

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MOLECULARES**



**NUEVAS VIAS DE TRANSDUCCIÓN EN LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA**  
**DEPENDIENTE DE INSULINA EN CULTIVOS DE**  
**CARDIOMIOCITOS DE RATA ADULTA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Constanza Carolina Carrillo Ballesteros**

*Profesor Patrocinante*  
**Dr. Sergio Lavandero**

*Directores de Memoria*

**Dr. Sergio Lavandero**

**Dr. Ariel Contreras Ferrat**

Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Depto. de Bioquímica y Biología Celular  
Universidad de Chile

**Santiago de Chile**  
**2010**

# 1 ÍNDICE GENERAL

1	ÍNDICE GENERAL .....	2
2	ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
3	RESUMEN .....	6
4	ABSTRACT.....	7
5	ABREVIATURAS .....	8
6	INTRODUCCIÓN.....	10
6.1	Insulina .....	10
6.2	Receptor de insulina y su sistema de transducción .....	11
6.3	Acción de insulina en el corazón de mamíferos.....	13
6.4	Ca <sup>+2</sup> en cardiomiocitos .....	15
6.5	Diabetes mellitus.....	16
6.6	Regulación del transporte de glucosa inducido por insulina .....	17
6.7	Participación de la vía dependiente e independiente de IRS en la regulación de GLUT4	
	19	
7	HIPÓTESIS.....	21
8	OBJETIVO GENERAL .....	21
9	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
10	MATERIALES Y MÉTODOS .....	22

10.1	Reactivos .....	22
10.2	Cardiomiocitos adultos .....	22
10.3	Obtención de extractos proteicos de células.....	23
10.4	Determinación de proteínas .....	24
10.4.1	Método de Lowry.....	24
10.4.2	Método de Bradford .....	24
10.5	Análisis de Western blot .....	24
10.6	Captación de glucosa.....	25
10.7	Expresión de resultados y análisis estadístico .....	25
11	RESULTADOS .....	26
11.1	Activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta .....	26
11.2	Insulina aumenta el transporte de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta	28
11.3	Participación del Ca <sup>+2</sup> extracelular e intracelular en la fosforilación de AKT estimulada por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta .....	30
11.4	Participación del Ca <sup>+2</sup> extracelular e intracelular en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos de rata adulta .....	34
11.5	Participación de los reservorios intracelulares de Ca <sup>2+</sup> en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	38
12	DISCUSIÓN .....	40
12.1	Activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta .....	40

12.2	Insulina aumenta el transporte de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta	42
12.3	Participación del $\text{Ca}^{2+}$ en la activación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta .....	43
12.4	Participación del $\text{Ca}^{2+}$ en el transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta .....	45
13	CONCLUSIONES.....	50
14	REFERENCIAS.....	51

## 2 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto de insulina en la activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	27
<b>Figura 2.</b> Efecto de insulina en la captación de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	29
<b>Figura 3.</b> La fosforilación de AKT inducida por insulina depende del $Ca^{2+}$ intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	31
<b>Figura 4.</b> La fosforilación del RI inducida por insulina es independiente del $Ca^{2+}$ extra e intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	32
<b>Figura 5.</b> Efecto de Ryanodina en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	33
<b>Figura 6.</b> Efecto de 2- APB en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	34
<b>Figura 7.</b> La captación de glucosa inducida por insulina depende del $Ca^{2+}$ intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	35
<b>Figura 8.</b> Efecto de la presencia de $Ca^{2+}$ externo en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	36
<b>Figura 9.</b> Efecto de Ionomicina en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	37
<b>Figura 10.</b> Efecto de Ryanodina en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	38
<b>Figura 11.</b> Efecto de 2-APB en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	39
<b>Figura suplementaria.</b> Efecto de Xestospongina C en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.....	49

### 3 RESUMEN

A pesar de que el  $\text{Ca}^{+2}$  posee un papel fundamental en regular la función contráctil del cardiomiocito adulto, se desconoce si este ión media las acciones metabólicas de insulina, especialmente aquellas relacionadas con el ingreso de la glucosa a la célula. En esta tesis se investigó la participación del  $\text{Ca}^{+2}$  en la activación de AKT y en la captación de glucosa inducida por insulina en cultivos de cardiomiocitos aislados de rata adulta. La quelación del  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular utilizando EGTA, no inhibió la fosforilación de AKT ni el transporte de glucosa estimulado por insulina, demostrando que el efecto de insulina es independiente de un influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el medio extracelular. Por el contrario la depleción del  $\text{Ca}^{+2}$  del medio intracelular utilizando BAPTA-AM, disminuyó drásticamente la fosforilación de AKT y el transporte de glucosa inducido por insulina, demostrando que ambas etapas de la señalización de insulina dependen de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. En la evaluación del componente de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular involucrado en la fosforilación de AKT, tanto el bloqueador del canal/receptor intracelular Ryanodina y el inhibidor de los procesos dependientes de  $\text{IP}_3$  2-APB tendieron a disminuir la fosforilación de AKT dependiente de insulina en el cardiomiocito adulto. En contraste, 2-APB pero no ryanodina afectó la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos de rata adulta, lo que sugiere una interrelación entre la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de  $\text{IP}_3$  y el transporte de glucosa inducido por insulina en el cardiomiocito adulto. Otros aspectos observados en la regulación por  $\text{Ca}^{+2}$  del transporte de glucosa indican que la captación de glucosa basal y dependiente de insulina es mayor en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular, sugiriendo que el  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular podría participar en los procesos de endocitosis de GLUT4. Además, se observó que el tratamiento de las células con el ionóforo divalente de  $\text{Ca}^{+2}$  Ionomicina, no afectó la captación basal de glucosa pero disminuyó la inducida por insulina, indicando que el  $\text{Ca}^{+2}$  necesario para la regulación del transporte de glucosa debe permanecer dentro de un rango de concentración. En conclusión, el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular es un importante mediador fisiológico de la fosforilación de AKT y del transporte de glucosa estimulado por insulina y, que este último proceso es fuertemente modulado por la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde los reservorios intracelulares dependientes de  $\text{IP}_3$ R.

#### 4 ABSTRACT

##### **New transduction pathways in insulin mediated glucose uptake in adult rat cardiomyocytes**

Although  $\text{Ca}^{+2}$  has a key role in regulating the contractile function of adult cardiomyocytes, it is still unknown if this ion mediates the metabolic actions of insulin, especially those related to glucose uptake. Chelation of extracellular  $\text{Ca}^{+2}$ , using EGTA, did not inhibit insulin-dependent AKT activation and glucose uptake, demonstrating that the effect of insulin is independent of a  $\text{Ca}^{+2}$  influx from the extracellular environment. On the contrary, depletion of intracellular  $\text{Ca}^{+2}$ , using BAPTA-AM, drastically reduced insulin-dependent AKT activation and glucose uptake, showing that both steps of insulin signaling depend on intracellular calcium. To investigate the intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  component involved in AKT phosphorylation, ryanodine (RyR channel  $\text{Ca}^{+2}$  blocker) and 2-APB ( $\text{IP}_3\text{R}$  inhibitor) were used. Both drugs tend to decrease the insulin-dependent AKT activation in adult cardiomyocytes. In contrast, 2-APB but not Ryanodine affects insulin induced glucose uptake in adult rat cardiomyocytes, suggesting an interrelationship between the  $\text{IP}_3$  dependent  $\text{Ca}^{+2}$  release and insulin induced glucose uptake in adult cardiomyocytes. Other aspects observed in  $\text{Ca}^{+2}$  regulation of glucose uptake show that basal and insulin stimulated glucose uptakes were greater in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{+2}$ , suggesting this  $\text{Ca}^{+2}$  might participate in GLUT4 endocytosis. In addition, treatment of cells with divalent calcium ionophore, Ionomycin, did not affect basal glucose uptake but decreased insulin-stimulated glucose uptake. These findings suggest that  $\text{Ca}^{+2}$  involved in the regulation of glucose transport must remain within a range of concentration. In conclusion, intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  is an important physiological mediator of AKT phosphorylation and glucose transport stimulated by insulin, and that the latter process is strongly modulated by the release of  $\text{Ca}^{+2}$  from intracellular reservoirs  $\text{IP}_3\text{R}$ -dependent.

## 5 ABREVIATURAS

2-APB:	2-amino etoxidifenil borato
ADP:	Adenosina difosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
BAPTA-AM:	BAPTA-acetometil éster
BSA:	Seroalbúmina de bovino
Ca <sup>2+</sup> :	Calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> :	Calcio intracelular
CICR:	Liberación de Ca <sup>2+</sup> inducida por Ca <sup>2+</sup>
DAG:	Diacilglicerol
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK:	Proteína kinasa regulada extracelularmente
IGF-1:	Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1
Ins:	Insulina
IP <sub>3</sub> :	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R:	Receptor de IP <sub>3</sub>
mRNA:	RNA mensajero
M199:	Medio 199
mA:	Miliamperes
MAPK:	Proteína kinasa activada por mitógenos
mg:	Milígramo
µg:	Microgramo
min:	Minuto
mL	Mililitro
µL	Microlitro

PBS:	Tampón fosfato salino
PI3K:	Fosfoinositido-3-Kinasa
PLC:	Fosfolipasa C
PKA:	Proteína kinasa A
PKC:	Proteína kinasa C
RI:	Receptor de Insulina
RNA:	Ácido ribonucleico
rpm:	Revoluciones por minuto
RSE:	Retículo sarco-endoplasmático
RyR:	Receptor de rianodina
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SEM:	Error estándar de la media
SERCA:	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo sarcoplásmico
VAMP:	Proteína asociada a la membrana de vesículas
Xesto:	Xestospongina

## 6 INTRODUCCIÓN

### 6.1 Insulina

La insulina es una hormona peptídica sintetizada por las células  $\beta$  del páncreas. Su mRNA es traducido como un precursor de cadena simple denominado preproinsulina, el cual consiste en una secuencia señal y dos cadenas peptídicas conectadas por el péptido C. El péptido señal es removido en el retículo endoplásmico, generando proinsulina, la cual es transferida en vesículas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, donde se procesa enzimáticamente para generar insulina y péptido C en cantidades equimolares. La insulina biológicamente activa consta de dos cadenas peptídicas conocidas como cadenas A y B. Estas se encuentran unidas por dos puentes disulfuro, y un puente disulfuro adicional entre las cisteínas 6 y 11 de la cadena A. En la mayoría de las especies, las cadenas A y B constan de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, formando una estructura final de 51 aminoácidos con una masa molecular de 5,8 kDa (1). La secreción de insulina hacia la circulación es estimulada principalmente por concentraciones plasmáticas de glucosa elevadas y se produce a través de un mecanismo que depende de la incorporación de glucosa por el transportador GLUT-2, el aumento en la razón ATP/ADP, cierre de canales de  $K^+$  sensibles a ATP, despolarización de la membrana y apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Finalmente esta vía resulta en un aumento del calcio en las células  $\beta$ , lo que activa la exocitosis de las vesículas secretoras de insulina (2). El papel de insulina en el organismo, es facilitar la incorporación de glucosa a las células con el fin de mantener niveles normales de glucosa plasmática, regular el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos y promover la división celular a través de sus efectos mitogénicos. Su actividad está finamente regulada y depende que exista un equilibrio en el uso de macronutrientes y un control en el abastecimiento energético de diferentes tejidos y tipos celulares (3).

## 6.2 Receptor de insulina y su sistema de transducción

El gen del receptor de insulina humano, ubicado en el cromosoma 19, se compone de 22 exones y se extiende a más de 120 kpb (4). La estructura básica del receptor de insulina (RI) es de un heterodímero de la forma  $(\alpha\beta)_2$ , unido por puentes disulfuros. La subunidad  $\alpha$  (135 kDa) es extracelular y proporciona el sitio de unión a insulina, mientras que la subunidad  $\beta$  (95-kDa) posee una porción extracelular, una región transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa intrínseca (5). Por otra parte, debido al empalme alternativo del exón 11 del transcrito del RI, existen dos isoformas del RI humano, RI-A y RI-B, las que difieren en la inclusión (RI-B) o exclusión (RI-A) de 12 aminoácidos en la región carboxi-terminal de la subunidad  $\alpha$ . El RI-A se expresa predominantemente en la etapa fetal y posee una mayor afinidad por IGF-II, lo que explicaría su rol en el crecimiento. En cambio el RI-B se expresa mayormente en tejidos adultos y media los efectos metabólicos de insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Sin embargo, independiente de la isoforma, la unión de insulina a las subunidades  $\alpha$  del receptor induce cambios conformacionales que permiten la transfosforilación de las subunidades  $\beta$ , proporcionándoles la actividad tirosina kinasa intrínseca, que es fundamental en la activación de la vía de señalización de insulina (6,7).

Una vez activado el RI comienza una cascada de fosforilaciones que regulan interacciones proteicas y actividades enzimáticas. Los blancos de fosforilación del RI incluyen a los sustratos del receptor de insulina (IRS), a la proteína homóloga a Src y colágeno (Shc) y la proteína adaptadora con dominios PH y SH2 (APS). Estos sustratos fosforilados constituyen moléculas de acoplamiento que unen y activan kinasas celulares, iniciando vías de señalización divergentes que median las acciones de insulina. La cascada Ras-Raf-MEK-ERK participa en la síntesis de proteínas, crecimiento y diferenciación celular y es activada principalmente por Shc. La vía fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) clase I/proteína kinasa B (PKB, también conocida con la sigla AKT) es activada principalmente por el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) y es responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de insulina (6).

IRS-1 pertenece a la familia de proteínas adaptadoras IRS y juega un rol fundamental en la señalización de insulina. Posee dominios de homología tipo pleckstrina (PH) y dominios de

unión a fosfotirosina (PTB) que le permiten unirse al RI y ser activado mediante su fosforilación en residuos de tirosina. Por otra parte, tanto IRS-1 como RI, son regulados negativamente por proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) y por fosforilación en residuos de serina. Una vez activado IRS-1 recluta a un número de proteínas transductoras de señales, entre las que se incluye PI3K (8). La PI3K está constituida por dos subunidades, una regulatoria y otra catalítica, cada una de las cuales presenta varias isoformas. La activación de la subunidad catalítica depende de la interacción de dos dominios SH2 de la subunidad regulatoria con motivos específicos de tipo fosfotirosina de la proteína IRS. Una vez activada PI3K cataliza la formación del segundo mensajero lipídico fosfoinositido 3-fosfato (PIP3), a partir de fosfoinositido 2-fosfato. Esto recluta a proteínas con dominios PH, como la quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK1) y la proteína serina/treonina quinasa AKT hacia la superficie interna de la membrana celular, favoreciendo su activación (9). AKT media varias de las acciones metabólicas de insulina a través de la fosforilación de un amplio rango de sustratos. Sin embargo su actividad kinasa debe ser completamente activada mediante la fosforilación de dos de sus residuos aminoacídicos, treonina 308 y serina 473. PDK1 fosforila a AKT en treonina 308, y mTORC2 (así como otras PDK2s potenciales) en serina 473. Una vez fosforilada, AKT se transloca desde la membrana plasmática hacia otros compartimentos celulares para fosforilar proteínas de señalización, factores transcripcionales y otras proteínas kinasas con el fin de regular múltiples procesos celulares (10).

