194-204
11. **Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J** 1998 Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17:414-422
12. **Vanhaesebroeck B, Alessi DR** 2000 The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3:561-576

13. **Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR** 2006 Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96
14. **Farese RV** 2002 Function and dysfunction of α PKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E1-11
15. **Weber KT, Brilla CG** 1993 Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol* 16:II10-II14
16. **Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S** 1991 Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5:3037-3046
17. **Manabe I, Shindo T, Nagai R** 2002 Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91:1103-1113
18. **Abel ED** 2004 Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep* 6:416-423
19. **Cheatham B, Kahn CR** 1995 Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16:117-142
20. **Brownsey RW, Boone AN, Allard MF** 1997 Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34:3-24
21. **Baron AD, Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G** 1995 Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. *J Clin Invest* 96:786-792
22. **Kelly RA, Balligand JL, Smith TW** 1996 Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79:363-380
23. **Asmal AC, Leary WP, Thandroyen F** 1980 Diabetic heart disease. *S Afr Med J* 57:788-790
24. **Zhang J, Duncker DJ, Ya X, Zhang Y, Pavek T, Wei H, Merkle H, Ugurbil K, From AH, Bache RJ** 1995 Effect of left ventricular hypertrophy secondary to chronic pressure overload on transmural myocardial 2-deoxyglucose uptake. A ^{31}P NMR spectroscopic study. *Circulation* 92:1274-1283
25. **Paternostro G, Clarke K, Heath J, Seymour AM, Radda GK** 1995 Decreased GLUT-4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in the hypertensive rat heart. *Cardiovasc Res* 30:205-211

26. **Draznin B** 2006 Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85{alpha}: The Two Sides of a Coin. *Diabetes* 55:2392-2397
27. **Berridge MJ** 2006 Remodelling Ca²⁺ signalling systems and cardiac hypertrophy. *Biochem Soc Trans* 34:228-231
28. **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD** 2000 The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21
29. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL** 2003 Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529
30. **Bers DM** 2002 Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
31. **Stern MD, Cheng H** 2004 Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? *Cell Calcium* 35:591-601
32. **Li MX, Wang X, Sykes BD** 2004 Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology. *J Muscle Res Cell Motil* 25:559-579
33. **Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH** 1980 Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res* 47:922-933
34. **Pierce GN, Russell JC** 1997 Regulation of intracellular Ca²⁺ in the heart during diabetes. *Cardiovasc Res* 34:41-47
35. **Yu Z, Quamme GA, McNeill JH** 1994 Depressed [Ca²⁺]_i responses to isoproterenol and cAMP in isolated cardiomyocytes from experimental diabetic rats. *Am J Physiol* 266:H2334-H2342
36. **Yu Z, Tibbits GF, McNeill JH** 1994 Cellular functions of diabetic cardiomyocytes: contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am J Physiol* 266:H2082-H2089
37. **Yu JZ, Rodrigues B, McNeill JH** 1997 Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34:91-98
38. **Shah AS, White DC, Emani S, Kypson AP, Lilly RE, Wilson K, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ** 2001 In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 103:1311-1316
39. **Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ** 1994 Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* 269:6193-6197

40. **Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH, LeRoith D, Lavandero S** 1997 Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:19115-19124
41. **Minta A, Kao JP, Tsien RY** 1989 Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264:8171-8178
42. **Kang S, Song J, Kang H, Kim S, Lee Y, Park D** 2003 Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. *Eur J Endocrinol* 148:147-155
43. **Yip CC, Ottensmeyer P** 2003 Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* 278:27329-27332
44. **Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565
45. **Gribble FM** 2005 Metabolism: a higher power for insulin. *Nature* 434:965-966
46. **Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR, Abel ED** 2002 Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109:629-639
47. **Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565
48. **Espinosa A, Estrada M, Jaimovich E** 2004 IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *J Endocrinol* 182:339-352
49. **Espinosa A, Estrada M, Jaimovich E** 2004 IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *J Endocrinol* 182:339-352

