



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Estudio de la distribución tisular de
insulina endógena en la rata. Su concentración
en mitocondrias hepáticas

N° 510

Lucía Camila Martucci

Tutor: Dr. Juan Carlos Cresto

Departamento de Investigaciones
2012

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

AGRADECIMIENTOS

- Fundamentalmente al Dr. Juan Carlos Cresto por concederme la honorable posibilidad de trabajar con él, y por proveerme las herramientas y los conocimientos para realizar este proyecto. Por su buena voluntad y asesoramiento continuo, y por transmitirme su entusiasmo, incentivándome a mejorar cada día.
- Muy especialmente a la Dra. María del Carmen Camberos por su buena disposición, su paciencia inagotable y su ayuda constante; por su calidez y su gran compañerismo, que hicieron de este proceso un camino mucho más transitado.
- De gran consideración al Dr. Gabriel Cao por proporcionar las imágenes de microscopía que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.
- Al CEDIE por concederme el espacio, y por la aceptación y la calidad de todos sus miembros.
- Al decano de la facultad, el Dr. Hernán Aldana por ponerme en contacto con el Dr. Cresto, ya que la realización de esta tesina no habría tenido lugar sin su intervención.
- A mis profesores por su esfuerzo y dedicación diarios, en particular al Ing. Alberto Pistelli Iuspa por incentivarme en la concreción de este trabajo.
- Esencialmente a mis padres, Amparo y Alberto por darme la posibilidad de estudiar en la Universidad, por su compromiso y ayuda incondicionales que han permitido la realización de este proyecto. Por apoyarme siempre en todas mis decisiones y por su constante esfuerzo para facilitarme el logro de mis objetivos.
- A mi familia, en especial a Verónica, Alberto y Federico por confiar en mí y acompañarme durante todo este trayecto. Y a Laura por escucharme siempre, por aconsejarme y alentarme.
- A mis amigas Yanina y Florencia por estar siempre de mi lado; por su apoyo y su aguante durante la elaboración de esta tesina, y por brindarme su cariño en todo momento.
- A Marcelo por darme ánimo para seguir adelante, por ser mi soporte y estar presente cada vez que lo necesito; por entenderme siempre e incentivarme a ser una mejor persona.
- A mis compañeras Cintia y Rocío por su complicidad y por toda su ayuda en la resolución de las dificultades que se presentaron durante el curso de nuestra carrera.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
La insulina	3
Efectos generales de la insulina en el metabolismo.....	3
Mecanismo de acción de la insulina en mamíferos	4
Internalización, degradación y efectos intracelulares de la insulina	8
Insulina en invertebrados	9
Insulina en microorganismos eucariotas.....	10
Insulina en bacterias	12
Mitocondrias	13
Origen de las mitocondrias	13
Funciones de la mitocondrias	16
Enzimas mitocondriales reguladas por la vía de señalización de la insulina	17
OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y ALCANCE	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Fundamentos para el desarrollo de un radioinmunoanálisis (RIA).....	19
Estudio de las variables para desarrollar un RIA de rata	20
Perfusión de hígados con N-etilmaleimida 2 mM	21
Procesamiento de tejidos y extracción de insulina	22
Aislamiento de mitocondrias hepáticas.....	23
Estudio de la calidad de la insulina.....	24
Microscopía electrónica de mitocondrias aisladas	24
Estudio confocal del comportamiento de la insulina endógena en mitocondrias	25
Análisis estadístico.....	25

RESULTADOS	26
Desarrollo de un RIA para determinación de insulina de rata	26
Determinaciones de insulina en tejidos y mitocondrias hepáticas de rata	29
Estudios de microscopía de insulina en mitocondrias	33
DISCUSIÓN	38
Introducción.....	38
Discusión de la metodología	39
Discusión de los resultados	41
BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de acción de la insulina en mamíferos.....	5
Figura 2: Eventos fundamentales de la evolución	14
Figura 3: Estudio de los anticuerpos.....	27
Figura 4: Curva estándar de insulina de rata.....	28
Figura 5: Estudio de la precisión y reproducibilidad del RIA	30
Figura 6: Determinación de insulina en tejidos de rata.....	31
Figura 7: Determinación de insulina en hígado	32
Figura 8: Determinación de insulina en mitocondrias	34
Figura 9: Microscopía electrónica de mitocondrias aisladas	35
Figura 10: Estudios confocales en mitocondrias	36