La señalización de insulina es mediada por una compleja y altamente integrada red de transducción de señales que controla diversos procesos celulares. Se han desarrollado modelos de nodos de transducción que han ayudado a comprender las múltiples interacciones de insulina en los distintos sistemas. Las proteínas transductoras de señales recién mencionadas, IR/IRS, PI3K y AKT, son consideradas nodos críticos en el sistema de señalización de insulina ya que además de ser puntos de divergencia con otras rutas y ser altamente regulados, existen sólidas evidencias *in vivo* e *in vitro* que los vinculan con los principales efectos de insulina en una amplia variedad de modelos. Sin embargo, esto no descarta que, en determinados casos, otras proteínas transduccionales reguladas por insulina puedan también actuar como nodos

críticos, como ocurre por ejemplo con las familias de las PKCs, Rho GTPasa, Ras, p38-MAPK, entre otras (9).

### **6.3 Acción de insulina en el corazón de mamíferos**

Las patologías cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Además, se ha observado que la diabetes tipo 2 incrementa significativamente el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, y la principal causa de muerte en pacientes diabéticos son las enfermedades cardiovasculares (11). Estos antecedentes, sumados a la evidencia de que el RI es expresado en el corazón y que su sistema de transducción se encuentra activo (12), hacen necesario determinar exactamente el rol de insulina en el corazón.

Las acciones de insulina en el corazón deben ser analizadas considerando las singulares características que posee este tejido. Entre éstas se destaca el constante bombeo del corazón, el cual genera una gran demanda energética de ácidos grasos y glucosa, además de movilizar constantemente  $Ca^{2+}$  para regular su actividad contráctil (13). Entre las acciones indirectas que insulina ejerce en el corazón se encuentra regular el balance de los metabolitos energéticos suministrados al miocardio, principalmente mediante sus acciones en el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado (13). Asimismo, se ha evidenciado que insulina tiene acciones en el tono vascular, las que en su mayoría llevan a vasodilatación e incremento del flujo sanguíneo y un subsecuente aumento en la disponibilidad de glucosa en los tejidos blanco de insulina. Esto se debe a que la vía PI3K/AKT modula la producción del potente vasodilatador óxido nítrico, mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (14). Por otro lado, algunas de las acciones directas de insulina sobre el corazón son: transporte de glucosa a través de los transportadores facilitativos para glucosa GLUT-4, metabolismo del glicógeno, oxidación del piruvato, regulación de la glicólisis, metabolismo de ácidos grasos y regulación de la expresión de proteínas del miocardio (15). Como ejemplos de la acción de insulina en la regulación de algunos de estos procesos, se ha descrito que la señalización de insulina promueve la glicólisis en el corazón al activar a la fosfofructokinasa-2 (PFK2), enzima responsable de sintetizar

fructosa 2,6- bifosfato, un potente estimulador de la 6-fosfofructokinasa-1 (PFK1), la principal enzima reguladora del flujo glicolítico (16). También se ha demostrado que insulina regula la síntesis proteica al modular la vía PKB/AKT/TSC2/mTOR en cardiomiocitos. Una vez activada, mTOR regula principalmente a dos proteínas: la proteína de unión a 4E-1 (4E-BP1) y a la kinasa ribosomal (p70S6K), ambas implicadas en la traducción de proteínas (16).

Ratones knockout para el RI en cardiomiocitos presentan una reducción significativa del tamaño del corazón (22% y 28% menos en el peso de corazones de hembras y machos, respectivamente), persistencia en los patrones de expresión génica fetal para miosina, y alteraciones metabólicas tales como incremento de la glicólisis y disminución en la oxidación de ácidos grasos, condición característica de corazones inmaduros (15, 17).

Estudios en animales y humanos han sugerido que hay un aumento en la fosforilación de residuos de serina en IRS-1 por sobre su fosforilación en residuos de tirosina en estados de resistencia a la insulina, lo que impediría su activación por RI y alteraría la vía de señalización de insulina (18). Esta disminución en la sensibilidad y/o respuesta a las acciones metabólicas de insulina, es la característica principal de la diabetes, obesidad y dislipidemias; como también es un importante componente del desarrollo de hipertensión arterial, enfermedades coronarias y aterosclerosis (19). Esta relación entre enfermedades metabólicas y cardiovasculares se puede explicar porque, en estados de resistencia a la insulina, existe un desbalance entre las acciones vasodilatadoras del óxido nítrico y las acciones vasoconstrictoras de la endotelina-1, dependientes de las vías PI3K y ERK, respectivamente (20).

Los efectos de insulina han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, la completa identificación de los eventos de señalización molecular involucrados en la acción de insulina, es un desafío que aún se encuentra en progreso. El desarrollo de esta tarea brinda la posibilidad de generar nuevas herramientas moleculares para tratar enfermedades cardiovasculares como la resistencia a insulina, hipertrofia cardíaca y cardiopatía isquémica.

#### 6.4 $\text{Ca}^{+2}$ en cardiomiocitos

Las vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$  regulan múltiples procesos celulares. La versatilidad de acción de este segundo mensajero se debe a la amplia gama de componentes moleculares involucrados en la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$ , así como a su combinación para generar señales de  $\text{Ca}^{+2}$  con perfiles espaciales y temporales muy diferentes en los distintos tipos celulares (21). Los procesos regulados por  $\text{Ca}^{+2}$  operan en un amplio rango temporal, por ejemplo, en la transmisión sináptica o en la contracción cardíaca los sistemas efectores responden a pulsos de  $\text{Ca}^{+2}$  en el rango de los micro a los milisegundos. En cambio, cuando las señales transitorias de  $\text{Ca}^{+2}$  tienden a durar más tiempo, se propagan a través de la célula en forma de ondas para alcanzar sus blancos moleculares, y así regular respuestas como la transcripción génica y la síntesis proteica (22).

En los cardiomiocitos, células encargadas de la función contráctil del corazón, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular juega un papel fundamental tanto en la regulación de la contracción del tejido cardíaco como en la activación de las vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (23). El acoplamiento excitación-contracción cardíaco es el proceso que relaciona la excitación eléctrica del cardiomiocito con su contracción (24). Cuando un cardiomiocito es despolarizado mediante un potencial de acción, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, ubicados en el sarcolema, se abren permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. Este  $\text{Ca}^{2+}$  gatilla una posterior liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al activar a los receptores de ryanodina (RyR), ubicados en la membrana del retículo sarcoplásmico, en un proceso llamado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por calcio (CIRC, del inglés: *calcium-induced calcium release*) (25). La combinación del influjo y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, permitiendo que este ión se una a troponina C. desencadenando cambios conformacionales en el complejo troponina y tropomiosina que dejarán disponibles los sitios activos del filamento de actina para combinarse con miosina, en un proceso que utiliza ATP mediante una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La energía liberada por este proceso es transformada en trabajo mecánico que resulta en el acortamiento de las miofibrillas y la contracción cardíaca (26).

## 6.5 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus se define como un desorden metabólico crónico caracterizado por niveles persistentemente elevados de glucosa en la sangre, como consecuencia de una alteración en la secreción y/o acción de la insulina. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una resistencia a la insulina por parte de los tejidos. Las células del tejido adiposo, hepático y muscular no responden normalmente a la insulina y por esta razón el páncreas la produce en mayor cantidad. La glucosa que no llega a los tejidos, se acumula anormalmente en la sangre provocando hiperglicemia. La hiperglicemia trae como consecuencia, daños a nivel microangiopático (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (enfermedad isquémica del corazón, ataque cerebral y enfermedad vascular periférica) (27).

En el último siglo la sociedad ha experimentado profundos cambios en el estilo de vida que han resultado en un dramático incremento en la incidencia de diabetes. En conjunto con la susceptibilidad genética, la diabetes tipo 2 es provocada por factores ambientales y de comportamiento, como el sedentarismo, alimentación poco saludable y obesidad.

Actualmente, la prevalencia mundial de diabetes en adultos (entre 20 y 79 años) se estima en aproximadamente 285 millones de personas y se proyecta que en el año 2030, este número aumentará a 439 millones (28). La prevalencia de diabetes en Chile se estima entre 4,2% y 7,5% de la población, según las encuestas realizadas a nivel nacional los años 2003 y 2006, por el Ministerio de Salud y la Asociación de Diabéticos de Chile (ADICH), respectivamente (29). Estos datos nos dan cuenta que la diabetes se ha transformado en un problema a nivel mundial, con enormes consecuencias de costo tanto económico como social y, por lo tanto, se requiere un esfuerzo internacional coordinado para mejorar la calidad de vida y cambiar las conductas sociales que han convertido a la diabetes en una epidemia global.

## 6.6 Regulación del transporte de glucosa inducido por insulina

La glucosa es la principal fuente de energía en la gran mayoría de los organismos existentes, razón por la cual se han desarrollado mecanismos que facilitan su ingreso y metabolización a nivel celular. La mayoría de las células de mamíferos captan glucosa mediante un proceso de difusión facilitada a través de las proteínas transportadoras de glucosa, GLUTs. Estos transportadores pertenecen a una familia de proteínas de 12 dominios transmembrana, de las que actualmente se conocen 14 miembros que pueden dividirse en 3 grupos según sus características estructurales (30, 31).

Cada transportador de glucosa tiene un papel específico en el control de la homeostasis de glucosa ya sea por su expresión tejido específica, características cinéticas, preferencia de sustrato o por los mecanismos que regulan su expresión en la superficie celular y su papel en el metabolismo de glucosa (32). Por ejemplo, GLUT1 se expresa en las barreras endoteliales y epiteliales del cerebro, en la placenta y glándula mamaria en período de lactancia y GLUT3 es considerado un transportador de glucosa neurona-específico. Ambos transportadores se encuentran constitutivamente en la membrana celular, lo que proporciona el suministro constante de glucosa que estos tejidos necesitan (32). En cambio GLUT4, se caracteriza por su expresión preferencial en los tejidos sensibles a insulina como el cardíaco, muscular y adiposo, donde incrementa significativamente la tasa de incorporación de glucosa ya sea por demandas energéticas del tejido en ejercicio/contracción o por estímulos de insulina a través de un mecanismo altamente especializado (33). Debido a que esta acción se encuentra comprometida durante el desarrollo de diabetes tipo 2, se han desarrollado múltiples trabajos que apuntan a comprender la regulación de este proceso.

En condiciones basales el GLUT4 se encuentra en un reciclaje lento pero continuo entre la membrana plasmática y varios compartimentos intracelulares, con sólo el 5% del total de proteínas GLUT4 localizadas en la membrana plasmática. Bajo estímulos de insulina la exocitosis del transportador aumenta significativamente en conjunto con una leve disminución de su endocitosis, lo que lleva a que un 50% del total del transportador se relocalice en la membrana celular (34). Estudios de microscopía electrónica en células del tejido adiposo y

músculo esquelético han demostrado que en condiciones basales hasta un 75% del total de GLUT4 se localiza en pequeñas (50-80 nm) vesículas intracelulares, mientras que el resto del transportador se encuentra en membranas de rápida sedimentación que probablemente representan estructuras del endosoma o la red de trans-Golgi (TGN) (35). Las vesículas que contienen GLUT4 no representan un compartimento homogéneo e incluyen al menos dos poblaciones vesiculares: Las vesículas que responden a insulina (IRVs, del inglés: *insulin-responsive vesicles*), que se translocan a la membrana plasmática con la eficacia de prácticamente el 100%, y vesículas de transporte extendidas en el espacio intracelular que no son reclutadas a la membrana plasmática por estímulos de insulina (36).

Un análisis sistemático de las IRVs indica que las proteínas que mayoritariamente las componen son: GLUT4, la aminopeptidasa que responde a insulina (IRAP), sortilina, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad tipo 1 (LRP1) y la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP2) (37,38).

Existen nuevos antecedentes que GGA (proteína de unión a Arf- $\gamma$ , localizada en el Golgi, se requiere para direccionar el transportador GLUT4 recién formado desde el TGN hacia las IRVs (39). La única proteína de las de IRVs que interactúa directamente con GGA es sortilina, la cual interactúa con GLUT4, IRAP y LRP1 en el lumen vesicular. Sortilina se comporta como una proteína transmembrana de andamiaje al reunir a los componentes mayoritarios de las IRVs en un gran complejo oligomérico (36). ACAP1 es otra proteína adaptadora que tiene un papel fundamental en la formación de las IRVs, ya que interactúa con el loop citoplasmático central de GLUT4 y recluta a clatrina al inicio de la formación de estas vesículas especializadas (40). Por otra parte, numerosas evidencias sugieren que las proteínas adaptadoras AP1 Y AP2 también estarían involucradas en este proceso (41).

En los tejidos sensibles a insulina, IRAP se mueve junto a GLUT4 hacia la formación de los compartimentos especializados y como GLUT4, también es retenido en el espacio intracelular en estados basales y translocado a la membrana plasmática en una manera dependiente de insulina (42). Numerosas evidencias sugieren que IRAP podría tener un papel en el tráfico de GLUT4, por ejemplo, en células knockdown para IRAP se produjo un aumento

de 2 a 3 veces en la cantidad de GLUT4 en la membrana celular en condiciones basales, debido a una aceleración en la exocitosis que se correlacionó con una redistribución parcial de GLUT4 hacia endosomas de rápido reciclaje. Estos hallazgos documentan que IRAP tiene un papel fundamental en la retención intracelular de GLUT4 en condiciones basales, mediante el control de su distribución hacia las vesículas especializadas (42).

VAMP2, otra de las proteínas que conforman las IRVs, es un factor vesicular soluble sensible a *N*-etilmaleimida (NSF) unido a receptores proteicos (v-SNARE) que son requeridos para la fusión de GLUT4 con la membrana citoplasmática. VAMP2 no participa en la fusión de las vesículas de GLUT4 en dinámica basal, pero sí en las estimuladas por insulina. Además, estímulos como el estrés hiperosmótico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) no lograron que VAMP2 incrementara los niveles de GLUT4 en la superficie celular, la que fue dependiente de v-SNARE y VAMP7. Estas observaciones sugieren que las vesículas que llegan a la membrana plasmática por estímulos de insulina difieren de las que llegan en estado basal (43).