50. **Nie L, Kanzaki M, Shibata H, Kojima I** 1998 Activation of calcium-permeable cation channel by insulin in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors. *Endocrinology* 139:179-188
51. **Nystrom FH, Chen H, Cong LN, Li Y, Quon MJ** 1999 Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 13:2013-2024
52. **Irvine RF** 2003 Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:349-360
53. **Saltiel AR, Pessin JE** 2003 Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 4:711-716
54. **Nystrom FH, Chen H, Cong LN, Li Y, Quon MJ** 1999 Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 13:2013-2024
55. **Rybin VO, Grabham PW, Elouardighi H, Steinberg SF** 2003 Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H325-H332
56. **Torlinska T, Mackowiak P, Nogowski L, Nowak KW, Madry E, Perz M** 1998 Characteristics of insulin receptor binding to various rat tissues. *J Physiol Pharmacol* 49:261-270
57. **Patterson CH, Jr., Smith JD** 1996 Differential modification of activities of the high-affinity and low-affinity insulin receptors of 3T3-L1 fibroblasts by phosphonolipids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 228:75-80
58. **Liu L, Xie Y, Lou L** 2006 PI3K is required for insulin-stimulated but not EGF-stimulated ERK1/2 activation. *Eur J Cell Biol* 85:367-374
59. **Proud CG** 2004 Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 63:403-413
60. **Poiraudou S, Lieberherr M, Kergosie N, Corvol MT** 1997 Different mechanisms are involved in intracellular calcium increase by insulin-like growth factors 1 and 2 in articular chondrocytes: voltage-gated calcium channels, and/or phospholipase C coupled to a pertussis-sensitive G-protein. *J Cell Biochem* 64:414-422
61. **Yip CC, Ottensmeyer P** 2003 Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *J Biol Chem* 278:27329-27332
62. **Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and

cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565

63. **Benzeroual K, Pandey SK, Srivastava AK, Van de WG, Haddad PS** 2000 Insulin-induced Ca(2+) entry in hepatocytes is important for PI 3-kinase activation, but not for insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1495:14-23
64. **Maier S, Aulbach F, Simm A, Lange V, Langenfeld H, Behre H, Kersting U, Walter U, Kirstein M** 1999 Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res* 44:390-397
65. **Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez AM, Benitah JP** 2006 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol* 90:118-135
66. **Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I** 2005 EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J* 39:13-23
67. **Bers DM** 2002 Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205
68. **Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565
69. **Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2006 Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 147:1386-1395
70. **Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E** 2004 PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118:375-387
71. **Marcantoni A, Levi RC, Gallo MP, Hirsch E, Alloatti G** 2006 Phosphoinositide 3-kinase gamma (PI3Kgamma) controls L-type calcium current (I_{Ca,L}) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3). *J Cell Physiol* 206:329-336
72. **Rhee SG, Bae YS** 1997 Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272:15045-15048

73. **Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN** 1997 Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19:723-733
74. **Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K** 1997 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem (Tokyo)* 122:498-505
75. **Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM** 2002 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* 16:1145-1150
76. **Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S** 2004 Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279:7554-7565
77. **Espinosa A, Estrada M, Jaimovich E** 2004 IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. *J Endocrinol* 182:339-352
78. **Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA** 1997 Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:23961-23969
79. **Jaconi M, Bony C, Richards SM, Terzic A, Arnaudeau S, Vassort G, Puceat M** 2000 Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell* 11:1845-1858
80. **Nishimoto I, Ogata E, Kojima I** 1987 Pertussis toxin inhibits the action of insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* 148:403-411
81. **Dalle S, Ricketts W, Imamura T, Vollenweider P, Olefsky JM** 2001 Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *J Biol Chem* 276:15688-15695
82. **Poiraudeau S, Lieberherr M, Kergosie N, Corvol MT** 1997 Different mechanisms are involved in intracellular calcium increase by insulin-like growth factors 1 and 2 in articular chondrocytes: voltage-gated calcium channels, and/or phospholipase C coupled to a pertussis-sensitive G-protein. *J Cell Biochem* 64:414-422
83. **Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ** 1994 Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. *J Biol Chem* 269:6193-6197