A pesar de los numerosos trabajos dirigidos a comprender el proceso de formación de las IRVs y su reclutamiento hacia la membrana celular por estímulos de insulina, aún son numerosas las preguntas que quedan por contestar para dilucidar por completo el funcionamiento de este proceso y su implicancia en el desarrollo de patologías como diabetes tipo 2.

## **6.7 Participación de la vía dependiente e independiente de IRS en la regulación de GLUT4**

La translocación de GLUT4 estimulada por insulina requiere al menos dos vías de señalización mediadas por el receptor de insulina: una conduce a la activación de PI3K y la otra a la activación de la GTPasa pequeña TC10 (44). La vía clásica de señalización por insulina implica el acoplamiento de IRS1 al receptor de insulina (RI) con posterior activación de PI3K, lo que conduce a la formación de PIP3 en la membrana plasmática y el subsecuente reclutamiento y activación de las quinasas PDK1 y AKT, las que terminan por activar a las isoformas atípicas de la proteína quinasa C ( $\alpha$ PKC $\lambda/\zeta$ ). La activación de estas enzimas es necesaria para la traslocación de

GLUT4 hacia la superficie celular (45). AKT actúa en más de 35 sustratos que participan en diversos procesos metabólicos y mitogénicos. De éstos, la proteína activadora de GTPasas Rab sustrato de AKT de 160 kD (AS160) participa en la traslocación de GLUT4 hacia la superficie celular. Al ser fosforilado por AKT, AS160 se inactiva produciendo una permanencia del estado activado de Rab y la consecuente promoción de la incorporación de glucosa (46).

La segunda vía de señalización que participa en la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular comienza con el reclutamiento de Cbl y la proteína adaptadora CAP hacia el receptor de insulina por APS. Una vez que Cbl es fosforilada en residuos de tirosina por RI, puede reclutar a la proteína adaptadora CrkII y al factor intercambiador de nucleótidos de guanina C3G hacia las balsas lipídicas de la membrana celular, donde se encuentra TC10. C3G activa a TC10, la que es capaz de modificar el citoesqueleto de actina y así incidir positivamente en el aumento de la captación de glucosa, tras estímulos de insulina (47).

A pesar de que el  $\text{Ca}^{+2}$  posee un papel fundamental en regular la función de los cardiomiocitos, aún no se ha establecido si este ión participa en las acciones metabólicas de insulina en el corazón. Trabajo previo de nuestro Laboratorio ha mostrado que insulina aumenta la captación de glucosa en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata a través de un mecanismo independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Además, el pretratamiento de los cardiomiocitos neonatos con los bloqueadores del canal L de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipino y del canal/receptor intracelular ryanodina no modificaron el efecto de insulina en la captación de glucosa. Por el contrario, el pretratamiento con inhibidores que impiden la señalización vía  $\text{IP}_3$ , disminuyó drásticamente la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos neonatos. Sin embargo, se desconoce el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero en la señalización del receptor de insulina orientado hacia la captación de glucosa en cardiomiocitos de rata adulta. A medida que el corazón madura experimenta una serie de cambios en su metabolismo, así en el corazón fetal la principal fuente de energía es la oxidación del lactato. Inmediatamente después del nacimiento la glicólisis es el principal medio de obtención de energía. Sin embargo esta preferencia de sustrato energético cambia rápidamente a la oxidación de los ácidos grasos a partir de la primera semana de vida. Los mecanismos

responsables de este cambio se deben a una combinación de eventos, incluyendo cambios en el suministro de sustratos energéticos para el corazón, cambios en el control hormonal del metabolismo energético y cambios subcelulares directos del miocardio (48). A pesar que bajo condiciones fisiológicas los ácidos grasos son la principal fuente de energía para el corazón adulto, un 30% del total de ATP de este tejido es generado a partir de glucosa y lactato, siendo la glucosa un sustrato energético de suma importancia en varios estados patológicos (49). Por estos motivos se propone en esta memoria de título explorar la siguiente hipótesis:

## **7 HIPÓTESIS**

Insulina estimula la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la superficie celular del cardiomiocito de rata adulta por un mecanismo dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

## **8 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero en la captación de glucosa inducida por insulina.

## **9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar la señalización del receptor de insulina orientada al transporte de glucosa en cardiomiocitos de rata adulta.
2. Caracterizar la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos de rata adulta.
3. Determinar el mecanismo mediante el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  participa en el transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos de rata adulta.

## 10 MATERIALES Y MÉTODOS

### 10.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): , medio M199, SDS, EDTA, EGTA,  $\text{NaVO}_4$ , PMSF, glicerol, DTT, Tween-20, ácido pirúvico, reactivo de Folin Ciocalteau, Butano 2,4 dionamonoxima, anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina. De Merck (Darmstadt, Alemania) se obtuvieron: NaOH, HCl,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , tatrato dipotásico, NaF, pirofosfato de sodio, Tritón X-100,  $\text{MgCl}_2$ , 2-propanol, formaldehído 37%. De Amresco (Solo, OH, EEUU): NaCl, leupeptina, aprotinina, HEPES sal sódica, Tris base, acrilamida, bisacrilamida, CsCl. De Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) se adquirieron: medio RPMI 1640 11879-020, laminina 23017-015. De Molecular Probes (actualmente subsidiaria de Invitrogen) se obtuvo BAPTA-AM. De Winkler (Santiago, Chile) se obtuvieron: KCl, 2-mercaptoetanol, TEMED, BSA, sacarosa. De Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU) se adquirieron: AKT Inhibitor VIII, anti-IgG conejo, anti-IgG ratón, ionomicina 407950, 2-desoxi-D-glucosa 25972, citocalasina b 250233. De PerKinElmer Life Sciences (Boston, EEUU) se adquirieron: 2-[1,2- $^3\text{H}$ ]-desoxi-D-glucosa NET549250UC y western Lightning. Los anticuerpos anti p-AKT, p-RI, p-Erk y AKT se adquirieron a Cell Signaling. La xestospongina C fue gentilmente donada por Jordi Molgó PhD. Otros reactivos: Colagenasa A 11088793001 (Roche), anticuerpo anti ERK (Santa Cruz, Chile), Ryanodina 630-062-M001 (Alexis Biochemicals), 2-APB 1224 (TOCRIS), insulina humana (Novo Nordisk), Ecoscint (Fermelo Biotec), ketamina 10% (Agroland), xilacina 2% (Cetrovert) y reactivo de Bradford (BioRad, EEUU).

### 10.2 Cardiomiocitos adultos

Los cardiomiocitos se obtuvieron a partir de ratas adultas macho Sprague-Dawley de entre 200 a 300 g de peso corporal. Previo a la operación, las ratas fueron profundamente anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de 300 $\mu\text{L}$  de una solución de ketamina: xilacina=2:1. El corazón fue rápidamente escindido y depositado en medio Gerard frío (4°C). La

arteria aorta fue canulada y ligada firmemente al sistema de perfusión con bomba peristáltica. Luego se procedió a la perfusión del corazón (4 ml/min) con tres soluciones a 37° C en buffer Gerard con: calcio (2,6mM) hasta que el corazón expulse visiblemente toda la sangre contenida ( $\approx$ 1 min), después EGTA (2,5 mM) hasta que deje de contraerse ( $\approx$ 1 min) y finalmente por 30 min con la solución de digestión: 50-65 mg de Colagenasa tipo A en 50 ml de Gerard, suplementado con 500  $\mu$ L de 5mM BDM (Butano 2,4 dionamonoxima, desacoplador del sistema de contracción celular). El corazón digerido se desmontó, se cortó longitudinalmente, y se disgregó mecánicamente en campana de flujo laminar. Luego el tejido digerido y disgregado se depositó en un frasco Falcon de 100 ml con 15 ml de solución de digestión en un baño termostático a 37°C con agitación permanente por 10 min. En campana, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de 15 ml. El que se centrifugó a 500 rpm por 2 min. El pellet celular fue resuspendido suavemente en buffer Gerard suplementado con 5mM BDM. Esta suspensión celular se sembró en placas de cultivo pre tratadas con Laminina (5 $\mu$ g/ml). Luego de 15 a 20 minutos de anclaje e inhibición del sistema contráctil el sobrenadante se eliminó y se cambio por M199/HEPES/Ca+2 2mM suplementado con BDM.

### **10.3 Obtención de extractos proteicos de células**

Una vez finalizado el período de estimulación, los cardiomiocitos se lisaron en 100  $\mu$ L de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato de Na, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl y 1 mM PMSF), que contenía 10% v/v glicerol, 1  $\mu$ g/mL leupeptina, 1  $\mu$ g/mL aprotinina y 1% v/v Tritón X-100. Luego las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 10 min 4 °C y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Las fracciones solubles se mezclaron con 0,33 volúmenes de tampón desnaturante 4x (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 32% v/v glicerol, 20% 2-mercaptoetanol, 9,2% SDS, 0,02% azul de bromofenol) y se incubaron por 5 min a 95°C para el posterior análisis por Western blot.

## **10.4 Determinación de proteínas**

### **10.4.1 Método de Lowry**

Se utilizó una variante del micrométodo de Lowry en presencia de detergentes (50). Brevemente, se preparó el reactivo A mezclando partes iguales de una solución de cobre-tartrato-carbonato [preparado por mezcla de 50 mL de 0,2% p/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0,4% p/v tartrato dipotásico con 50 mL de 20% p/v  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ], 10% SDS y 0,8N NaOH; y el reactivo B diluyendo 1 volumen del reactivo de Folin Ciocalteu con 5 volúmenes de agua nanopura. En un tubo Eppendorf se mezcló 5  $\mu\text{L}$  de muestra de proteínas con 400  $\mu\text{L}$  de agua nanopura, 400  $\mu\text{L}$  de reactivo A y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo B. se incubó a 40°C por 30 min y la absorbancia se determinó a 750 nm. Como estándar de proteínas se utilizó BSA.

### **10.4.2 Método de Bradford**

Se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Bio-Rad protein assay) y 795  $\mu\text{L}$  de agua. Las muestras se leyeron a 595 nm. Como estándar para realizar la curva de calibración se utilizó BSA (51).

## **10.5 Análisis de Western blot**

En todos los Western blots, las proteínas se resolvieron en geles en gradiente de poliacrilamida entre 5 al 12% p/v con SDS. El resto de las electroforesis de proteínas se realizaron en geles al 12% p/v de poliacrilamida-SDS. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  a voltaje constante (100 V por 1,5 h). Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 3% p/v en TBS-T (25 mM Tris pH 7,4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1% v/v Tween-20) por 1 h y se incubaron con el primer anticuerpo (anti-p-AKT 1:1.000; anti AKT 1:1.000,  $\beta$ -actina 1:1.000). Luego de lavar las membranas, se incuban con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo o ratón, conjugado a peroxidasa de rabanita, para ambos anticuerpos secundarios se usó la dilución 1:5.000. La unión específica se detectó mediante quimioluminiscencia (ECL), utilizando película BioMax MR.

## 10.6 Captación de glucosa

El ensayo de captación de glucosa se realizó por triplicado en placas de 12 pocillos pretratadas con laminina y sembradas con cardiomiocitos adultos. Los cardiomiocitos adultos se lavaron dos veces con el medio de cultivo libre de glucosa RPMI 1640. Después se estimuló a las células por 40 min con insulina 1, 10 o 100 nM, dependiendo del experimento, conservando el medio sin glucosa. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de la solución de transporte, ésta consiste en 130  $\mu\text{L}$  de medio libre de glucosa, 15  $\mu\text{L}$  de una solución 100 nM de 2-deoxiglucosa y 5  $\mu\text{L}$  de [ $^3\text{H}$ ]-2-deoxiglucosa 1-  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ . Después de 30 min el medio fue aspirado y las células lavadas 2 veces con PBS frío. Finalmente las células fueron lisadas con 500  $\mu\text{L}$  de una solución 1N de NaOH durante 20 min a 37°C. De los 500  $\mu\text{L}$  finales, una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  se llevó a medir a la cámara de centelleo y lo restante se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas de cada pocillo. Los inhibidores se incubaron 30 min previo al estímulo de insulina.

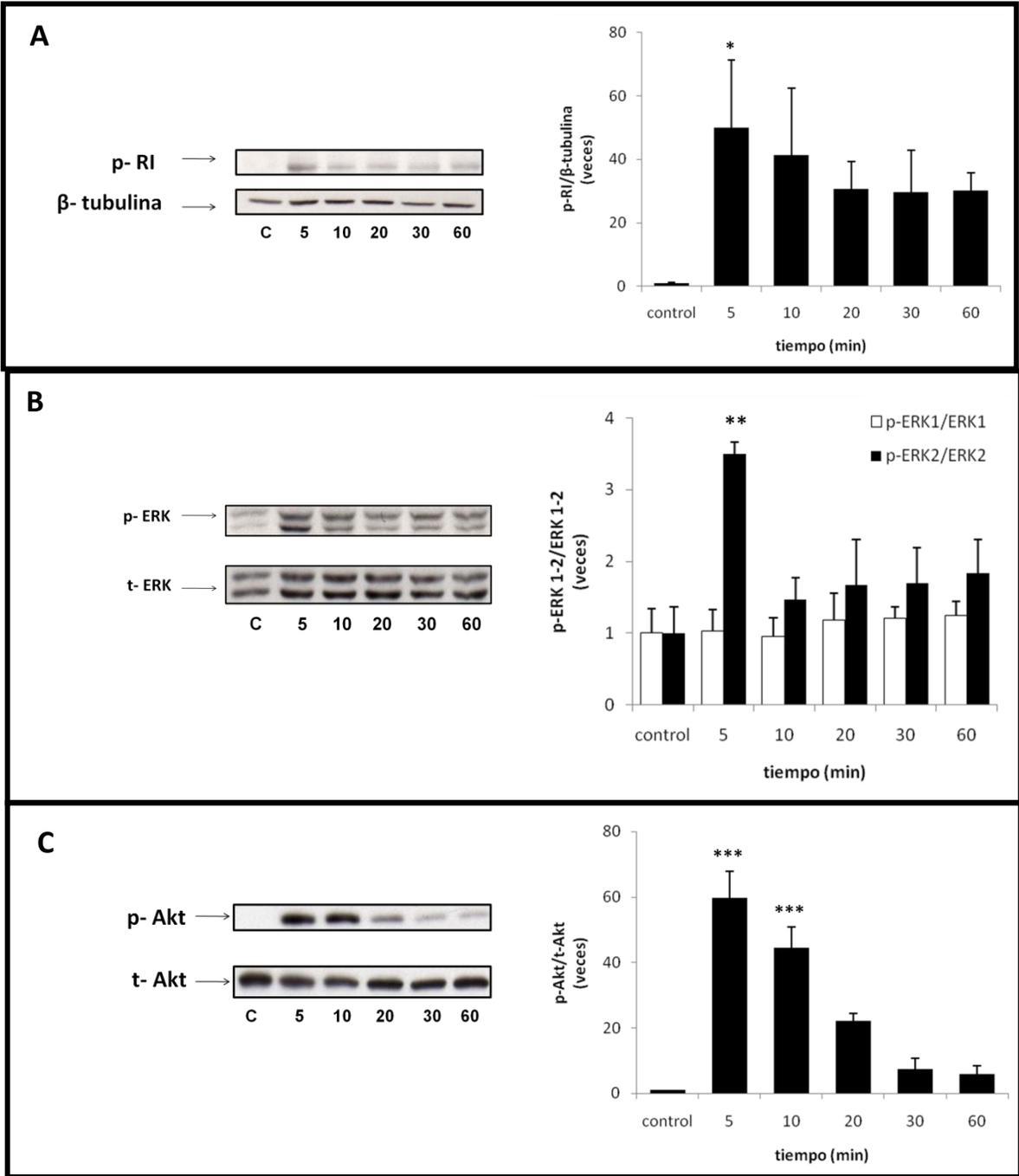
## 10.7 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SEM (Western blots) o SD (captación de glucosa) de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA y la prueba Tuckey o Dunnet para determinar la significancia estadística de los resultados. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0,05$ .

## 11 RESULTADOS

### 11.1 Activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta

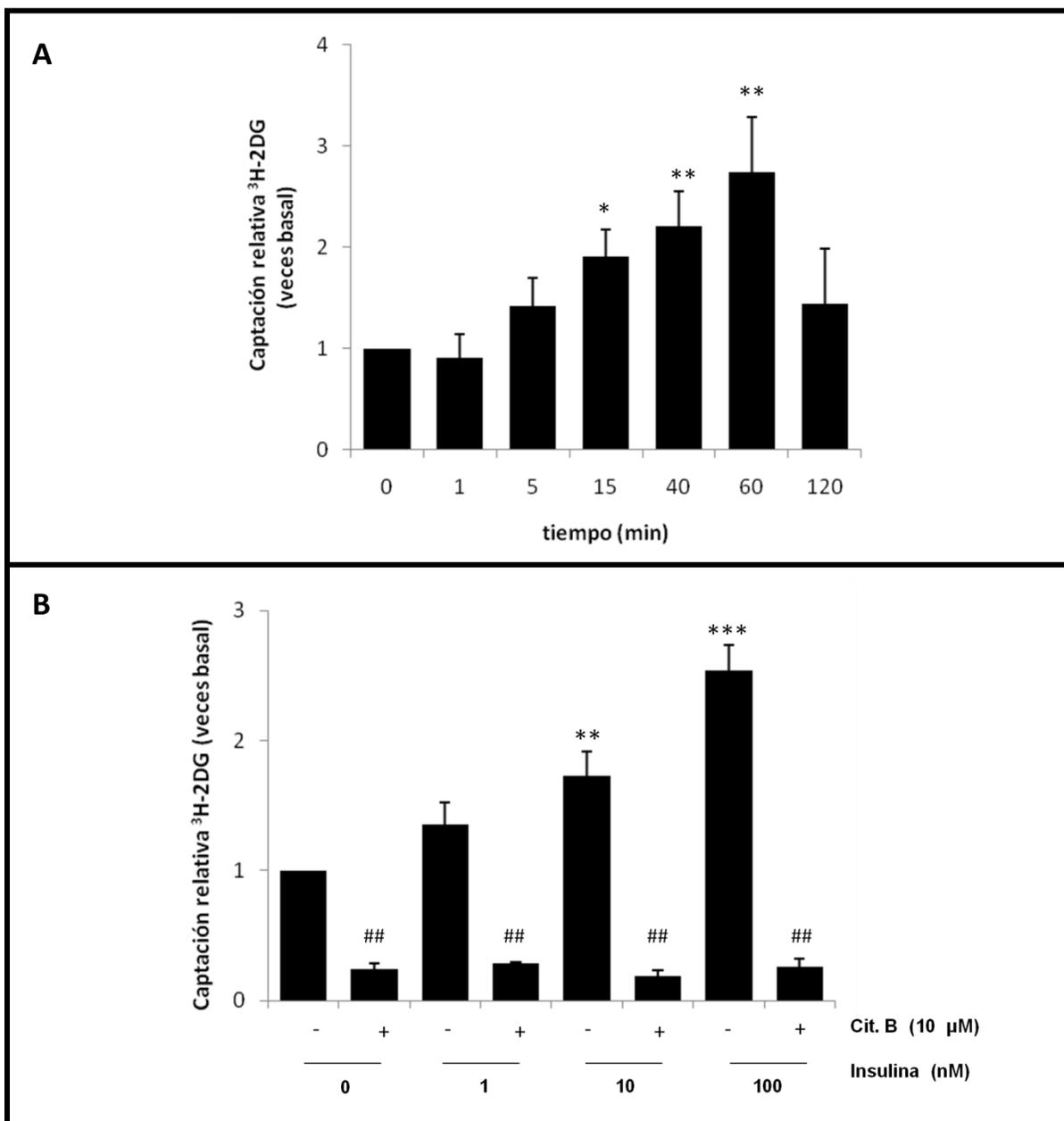
A fin de determinar la funcionalidad de la vía de señalización de insulina en los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata adulta se investigó si insulina activa al RI y a dos de las proteínas kinasas involucradas en las vías transduccionales canónicas activadas por este receptor, ERK 1/2 y AKT. Con este objetivo los cardiomiocitos se expusieron 5, 10, 20, 30 y 60 min a insulina (100 nM) y se prepararon extractos proteicos totales en la forma indicada en Materiales y Métodos. Luego se determinaron las formas fosforiladas y totales de cada proteína en estos extractos mediante Western blot. Los resultados indican que insulina estimula su fosforilación de su receptor desde los 5 hasta los 60 min post-estimulación. Sin embargo, la máxima activación se observa a los 5 min de estímulo, con un aumento de  $50 \pm 21$  veces sobre el control (Figura 1A). En el caso de la activación de las proteínas kinasas reguladas extracelularmente ERK1/2, los resultados indican que insulina produjo una activación diferencial de las distintas isoformas de la proteína. Así, la fosforilación de ERK1 no varía con respecto al control, mientras que la fosforilación de ERK2 aumenta significativamente en  $3,5 \pm 0,2$  veces sobre el control, a los 5 min post estímulo (Figura 1B). Finalmente la activación de AKT, condición fundamental para la estimulación de la captación de glucosa por insulina, se determinó a los tiempos de estímulo mencionados anteriormente. Los resultados muestran que su fosforilación aumenta significativamente a los 5 y 10 min post estímulo con insulina, mientras que a tiempos mayores disminuye progresivamente. La activación máxima de AKT fue de  $60 \pm 8$  veces sobre el control a los 5 min de estímulo con insulina (Figura 1C).



**Figura 1. Efecto de insulina en la activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Cardiomiocitos se estimularon con insulina 100 nM a los tiempos indicados. **(A)** Efecto de insulina sobre la fosforilación del RI. El máximo efecto de  $50 \pm 21$  veces sobre el control, se logró a los 5 min de estimulación. **(B)** Efecto de insulina sobre la fosforilación de ERK1/2. El máximo efecto para ERK2 de  $3,5 \pm 0,7$ , veces sobre el control, se logró a los 5 min de estimulación. **(C)** Efecto de insulina sobre la fosforilación de AKT. El máximo efecto de  $60 \pm 8$ , veces sobre el control, se logró a los 5 min de estimulación. Cada figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs control.

## 11.2 Insulina aumenta el transporte de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta

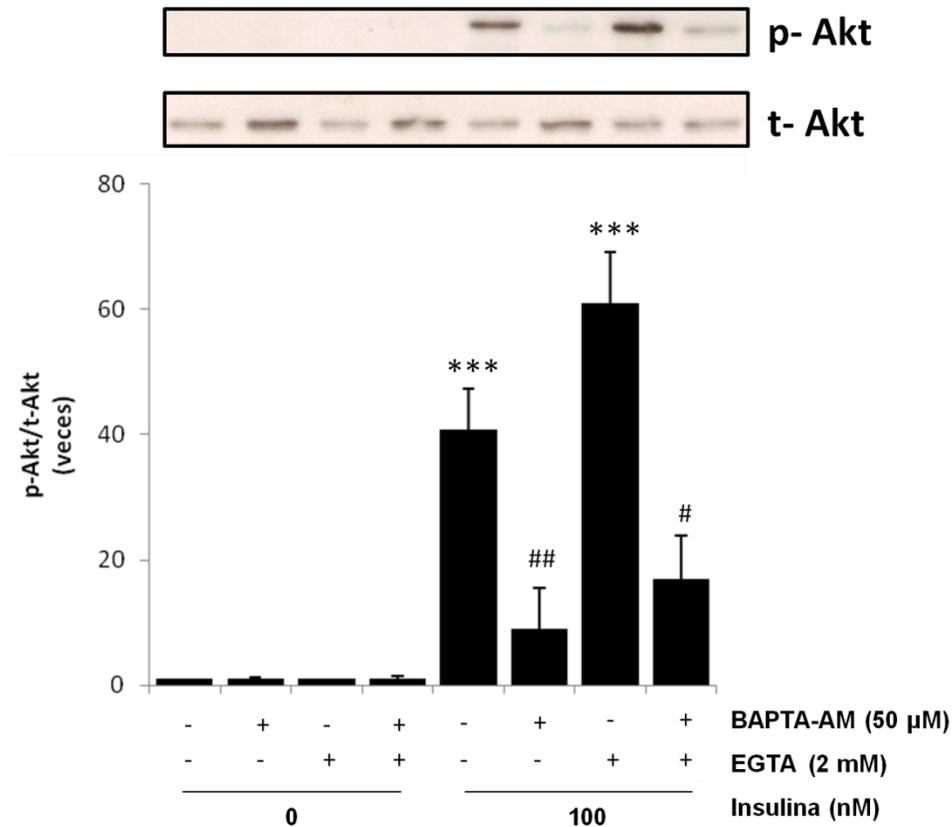
Se conoce ampliamente que una de las principales acciones de insulina es promover la incorporación de glucosa en los tejidos sensibles a esta hormona, como los músculos esquelético y cardíaco y el tejido adiposo. Por lo tanto el objetivo de estos experimentos fue caracterizar la incorporación del derivado tritiado de glucosa,  $^3\text{H}$ -2DG, estimulada por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta. Para ello las células se expusieron a distintos tiempos de estímulo (1, 5, 15, 40, 60 min y 2 h) con insulina a una concentración constante (100 nM) o a un tiempo constante de estímulo (40 min) a distintas concentraciones de insulina (1, 10 y 100 nM), con el fin de determinar el tiempo y concentración necesarios para aumentar significativamente la incorporación de glucosa en cardiomiocitos adultos aislados. Los resultados indican que insulina 100 nM aumenta significativamente la incorporación de glucosa a los 15, 40 y 60 min de estímulo, siendo el máximo aumento de  $2,7 \pm 0,5$  veces sobre el basal, a los 60 min post estimulación (Figura 2A). Por otro lado, la incorporación de glucosa aumenta de manera proporcional al incremento en las concentraciones de insulina, siendo el máximo aumento de  $2,5 \pm 0,3$  veces sobre el basal, cuando se utilizó insulina 100 nM. Además los resultados indican que citocalasina B, un inhibidor no selectivo de la captación de glucosa, redujo drásticamente la incorporación de glucosa en cardiomiocitos en condiciones basales y en condiciones de estimulación con insulina en todas las concentraciones utilizadas, confirmando que el efecto es a través de los transportadores de glucosa GLUT (Figura 2B).



**Figura 2. Efecto de insulina en la captación de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** El ensayo de pulso y caza de  $^3\text{H-2DG}$  se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. **(A)** Aumento en la captación de glucosa por estímulos de insulina (100 nM) a los tiempos indicados. **(B)** Estímulo de insulina por 40 min aumenta el transporte de glucosa de una manera concentración dependiente. Citocalasina B (10  $\mu\text{M}$ ) inhibe el transporte de glucosa a través de GLUTs. Cada figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*\* $p < 0.001$  \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs basal, ## $p < 0.001$  vs insulina.

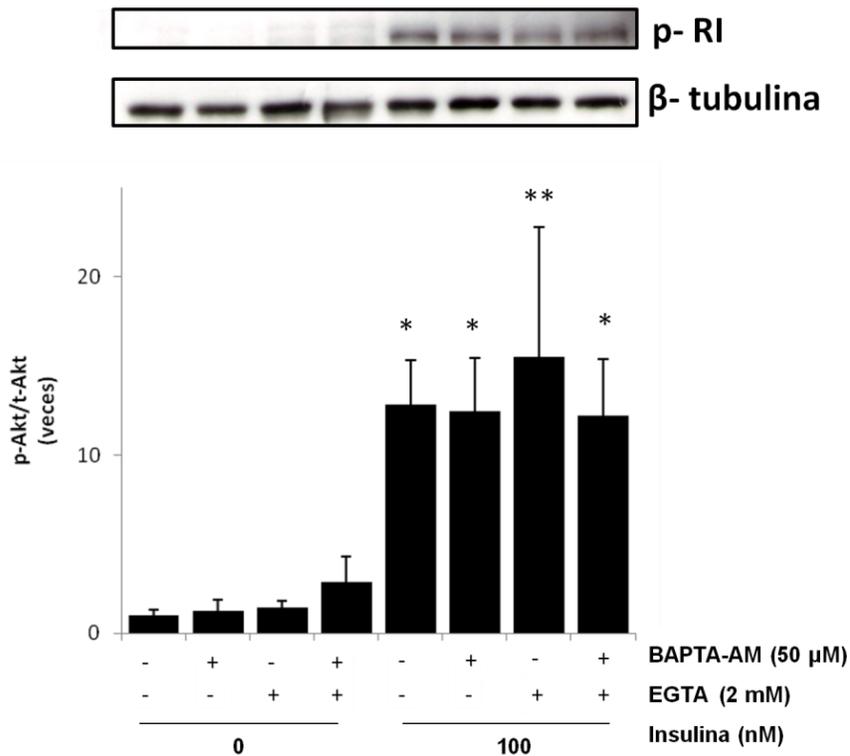
### **11.3 Participación del $\text{Ca}^{+2}$ extracelular e intracelular en la fosforilación de AKT estimulada por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta**

Como mencionamos anteriormente, la proteína AKT es un nodo crítico en la señalización de insulina y su activación es fundamental para promover el transporte de glucosa en cardiomiocitos (50). En este contexto es interesante estudiar la participación del calcio extracelular e intracelular en la fosforilación de AKT inducida por insulina. Para ello cardiomiocitos se preincubaron con el quelante de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular EGTA (2 mM) y/o el quelante intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  BAPTA-AM (100 y 50  $\mu\text{M}$ ). Luego, las células se estimularon con insulina (100 nM) durante 5 min y se prepararon extractos proteicos totales en la forma indicada en Materiales y Métodos. Después se determinaron los niveles de las formas fosforiladas y totales de AKT en estos extractos mediante Western blot. Los resultados muestran que insulina incrementa la fosforilación de AKT en el aminoácido Ser473 en cardiomiocitos mantenidos en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (EGTA), mientras que el pretratamiento con BAPTA-AM (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) disminuye drásticamente el efecto de insulina en la fosforilación de AKT. Es interesante notar que, a pesar de que ambas concentraciones de BAPTA-AM disminuyeron significativamente la fosforilación de AKT, hubo una fosforilación remanente de la proteína. Este resultado sugiere que la activación de AKT depende no sólo de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, sino que también de su concentración (Figura 3).



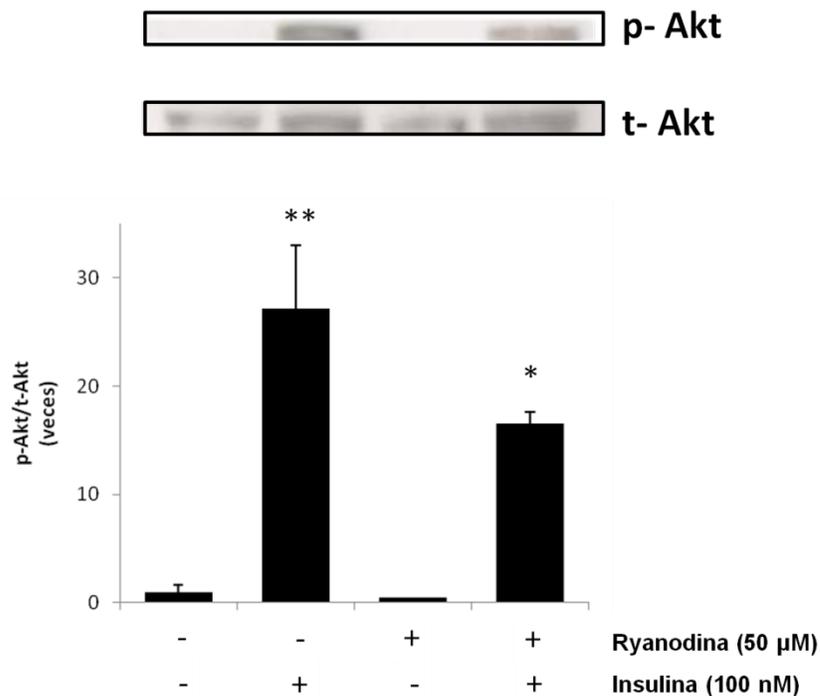
**Figura 3. La fosforilación de AKT inducida por insulina depende del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Cardiomiocitos preincubados con EGTA y/o BAPTA-AM se estimularon con insulina 100 nM por 5 min. Luego se prepararon extractos celulares y se analizó la fosforilación de AKT por Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. BAPTA-AM inhibió significativamente la fosforilación de AKT estimulada por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*\* $p < 0.001$  vs control; ## $p < 0,01$  y # $p < 0,05$  vs insulina.

Para verificar que la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extra e intracelular no afecta la funcionalidad de la señalización de insulina río arriba de la proteína AKT, se determinó la fosforilación del RI en cardiomiocitos pretratados con EGTA (2 mM) y/o BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) y posteriormente estimulados con insulina (100 nM) por 5 min. El análisis por Western blot reveló que la fosforilación del RI no se afectó por la presencia de los quelantes de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 4).

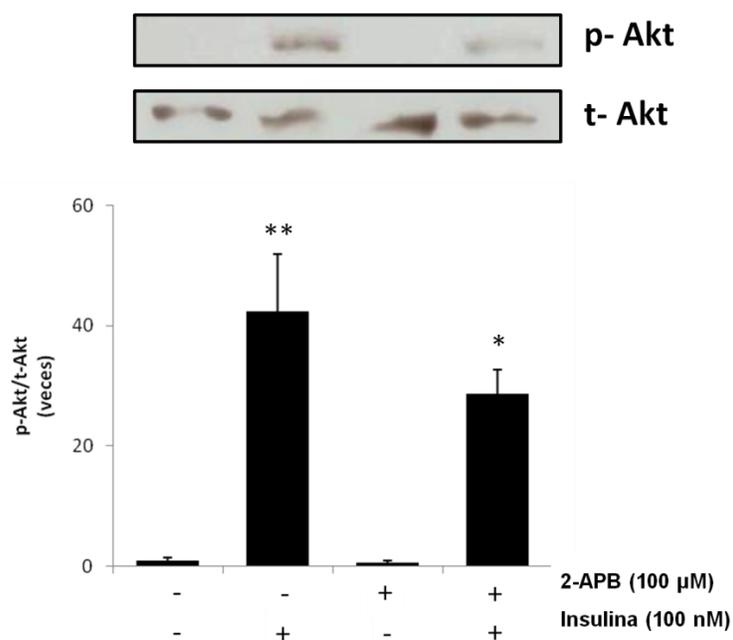


**Figura 4. La fosforilación del RI inducida por insulina es independiente del  $\text{Ca}^{2+}$  extra e intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Células preincubadas con EGTA y/o BAPTA-AM se estimularon con insulina 100 nM por 5 min. Luego se prepararon extractos celulares y se analizó la fosforilación del RI por Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. La fosforilación del RI no se afectó por la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extra e intracelular. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs control.

Para evaluar el componente de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular involucrado en la fosforilación de AKT inducida por insulina, cardiomiocitos se pretrataron con el bloqueador del canal/receptor intracelular Ryanodina (50  $\mu\text{M}$ ) o con el inhibidor del receptor de  $\text{IP}_3$  (IP<sub>3</sub>R), 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ). Luego, las células se estimularon con insulina (100 nM) durante 5 min y se prepararon extractos proteicos totales en la forma indicada en Materiales y Métodos. Después mediante Western blots se determinaron los niveles de AKT fosforiladas y totales en estos extractos. El uso de ambos inhibidores arrojó resultados muy similares. Se observa que el aumento en la fosforilación de AKT, inducida por insulina, tiende a disminuir en presencia de los inhibidores, sin embargo no es una disminución significativa (Figuras 5-6).



**Figura 5. Efecto de Ryanodina en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Las células se estimularon con insulina 100 nM por 5 min en medio con  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego se prepararon extractos celulares y se analizó la fosforilación de AKT por Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. El bloqueador del canal/receptor intracelular Ryanodina (50  $\mu\text{M}$ ) disminuye parcialmente la fosforilación de AKT inducida por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs control.

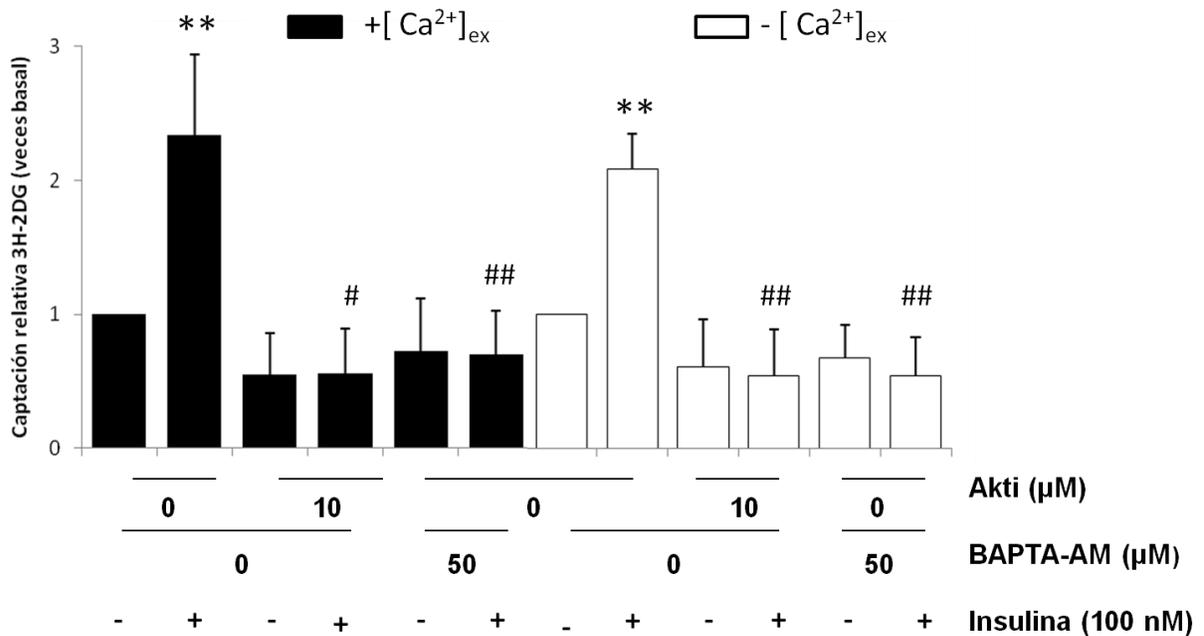


**Figura 6. Efecto de 2- APB en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Las células se estimularon con insulina 100 nM durante 5 min en medio con  $Ca^{2+}$ . Luego se prepararon extractos celulares y se analizó la fosforilación de AKT por Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. El inhibidor del IP3R, 2-APB (100 μM) disminuye parcialmente la fosforilación de AKT inducida por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs control.

#### 11.4 Participación del $Ca^{+2}$ extracelular e intracelular en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos de rata adulta

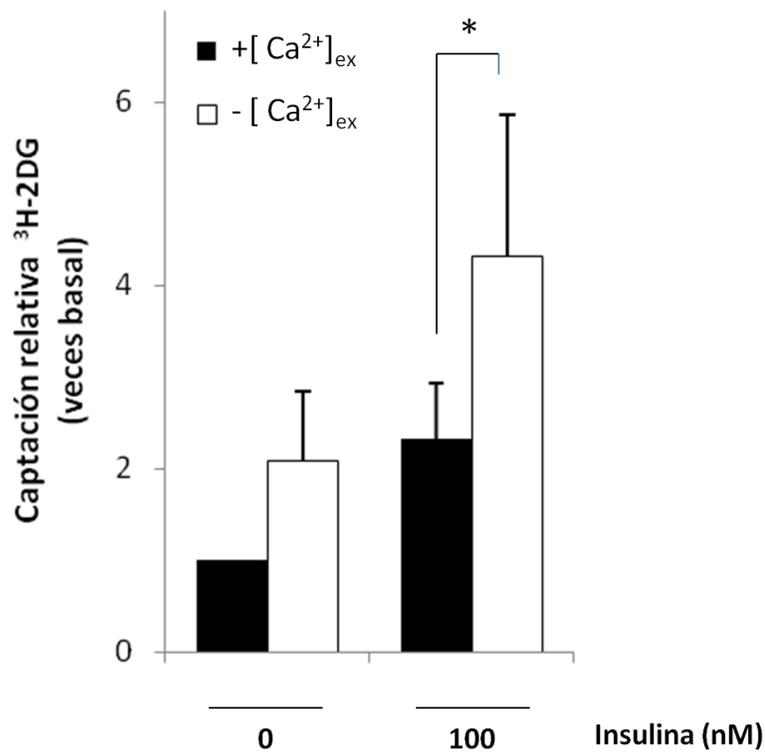
Tanto en adipocitos 3T3-L1 como en músculo esquelético se ha descrito que el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular juega un importante papel en la captación de glucosa inducida por insulina (51, 52). Sin embargo el mecanismo mediante el cual ocurre tal efecto permanece inexplorado. En el presente trabajo se estudió el efecto del  $Ca^{2+}$  en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos. La captación de  $[^3H]$ -2-desoxiglucosa aumentó significativamente en los cardiomiocitos adultos incubados en medio con  $Ca^{2+}$  y libre de  $Ca^{2+}$ . La captación de glucosa aumentó tras la estimulación con insulina, alcanzando valores de  $2,3 \pm 0,6$  y  $2,1 \pm 0,3$  veces respecto el basal de cada serie experimental en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$

extracelular, respectivamente (Figura 7). Sin embargo cuando se preincubó a las células con BAPTA-AM, el aumento en la incorporación de glucosa inducido por insulina fue inhibido significativamente (Figura 7). El inhibidor químico de AKT (Akti) disminuyó totalmente la incorporación de glucosa inducida por insulina (Figura 7), confirmando la importancia de la activación de esta vía de señalización en el transporte de glucosa inducido por insulina.



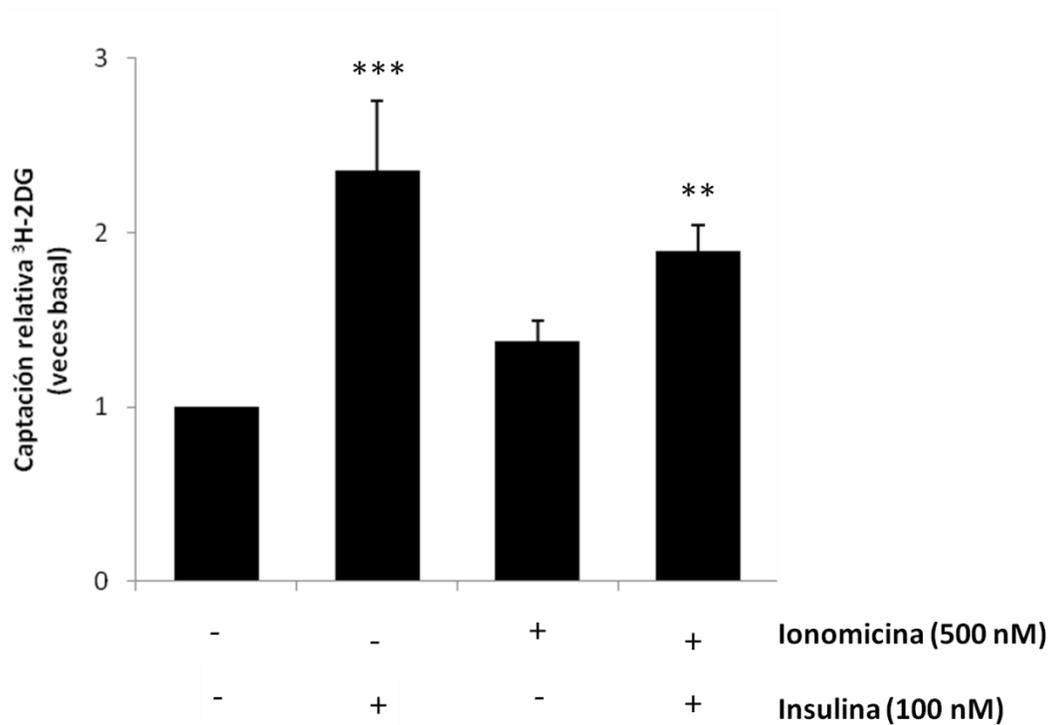
**Figura 7. La captación de glucosa inducida por insulina depende del Ca<sup>2+</sup> intracelular en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** El ensayo de pulso y caza de <sup>3</sup>H-2DG se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. Tanto BAPTA-AM (50 μM) como Akti (10 μM) inhiben significativamente la captación de glucosa inducida por insulina (100 nM), en un medio con Ca<sup>2+</sup> y libre de Ca<sup>2+</sup>. Cada figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*p<0,01 vs basal; ###p<0.001 y ##p<0.01 vs insulina.

Aunque la magnitud del aumento en la incorporación de glucosa inducida por insulina es muy semejante entre células mantenidas en un medio con o sin  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular; cuando se compara la incorporación de glucosa utilizando como referencia la captación basal de las células en medio con  $\text{Ca}^{+2}$ , se observa que ella siempre es mayor en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, siendo esta diferencia significativa en la condición de estímulo con insulina entre los cardiomiocitos mantenidos en medio con  $\text{Ca}^{2+}$  y libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 8).



**Figura 8. Efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** El ensayo de pulso y caza de  $^3\text{H}$ -2DG se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. Cardiomiocitos se preincubaron con o sin EGTA y luego se estimularon con insulina. Se observa que la captación de glucosa es mayor en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con  $*p < 0,05$  insulina con  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$  vs insulina sin  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ . Se utilizó el post-test Bonferroni para analizar pares de columnas de datos seleccionadas.

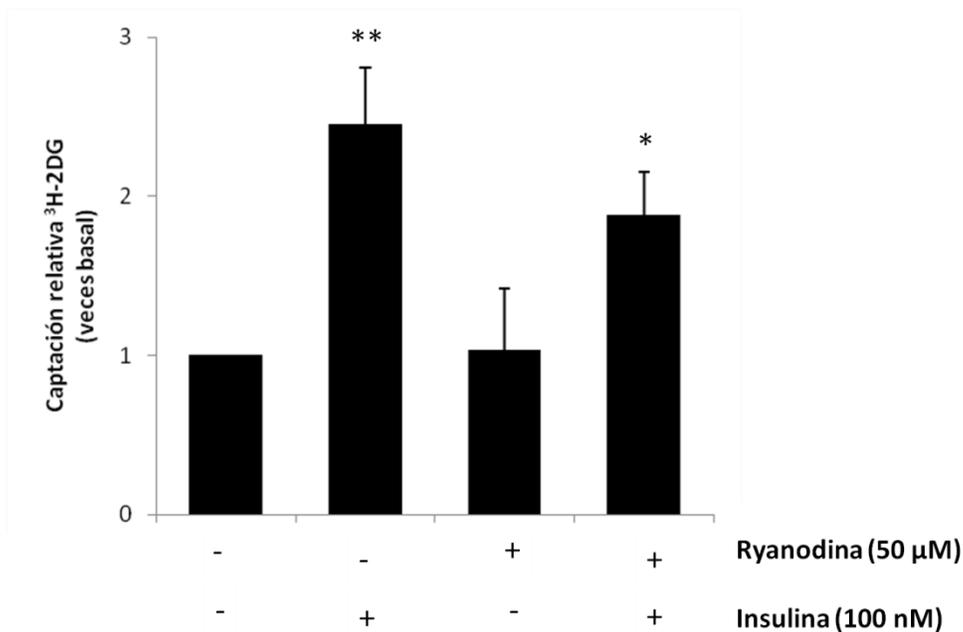
Si la ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular inhibe por completo la incorporación de glucosa, se hace interesante investigar si un aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al citoplasma modula el transporte de glucosa en los cardiomiocitos. Para este fin, las células se trataron con el ionóforo divalente de  $\text{Ca}^{+2}$  Ionomicina, durante los últimos 20 min de estímulo con insulina. Para luego proseguir con el ensayo de pulso y caza de  $^3\text{H}$ -2DG tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados indican que en los cardiomiocitos tratados sólo con Ionomicina no aumentó la captación de glucosa (Figura 9). Además se observa que cuando se utilizó ionomicina junto con el estímulo de insulina, la captación de glucosa disminuye levemente, sin ser esta disminución significativa (Figura 9).



**Figura 9. Efecto de Ionomicina en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Ionomicina (500 nM), ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuye levemente la captación de glucosa inducida por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*\* $p < 0,001$  vs basal; \*\* $p < 0,01$  vs basal.

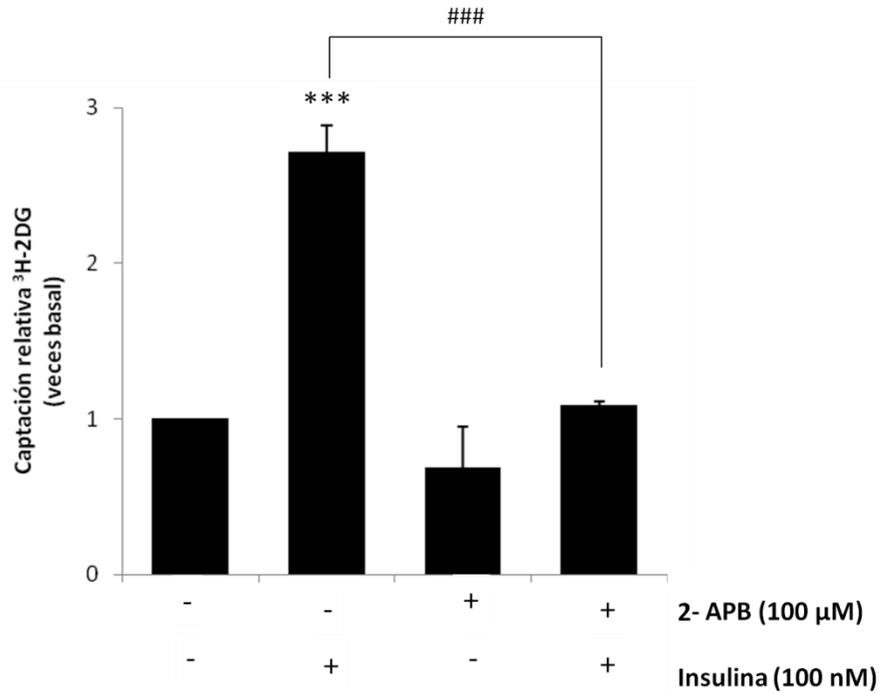
### 11.5 Participación de los reservorios intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta

Para determinar el componente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular involucrado en la captación de glucosa inducida por insulina, cardiomiocitos se pretrataron con el bloqueador del canal/receptor intracelular Ryanodina ( $50 \mu\text{M}$ ) o con el inhibidor del receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), 2-APB ( $50$  y  $100 \mu\text{M}$ ) y para después se prosiguió con el ensayo de pulso y caza de  $^3\text{H}$ -2DG tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados indican que el bloqueo del receptor de Ryanodina disminuye parcialmente la captación de glucosa inducida por insulina, sin ser esta disminución significativa (Figura 10).



**Figura 10. Efecto de Ryanodina en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Ryanodina ( $50 \mu\text{M}$ ) inhibe el RyR y disminuye parcialmente la captación de glucosa inducida por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con  $**p < 0,01$  y  $*p < 0,05$  vs basal.

Cuando los cardiomiocitos se pretrataron con el inhibidor del receptor de IP<sub>3</sub> 2-APB (50 y 100 μM), la incorporación de glucosa inducida por insulina fue totalmente inhibida. Estos resultados indican que el Ca<sup>+2</sup> proveniente de este reservorio intracelular tiene un papel fundamental en el transporte de glucosa estimulado por insulina en cardiomiocitos adultos (Figura 11).



**Figura 11. Efecto de 2-APB en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** 2-APB (100 μM), antagonista del IP<sub>3</sub>R disminuye significativamente la captación de glucosa inducida por insulina. La figura es representativa de 3 experimentos independientes con \*\*\*p<0,001 vs basal; ###p<0.001 vs insulina

## 12 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el papel del  $\text{Ca}^{+2}$  en el transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos de rata adulta. Los principales resultados fueron: a) Al quelar el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular con BAPTA-AM se observó que este ión participa en ciertas etapas de la señalización de insulina pues hubo una disminución significativa en la fosforilación de AKT inducida por insulina. Esta disminución en la fosforilación conduciría a efectos deletéreos en el proceso de translocación que gatilla la exocitosis del GLUT4. B) Además, la incorporación de glucosa disminuyó drásticamente al preincubar las células con el inhibidor de los procesos dependientes de  $\text{IP}_3$ , 2-APB. Estos datos sugieren una clara conexión entre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{IP}_3$  y el transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos adultos.

### 12.1 Activación de la vía de señalización canónica del receptor de insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta

La insulina regula el metabolismo del corazón mediante la modulación del transporte de glucosa, la glicólisis, síntesis de glicógeno, metabolismo de lípidos, síntesis proteica, el crecimiento, la contractilidad y la apoptosis de los cardiomiocitos (13, 55, 56). Numerosos estudios han mostrado que el deterioro de la señalización de insulina altera el metabolismo de glucosa y disminuye la eficiencia metabólica de los cardiomiocitos en un estado conocido como resistencia a la insulina (57). Estos antecedentes permiten dimensionar la importancia que posee insulina y su receptor en mantener la homeostasis energética en una gran variedad de organismos y modelos celulares.

Nuestros resultados mostraron que en cultivos de cardiomiocitos adultos aislados, el RI se encuentra presente y funcional ya que desde los 5 min de estímulo con insulina el receptor se activa, presentando un aumento significativo en su fosforilación respecto a la condición control, en concordancia con lo descrito en la literatura (58, 59). Una de las vías de señalización que diverge de la activación del RI es la cascada Ras-Raf-MEK-ERK, en la que también observamos una activación post estimulación con insulina. Interesantemente los resultados muestran una activación diferencial de las isoformas de ERK, siendo ERK2 la que se fosforila significativamente

a los 5 min post estímulo. La información que existe acerca de las posibles funciones específicas de las dos principales isoformas de ERK, ERK1 (p44) y ERK2 (p42), es relativamente escasa. Estas dos proteínas se coexpresan prácticamente en todos los tejidos, pero con una abundancia relativa muy variable, siendo ERK2 la isoforma predominante en el cerebro y las células hematopoyéticas (60). Teniendo en cuenta la gran identidad de aminoácidos entre las dos isoformas y su regulación espacio-temporal aparentemente similar, actualmente se les considera como proteínas con funciones intercambiables. Sin embargo, importante evidencia reciente sugiere que podría haber diferencias cuantitativas en la dinámica de ERK1 y ERK2 y que podrían tener un papel significativo en su regulación. Ratones carentes de ERK1 viven y se reproducen normalmente sin un aumento compensatorio evidente de ERK2 pero, muestran un déficit en la maduración de timocitos (61). En contraste, la ausencia de ERK2 en ratones conduce a la muerte embrionaria temprana como consecuencia de defectos placentarios, demostrando que ERK1 no compensa la ausencia de ERK2 en el embrión (62). Un estudio hecho en ratones adultos determinó que el contenido endógeno de ERK2 es superior al de ERK1 en corazones wild type. No obstante tanto la pérdida de un alelo para ERK2 ( $Erk2^{+/-}$ ) como la pérdida de ambos alelos para ERK1 ( $Erk1^{-/-}$ ) disminuyeron en forma similar la activación neta de ERK en el corazón (63). Sin embargo, las lesiones del miocardio después de ser sometido a estímulos de isquemia-reperfusión, revelaron que éstas eran significativamente mayores en ratones  $Erk2^{+/-}$  que en ratones wild type y  $Erk1^{-/-}$ , lo que sugiere que ERK 1 y 2 tienen distintas funciones y que la señalización por ERK2 sería necesaria para proteger el miocardio del daño por isquemia-reperfusión *in vivo* (63). Aunque en la determinación de la funcionalidad de la señalización del RI es de gran relevancia estudiar la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK, las acciones de esta cascada de señalización son más bien mitogénicas y de crecimiento pero, no se relacionan con las acciones metabólicas de insulina. Por el contrario, la activación de la vía PI3K/AKT, otra de las principales vías divergentes de la activación del RI, es fundamental en la regulación de las acciones metabólicas de esta hormona peptídica. Así, cuando células del músculo esquelético y adipocitos son preincubados con el inhibidor alostérico de AKT (Akti) tanto la fosforilación de AKT, como el aumento en la captación de glucosa inducidas por insulina son disminuidos significativamente (64). Nuestros resultados muestran un aumento en

la fosforilación de AKT en el aminoácido Ser473 a partir de los 5 min post estimulación con insulina, demostrando que esta vía de señalización se encuentra activa y funcional en nuestro modelo celular, tal como se describe en la literatura (65).

## **12.2 Insulina aumenta el transporte de glucosa en cardiomiocitos aislados de rata adulta**

Se sabe que una de las principales acciones de insulina es estimular y regular el metabolismo de glucosa en una serie de tejidos blanco. En las células sensibles a insulina, el paso limitante en la incorporación de glucosa es su transporte a través de la membrana plasmática (66). El músculo esquelético es el tejido de mayor utilización de glucosa post prandial y, por lo tanto, tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo de glucosa en todo el cuerpo (67). Aunque el tejido cardíaco no sea el sitio de mayor utilización de glucosa, estudios clínicos recientes han puesto de manifiesto que una sensibilidad reducida a insulina es un factor de riesgo para la mortalidad en individuos con insuficiencia cardíaca coronaria (68). El transporte de glucosa en el corazón comparte muchas similitudes con el que se produce en el músculo esquelético, y se sabe que está asociado a la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde reservorios intracelulares hacia las membranas del sarcolema y el sistema de túbulos transversales en el cardiomiocito (69). De la caracterización de la captación de glucosa en cultivos de cardiomiocitos adultos aislados se determinó que insulina aumenta significativamente la incorporación de glucosa a los 15, 40 y 60 min de estímulo, siendo el máximo aumento a los 60 min post estimulación (Figura 2A). Un estudio realizado utilizando microscopía “time-lapse” de fluorescencia confocal en músculo cuádriceps, llegó a la conclusión que la translocación de GLUT4 hacia el sarcolema y los túbulos transversales, en respuesta a insulina, se producía a nivel local desde “reservorios satélites” cercanos a la membrana plasmática, sin que los transportadores realizaran desplazamientos de largo alcance (70). Este mecanismo puede haber evolucionado como una adaptación al mayor tamaño de las células del músculo esquelético y del importante papel que cumple este tejido en el metabolismo de glucosa en el organismo. Por el contrario, un estudio realizado en cardiomiocitos adultos, utilizando GLUT4 unidos a un epítoto HA y fusionados con una proteína fluorescente verde, se observó que el proceso de internalización de los transportadores ocurrió en un período de más de 40 min, y

que éstos se relocalizaron en compartimentos perinucleares y no en “reservorios satélites” como lo observado en el músculo esquelético. Este hecho sugiere que los movimientos de GLUT4 son de largo alcance en cardiomiocitos (71). Nuestros resultados también indican que la incorporación de glucosa aumenta de manera proporcional al incremento en las concentraciones de insulina (72,73), siendo el máximo aumento cuando se utilizó insulina 100nM (Figura 2B). Finalmente de la caracterización de la captación de glucosa en cultivos de cardiomiocitos adultos aislados se estableció que 1) En nuestro modelo insulina, además de promover la activación de su señalización en etapas tempranas, estimula el transporte de glucosa de una manera tiempo y concentración dependiente y 2) el tiempo de estímulo por 40 min y la concentración 100 nM de insulina, son las condiciones óptimas para la realización de las captaciones de glucosa bajo las condiciones de nuestro cultivo.

### **12.3 Participación del $Ca^{2+}$ en la activación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta**

El  $Ca^{+2}$  es un segundo mensajero involucrado en diversas vías transduccionales. Varios estudios han indicado que el  $Ca^{+2}$  intracelular estaría implicado en la señalización de insulina (74-76), sin embargo, la participación de este ión en la acción de insulina ha sido ampliamente cuestionada (77). En el presente trabajo se demostró que insulina incrementa la fosforilación de AKT en el aminoácido Ser473 en cardiomiocitos adultos mantenidos en medio con  $Ca^{+2}$  o libre de  $Ca^{+2}$ , sugiriendo que el efecto de insulina no dependería de un influjo de  $Ca^{+2}$  desde el medio extracelular, tal como se describe en cardiomiocitos neonatos (78). Sin embargo, la depleción del  $Ca^{+2}$  intracelular, utilizando BAPTA-AM, disminuyó significativamente la fosforilación de AKT estimulada por insulina, hecho también reportado en adipocitos (53, 79) y en cardiomiocitos neonatos (78). Además nuestros resultados indican, que la ausencia de  $Ca^{+2}$  extra e intracelular no afecta la funcionalidad de la señalización de insulina río arriba de la proteína AKT, ya que la fosforilación de RI no se afectó por la presencia de los quelantes de  $Ca^{+2}$  EGTA y BAPTA-AM. En concordancia con estos hallazgos, Worrall y Olefsky (79) mostraron que la depleción de  $Ca^{+2}$  intracelular por BAPTA-AM no tiene efectos inhibitorios en las etapas tempranas de la señalización de insulina, como la autofosforilación de RI, fosforilación de IRS1 y activación de

PI3K y, que por el contrario, etapas más distales de la señalización se vieron drásticamente afectadas, como es el caso de AKT. Los principales reservorios de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, se encuentran localizados en el retículo sarcoplásmico, donde su liberación es controlada por los receptores de Ryanodina (RyR) o por los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Tanto el bloqueo del RyR con Ryanodina o la inhibición de  $\text{IP}_3\text{R}$  con 2-APB produjeron una tendencia a la disminución de la fosforilación de AKT inducida por insulina. Sin embargo, nuestros datos preliminares muestran una disminución de aproximadamente el 50% en la fosforilación de AKT estimulada por insulina, cuando se preincuba a los cardiomiocitos con Xestospongina C, un inhibidor de alta selectividad del  $\text{IP}_3\text{R}$  (figura suplementaria). Los cardiomiocitos ventriculares de mamíferos se caracterizan por presentar un amplio sistema de túbulos transversales (TT). Los TT son invaginaciones físicas (de 100 a 300 nm de diámetro) que se producen a intervalos regulares (cada 1,2 micras a lo largo de la línea Z) y alcanzan niveles profundos en los cardiomiocitos. El sistema de TT permite que cada una de las células cardíacas desencadene la liberación, casi sincrónica, de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el retículo sarcoplásmico (RS) en respuesta a la despolarización (80). El RS es un extenso sistema de membranas intracelulares que rodea a cada miofibrilla, a manera de una cisterna llena de  $\text{Ca}^{+2}$ . Cada miofibrilla se divide en estructuras sarcoméricas y el RS también se divide en compartimentos especializados. Cada segmento de RS inicia y termina en una cisterna terminal, que junto con el túbulo T conforman las estructuras denominadas como díadas o RS de unión (JRS). Las regiones del RS que no se encuentran en la cercanía de los túbulos T, se conocen como RS longitudinal (LRS) y está constituido por membranas tubulares ramificadas en el interior de la célula (81). Tanto el RyR como el  $\text{IP}_3\text{R}$  se encuentran en el RS, pero no colocalizan (82). Los RyRs se disponen en “racimos” de receptores y se encuentran principalmente en el JRS donde participarán en el proceso de acoplamiento excitación-contracción cardíaco (83). Esta singular arquitectura del sistema de liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde los reservorios intracelulares, hace que el concepto de espacialidad y temporalidad de la señalización de  $\text{Ca}^{+2}$  sea de especial relevancia en los cardiomiocitos adultos. Por lo tanto, a partir de estos antecedentes, la información obtenida al utilizar los inhibidores de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  de los reservorios intracelulares (Ry, 2-APB y Xesto) permiten sugerir que el  $\text{Ca}^{+2}$  liberado del RS, mediado por el RyR y por el  $\text{IP}_3\text{R}$ , participarían en conjunto en la modulación

de la activación, inducida por insulina, de las poblaciones de AKT localizadas en distintos compartimentos del cardiomiocito adulto; a diferencia de lo observado en cardiomiocitos neonatos (células que no poseen TT), donde la inhibición del IP<sub>3</sub>R es suficiente para impedir la fosforilación de AKT inducida por insulina (78). Finalmente será necesario determinar a futuro, si la inhibición del RyR y del IP<sub>3</sub>R, pueden en conjunto alcanzar la disminución en la fosforilación de AKT inducida por insulina observada al depletar el Ca<sup>+2</sup> intracelular con BAPTA-AM.

#### **12.4 Participación del Ca<sup>2+</sup> en el transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta**

En el presente trabajo se mostró que insulina aumenta el transporte de glucosa en cardiomiocitos adultos mantenidos en medio con Ca<sup>+2</sup> o libre de Ca<sup>+2</sup>, sugiriendo que el efecto de insulina es independiente de un influjo de Ca<sup>+2</sup> desde el medio extracelular. En concordancia con este resultado, un estudio realizado en corazones de rata aislados mostró que el Ca<sup>+2</sup> extracelular no es un regulador importante en la captación de glucosa (84). Sin embargo, en desacuerdo con lo que se especula en este estudio, la depleción del Ca<sup>+2</sup> intracelular en cardiomiocitos adultos utilizando BAPTA-AM, disminuyó significativamente la incorporación de glucosa estimulada por insulina. Aunque numerosos estudios han examinado el papel del Ca<sup>+2</sup> en el transporte de glucosa estimulado por insulina, existe poco consenso acerca de su papel general en este proceso. Investigaciones realizadas en células L6 diferenciadas a miotubos, adipocitos y músculo esquelético (53, 54, 85) no lograron encontrar una relación clara entre el Ca<sup>+2</sup> y el metabolismo de glucosa. En contraste la reducción del Ca<sup>+2</sup> intracelular utilizando BAPTA-AM disminuyó significativamente la captación de glucosa estimulada por insulina en adipocitos 3T3-L1 y en cardiomiocitos neonatos, en concordancia a lo observado en nuestro modelo celular (53, 78). A pesar que el incremento en la incorporación de glucosa estimulada por insulina se produce independiente de la presencia de Ca<sup>+2</sup> extracelular observamos que la captación, en condiciones basales y en condiciones de estímulo con insulina, es mayor en ausencia de Ca<sup>+2</sup> en el medio extracelular. Estos resultados hacen razonable especular que en el proceso de reciclaje continuo que sufre GLUT4, entre la membrana plasmática y sus reservorios intracelulares, el Ca<sup>+2</sup> extracelular no estaría involucrado en procesos de exocitosis pero, si

podría regular la endocitosis del transportador. Así, la depleción del  $\text{Ca}^{+2}$  del medio extracelular podría disminuir la endocitosis de GLUT4 desde la membrana plasmática, lo que explicaría el aumento de la incorporación de glucosa en condiciones basales y estimuladas pero, conservando el patrón de incremento de la captación observado en cardiomiocitos mantenidos en medio con  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular. Como en la mayoría de los otros tipos celulares, los mecanismos de endocitosis compensatoria en los cardiomiocitos son altamente desconocidos. Existen antecedentes que vinculan el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  con la endocitosis compensatoria pero, ninguno contempla ensayos en células musculares de mamíferos. Por ejemplo, un estudio realizado en ovocitos de erizo concluyó que el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  es necesario para que se produzca la endocitosis compensatoria de los gránulos corticales, y que esta sólo ocurría en los sitios de previa exocitosis, porque estos eran los únicos lugares en la superficie del ovocito que poseían canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-P dependientes de voltaje (86). Además, se ha descrito que para la endocitosis del receptor de la familia tirosina kinasa c-Kit tanto el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  como la actividad de PI3K influyen en su endocitosis, y que la inhibición de ambas señales interrumpe las primeras etapas de la internalización del receptor (87). De acuerdo a este resultado, es importante destacar que en cardiomiocitos de ratón el canal de  $\text{Ca}^{+2}$  TRPC3 se detecta en inmunoprecipitados del transportador de glucosa 4 (GLUT4), y que insulina estimula la translocación de TRPC3 hacia la membrana de cardiomiocitos de ratones normales pero, no en los ratones insulino resistentes (88). Además, TRPC3 se ha encontrado en grandes complejos proteicos, que contienen proteínas que también se encuentran en las vesículas intracelulares que almacenan GLUT4 (por ejemplo, VAMP2 y sinaptofisina) (89). Finalmente, los resultados obtenidos sumados a los antecedentes existentes invitan a estudiar en un futuro la relación exacta entre el  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular y la endocitosis de GLUT4 y a realizar una exploración en profundidad del origen y mecanismo de esta regulación.

De acuerdo a lo observado en células L6 (85), cardiomiocitos (90) y músculo esquelético aislado (91) el tratamiento sólo con ionomicina en cardiomiocitos adultos no tiene efectos significativos sobre la captación basal de glucosa (basal, 1; ionomicina  $1,4 \pm 0,1$ ). Sin embargo, en adipocitos 3T3L1 (53) como lo aquí mostrado en cardiomiocitos adultos, el tratamiento de las células con ionomicina causó una ligera reducción de la captación de glucosa estimulada por insulina

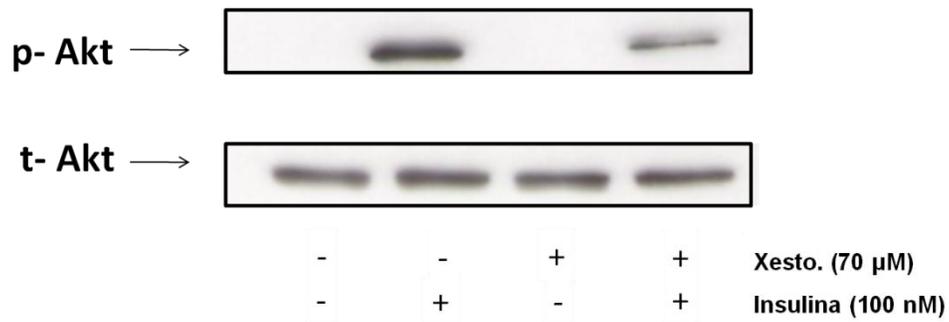
(insulina,  $2,4 \pm 0,4$ ; ionomicina e insulina,  $1,9 \pm 0,2$ ). Los primeros estudios en adipocitos de rata mostraron que cambiando el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, existía una ventana de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que garantizaba la captación de glucosa inducida por insulina (75) y que más allá de un estrecho valor entre 140-270 nM, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular correlacionaba con la resistencia a insulina (92). Además, como ya mencionamos anteriormente, la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$  se caracteriza por ser finamente regulada y por poseer códigos temporales y espaciales que la convierten en una señalización universal y versátil. Por lo tanto, es coherente pensar que el influjo masivo de  $\text{Ca}^{+2}$  provocado por la acción de ionomicina, tiene efectos deletéreos en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos adultos y que estos resultados tienen coherencia con la desregulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  observada en pacientes que presentan cardiomiopatías.

De los resultados obtenidos al preincubar las células con BAPTA-AM, se determinó que la captación de glucosa inducida por insulina depende fuertemente de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Dantroleno, un inhibidor de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el retículo sarcoplásmico a través del RyR, no previno la translocación de GLUT4 en miotubos L6 que expresan de manera estable la quimera GLUT4myc (93). Además, en cardiomiocitos neonatos (78), como lo aquí mostrado en cardiomiocitos adultos, la inhibición del RyR con Ryanodina no produjo efecto en la captación de glucosa inducida por insulina. En contraste, el pretratamiento de las células con el bloqueador del  $\text{IP}_3\text{R}$ , 2-APB inhibió por completo la incorporación de glucosa inducida por insulina. Nuestro Laboratorio previamente ha demostrado que un mecanismo de señalización que involucra el eje proteína G, PI3K $\gamma$  e  $\text{IP}_3\text{R}$  es el responsable de la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  desde el retículo sarcoplásmico en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos neonatos (78). Este mecanismo podría ser el responsable de la relación entre la inhibición del  $\text{IP}_3\text{R}$  y la disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos adultos, sin embargo, se requieren futuras investigaciones para determinar si este mecanismo opera en estas células altamente diferenciadas.

Los resultados obtenidos en este estudio, sumados a los antecedentes ya existentes en otros modelos celulares invitan a profundizar en la relación que existe entre el  $\text{Ca}^{+2}$  y la señalización de insulina orientada al transporte de glucosa. Trabajos futuros deberán determinar como el

$\text{Ca}^{+2}$  liberado desde el retículo sarcoplásmico a través del  $\text{IP}_3\text{R}$ , estaría involucrado en los pasos finales de la cascada de señalización de la insulina y también determinar que moléculas sensoras de  $\text{Ca}^{+2}$  podrían regular estos procesos. En relación a este último punto se ha propuesto que las moléculas parecidas a sinaptotagmina podrían regular el proceso de fusión de las vesículas que contienen GLUT4 (94) y también que  $\text{Ca}^{+2}$ / calmodulina estaría involucrada en los procesos de traslocación y fusión del transportador (53).

En resumen, el  $\text{Ca}^{+2}$  liberado desde los reservorios intracelulares dependientes de  $\text{IP}_3\text{R}$  es un importante modulador fisiológico del transporte de glucosa inducido por insulina en cardiomiocitos adultos. Esta información, sin duda, es un aporte en la tarea de dilucidar el mecanismo por el cual la señalización de insulina promueve la captación de glucosa, y adquiere gran relevancia en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para tratar enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2 y las complicaciones cardiovasculares que la caracterizan.



**Figura suplementaria. Efecto de Xestospongina C en la fosforilación de AKT inducida por insulina en cardiomiocitos aislados de rata adulta.** Las células se estimularon con insulina 100 nM durante 5 min en medio con  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego se prepararon extractos celulares y se analizó la fosforilación de AKT por Western blot tal como se indica en Materiales y Métodos. El inhibidor del  $\text{IP}_3\text{R}$ , Xestospongina C (70  $\mu\text{M}$ ) disminuye aproximadamente el 50% la fosforilación de AKT inducida por insulina.

### 13 CONCLUSIONES

- El RI se encuentra presente y funcional en el cardiomiocito de rata adulta.
- Insulina activa las vías de señalización ERK y AKT en el cardiomiocito de rata adulta.
- Insulina estimula la captación de glucosa de manera dependiente del tiempo y de su concentración en el cardiomiocito de rata adulta.
- La fosforilación de AKT inducida por insulina, ocurre independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular pero depende del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular pues BAPTA-AM la inhibe significativamente.
- La depleción del  $\text{Ca}^{+2}$  extra e intracelular con EGTA y BAPTA-AM respectivamente, no afecta la autofosforilación del RI inducida por insulina.
- Ryanodina y 2-APB tienden a disminuir la fosforilación de AKT dependiente de insulina en el cardiomiocito adulto.
- El incremento en la captación de glucosa inducida por insulina es independiente de la presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular.
- La depleción del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular por BAPTA-AM inhibe significativamente la captación de glucosa inducida por insulina.
- La captación de glucosa, en condiciones basales y en condiciones de estímulo con insulina, es mayor en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  en el medio extracelular.
- Ionomicina no afecta la captación basal de glucosa pero disminuye la inducida por insulina.
- 2-APB pero no Ryanodina afecta la captación de glucosa inducida por insulina en cardiomiocitos de rata adulta, lo que sugiere una interrelación entre la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente de  $\text{IP}_3$  y el transporte de glucosa inducido por insulina en el cardiomiocito adulto.
- Los resultados en conjunto indican que el transporte de glucosa depende del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular.

## 14 REFERENCIAS

1. Dunn MF 2005 Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review. *BioMetals* 18:295-303
2. Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S 2006 Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. *J. Biochem* 140: 1-5
3. Wilcox G 2005 Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26: 19-39
4. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI 1989 Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 86: 114-118
5. De Meyts P, Whittaker J 2002 Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 1: 769-783
6. Youngren JF 2007 Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 873-891
7. Yip C, Ottensmeyer P 2003 Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 27329-27332
8. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF 2005 Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87: 99-109
9. Taniguchi C, Emanuelli B, Kahn CR 2006 Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 85-96
10. Ding Z, Liang J, Li J, Lu Y, Ariyaratna V, Lu Z, Davies MA, Westwick JK, Mills GB 2010 Physical association of PDK1 with Akt1 is sufficient for pathway activation independent of membrane localization and phosphatidylinositol 3 kinase. *PLoS One* 5: e9910

11. Costa J, Borges M, David C, Vaz Carneiro A 2006 Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 332: 1-10
12. Carroll R, Carley AN, Dyck J, Severson DL 2005 Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *Am. J Physiol Endocrinol Metab* 288: E900-E906.
13. Brownsey RW, Boone AN, Allard MF 1997 Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovascular Research*. 34: 3-24
14. Huang PL. 2009 eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab*. 20: 295-302
15. 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: 629-39
16. Bertrand L, Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL 2008 Insulin signalling in the heart. *Cardiovascular Research* 79: 238-248
17. DeBosch BJ, Muslin AJ 2008 Insulin signaling pathways and cardiac growth. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44: 855-864
18. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA 2010 Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-19

19. DeFronzo RA 2010 Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 53: 1270-87
20. Muniyappa R, Montagnani M, Kon Koh K, Quon MJ 2007 Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine Reviews* 28: 463-491
21. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000 The versatility and universality of calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21
22. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003 Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-29
23. Molkenkin JD 2006 Dichotomy of Ca<sup>2+</sup> in the heart: contraction versus intracellular signaling. *J Clin Invest.* 116: 623-626
24. Bers DM 2002 Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415: 198-205
25. Endoh M 2008 Cardiac Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> sensitizers. *Circ J* 72: 1915-1925
26. Davis JP, Tikunova SB 2008 Ca<sup>2+</sup> exchange with troponin C and cardiac muscle dynamics. *Cardiovascular Research* 77: 619-626
27. Tennyson GE 2002 Understanding type 2 Diabetes Mellitus and associated cardiovascular disease: linked by insulin resistance. *Am J Manag Care* 8: S450-459.
28. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ 2009 Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research And Clinical Practice* 87: 4-14
29. MINISTERIO DE SALUD CHILE 2009 Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2. 1-73
30. Thorens B, Mueckler M 2010 Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E141-E145

31. Uldry M, Thorens B 2004 The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Eur J Physiol* 447:480-489
32. Zhao F, Keating AF 2007 Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics* 8: 113-128
33. Shepherd PR, Kahn BB 1999 Glucose transporters and insulin action: implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 341: 248-257
34. Chunqiu Hou J, Pessin JE 2007 The ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 Trafficking. *Curr Opin Cell Biol.* 19: 466-473
35. Huang S, Czech MP 2007 The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 2007, 5:237-252
36. Bogan JS, Kandror KV 2010 Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Current Opinion in Cell Biology* 22:506-512
37. Jedrychowski MP, Gartner CA, Gygi SP, Zhou L, Herz J, Kandror KV, Pilch PF 2010 Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *The Journal Of Biological Chemistry* 285: 104-114
38. Zhao P, Yang L, Lopez JA, Fan J, Burchfield JG, Bai L, Hong W, Xu T, James DE 2009 Variations in the requirement for v-SNAREs in GLUT4 trafficking in adipocytes. *Journal of Cell Science* 122: 3472-3480
39. Dugani CB, Klip A 2005 Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *European Molecular Biology Organization* 6: 1137-1142

40. Li J, Peters PJ, Bai M, Dai J, Bos E, Kirchhausen T, Kandror KV, Hsu VW 2007 An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *The Journal of Cell Biology* 178: 453-464
41. Bryant NJ, Govers R, James DE 2002 Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 267-277
42. Jordens I, Molle D, Xiong W, Keller SR, McGraw TE 2010 Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles. *Molecular Biology of the Cell* 21: 2034–2044
43. Ishiki M, Klip A 2005 Minireview: Recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146: 5071-5078
44. Funaki M, Randhawa P, Janmey PA 2004 Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps. *Molecular and Cellular Biology* 24: 7567-7577
45. McCarthy AM, Elmendorf JS 2007 GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res* 125: 373-388
46. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE 2003 Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 14599-14602

47. Chiang S, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauerk CL, Macarak IG, Pessin JE, Saltiel AR 2001 Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410: 944-948
48. Makinde AO, Kantor PF, Lopaschuk GD 1998 Maturation of fatty acid and carbohydrate metabolism in the newborn heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188: 49-56
49. Abel ED 2004 Glucose transport in the heart. *Front Biosci* 9: 201-215
50. Peterson GL 1977 A simplification of the assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 356-356
51. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
52. DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. 2006 Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 32841-32851
53. Whitehead JP, Molero JC, Clark S, Martin S, Meneilly G, James DE 2001 The Role of  $Ca^{2+}$  in Insulin-stimulated Glucose Transport in 3T3-L1 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 27816-27824
54. Lanner JT, Katz A, Tavi P, Sandström ME, Zhang SJ, Wretman C, James S, Fauconnier J, Lännergren J, Bruton JD, Westerblad H 2006 The role of  $Ca^{2+}$  influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes* 55:2077-2083

55. Abel ED 2004 Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. *Curr Hypertens Rep* 6:416-423
56. Abel ED 2005 Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5: 219-26
57. Huang JP, Huang SS, Deng JY, Hung LM 2009 Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic rats. *J Biomed Sci.* 16:77 (1-13)
58. Carroll R, Carley AN, Dyck JR, Severson DL 2005 Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E900–E906
59. Montessuit C, Papageorgiou I, Lerch R 2008 Nuclear Receptor Agonists Improve Insulin Responsiveness in Cultured Cardiomyocytes through Enhanced Signaling and Preserved Cytoskeletal Architecture. *Endocrinology* 149: 1064-1074
60. Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P 2008 Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and Cellular Biology* 28: 511-527
61. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R 2006 ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *Journal of Biology* 5:14 (1-15)
62. Li J, Johnson SE 2006 ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 1425-1433

63. Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, Pagès G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD 2004 MEK1-ERK2 Signaling Pathway Protects Myocardium from Ischemic Injury In Vivo. *Circulation* 109: 1938-1941
64. Green CJ, Göransson O, Kular GS, Leslie NR, Gray A, Alessi DR, Sakamoto K, Hundal HS 2008 Use of Akt inhibitor and a drug-resistant mutant validates a critical role for protein kinase B/Akt in the insulin-dependent regulation of glucose and system a amino acid uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 27653-27667
65. Liu TJ, Lai HC, Ting CT, Wang PH. 2007 Bidirectional regulation of upstream IGF-I/insulin receptor signaling and downstream FOXO1 in cardiomyocytes. *Journal of Endocrinology* 192: 149-158
66. Ren JM, Marshall BA, Gulve EA, Gao J, Johnson DW, Holloszy JO, Mueckler M. 1993 Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 268: 16113-5
67. Schertzer JD, Antonescu CN, Bilan PJ, Jain S, Huang X, Liu Z, Bonen A, Klip A. 2009 A transgenic mouse model to study glucose transporter 4myc regulation in skeletal muscle. *Endocrinology* 150: 1935-40
68. Doehner W, Rauchhaus M, Ponikowski P, Godsland IF, von Haehling S, Okonko DO, Leyva F, Proudler AJ, Coats AJ, Anker SD 2005 Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 46: 1019-26.

69. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacín M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A 1997 Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem* 272: 7085-92.
70. Lauritzen HP, Ploug T, Prats C, Tavaré JM, Galbo H. 2006 Imaging of insulin signaling in skeletal muscle of living mice shows major role of T-tubules. *Diabetes* 55: 1300-6.
71. Fazakerley DJ, Lawrence SP, Lizunov VA, Cushman SW, Holman GD. 2009 A common trafficking route for GLUT4 in cardiomyocytes in response to insulin, contraction and energy-status signalling. *J Cell Sci.* 122: 727-34
72. Basu R, Basu A, Johnson CM, Schwenk WF, Rizza RA. 2004 Insulin dose-response curves for stimulation of splanchnic glucose uptake and suppression of endogenous glucose production differ in nondiabetic humans and are abnormal in people with type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 2042-50
73. Bertrand L, Ginion A, Beauloye C, Hebert AD, Guigas B, Hue L, Vanoverschelde JL. 2006 AMPK activation restores the stimulation of glucose uptake in an in vitro model of insulin-resistant cardiomyocytes via the activation of protein kinase B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H239-50
74. Clausen T, Elbrink J, Martin BR 1974 Insulin controlling calcium distribution in muscle and fat cells. *Acta Endocrinol* 77:137-143
75. Draznin B, Sussman K, Kao M, Lewis D, Sherman N 1987 The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *J Biol Chem* 262:14385–14388

76. Yang C, Watson RT, Elmendorf JS, Sacks DB, Pessin JE 2000 Calmodulin antagonists inhibit insulin-stimulated GLUT4 (glucose transporter 4) translocation by preventing the formation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 14:317–326
77. Klip A 1984 Is intracellular  $Ca^{2+}$  involved in insulin stimulation of sugar transport? Fact and prejudice. *Can J Biochem Cell Biol* 62:1228–1236
78. Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, Lavandero S 2010 An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151:4665-77
79. Worrall DS, Olefsky JM 2002 The effects of intracellular calcium depletion on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*.16: 378-89.
80. Brette F, Orchard C 2003 T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res* 92: 1182-92.
81. Song LS, Guatimosim S, Gómez-Viquez L, Sobie EA, Ziman A, Hartmann H, Lederer WJ 2005 Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann N Y Acad Sci*. 1047: 99-111.
82. Scriven DR, Dan P, Moore ED 2000 Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 79: 2682-91
83. Orchard CH, Pásek M, Brette F.2009 The role of mammalian cardiac t-tubules in excitation-contraction coupling: experimental and computational approaches. *Exp Physiol*. 94: 509-19

84. Zechner C, Beyersdorf F, Doenst T 2002 The role of calcium in the regulation of glucose uptake in isolated working rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 232: 75–80
85. Klip A, Li G, Logan WJ 1984 Role of calcium ions in insulin action on hexose transport in L6 muscle cells. *Am J Physiol* 247:E297-304
86. Smith RM, Baibakov B, Ikebuchi Y, White BH, Lambert NA, Kaczmarek LK, Vogel SS 2000 Exocytotic insertion of calcium channels constrains compensatory endocytosis to sites of exocytosis. *J Cell Biol.* 148: 755-67.
87. Gommerman JL, Rottapel R, Berger SA 1997 Phosphatidylinositol 3-kinase and Ca<sup>2+</sup> influx dependence for ligand-stimulated internalization of the c-Kit receptor. *J Biol Chem.* 272: 30519-25.
88. Fauconnier J, Lanner JT, Sultan A, Zhang SJ, Katz A, Bruton JD, Westerblad H 2007 Insulin potentiates TRPC3-mediated cation currents in normal but not in insulin-resistant mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 73: 376-85.
89. Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC, Liu X, Bollimuntha S, Brazer SC, Combs C, Das S, Leenders AG, Sheng ZH, Knepper MA, Ambudkar SV, Ambudkar IS. 2004 VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx. *Mol Cell.* 15: 635-46.
90. Cheung JY, Constantine JM, Bonventre JV 1987 Cytosolic free calcium concentration and glucose transport in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 252: C163-72.
91. Lee AD, Gulve EA, Chen M, Schluter J, Holloszy JO 1995 Effects of Ca<sup>2+</sup> ionophore ionomycin on insulin-stimulated and basal glucose transport in muscle. *Am J Physiol.* 268: R997-1002.

92. Begum N, Leitner W, Reusch JE, Sussman KE, Draznin B 1993 GLUT-4 phosphorylation and its intrinsic activity. Mechanism of Ca(2+)-induced inhibition of insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 268:3352-3356
93. Wijsekara N, Tung A, Thong F, Klip A 2006 Muscle cell depolarization induces a gain in surface GLUT4 via reduced endocytosis independently of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1276-1286
94. Sudhof TC, Rothman JE 2009 Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477