RESUMEN

La insulina es una hormona polipeptídica sintetizada en el páncreas de los vertebrados, implicada en multitud de procesos metabólicos esenciales. La acción de la insulina se inicia con su unión a su receptor en la membrana plasmática, desencadenando una serie de reacciones intracelulares en las que interviene una variedad de enzimas y sustratos. Además, parte de la insulina es internalizada en las células, donde es degradada fundamentalmente por la acción de la enzima degradante de insulina (EDI), que se encuentra presente en diversos organismos procariotas y eucariotas. En el interior celular, la insulina está asociada a EDI y una fracción de la hormona no se encuentra degradada. La insulina endocitada se dirige a distintos compartimentos subcelulares, como el endosoma, proteasoma, núcleo, retículo endoplasmático y membrana celular. Se ha determinado que la asociación de la insulina y EDI es esencial en algunas funciones intracelulares de la hormona, como la inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas y la degradación proteica en el proteasoma.

En invertebrados, como insectos, moluscos y nematodos existen péptidos similar insulina que actúan mediante mecanismos análogos a los existentes en vertebrados, y están involucrados en procesos relacionados con el desarrollo y la reproducción. Del mismo modo, se han identificado sustancias con características similares a la insulina en hongos, como *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa*, en el protozoo *Tetrahymena pyriformis* y en la bacteria *Escherichia coli*, donde además se demostró que existe una respuesta metabólica al agregado de insulina de cerdo. En esta bacteria también se ha estudiado la degradación de insulina y se ha caracterizado una proteasa, denominada proteasa III, homóloga a EDI en su estructura y función degradante de insulina. Debido a las similitudes existentes entre las bacterias y las mitocondrias, también se estudió la degradación de insulina en estas organelas y se determinó que efectivamente poseen la capacidad de degradar esta hormona.

Por lo expuesto, en este trabajo se estudió la distribución tisular de la insulina endógena en la rata, para lo cual se realizó una extracción ácido-alcohólica de insulina en páncreas, hígado, músculo y riñón. Además se aislaron las mitocondrias hepáticas y se determinó la concentración de insulina en dichas organelas. Para todo esto se desarrolló una técnica de radioinmunoanálisis que permitiera la cuantificación de insulina de rata de un modo confiable y reproducible. Además, se comprobó la presencia de insulina en mitocondrias mediante microscopía láser confocal.

Las concentraciones determinadas en tejidos extrapancreáticos concuerdan con los datos bibliográficos y las concentraciones halladas en mitocondrias sugieren que no puede tratarse de una contaminación, ya que son equivalentes a los valores de insulina determinados en hepatocitos. Por otra parte las imágenes de microscopía confocal demuestran que la insulina y EDI se co-localizan en las mitocondrias.

En base a los resultados obtenidos podría establecerse una nueva hipótesis sobre una función directa de la insulina a nivel mitocondrial, aún no considerada.

ABSTRACT

Insulin is a polypeptide hormone synthesized in the pancreas of vertebrates and involved in many essential metabolic processes. Insulin action starts with the binding to its receptor on plasma membrane, triggering a series of intracellular reactions in which a variety of enzymes and substrates are implicated. Moreover, insulin is internalized into the cells, where it can be degraded by insulin-degrading enzyme (IDE), present in various prokaryotic and eukaryotic organisms. Into the cell, part of the hormone is not degraded and it is associated to IDE. Endocytosed insulin goes to different subcellular compartments, such as endosome, proteasome, nucleus, endoplasmic reticulum and cell membrane. It has been shown that insulin association to IDE is essential for some hormonal intracellular functions, as inhibition of peroxisomal fatty acid oxidation and degradation of protein in the proteasome.

Invertebrates such as insects, molluscs and nematodes have insulin-like peptides that act through mechanisms analogous to those existing in vertebrates, which are involved in processes related to development and reproduction. In the same way, insulin-like substances have been identified in the fungi *Aspergillus Fumigatus* and *Neurospora Crassa*; in the protozoa *Tetrahymena Pyriformis* and *Escherichia Coli*. They also show a metabolic responses to pork insulin. Insulin degradation has also been studied in *E. Coli* and a protease, named Protease III, has been identified. Protease III is homologous to IDE in structure and insulin-degrading activity. Due to similarities between bacteria and mitochondria, insulin degradation has also been studied in these organelles, and it was found that mitochondria can degrade insulin.

Based on these findings, endogenous insulin distribution in tissues of rats was studied in the present work and a radioimmunoassay was developed in order to quantify rat insulin in a reliable and reproducible way. This study was performed in pancreas, liver, muscle and kidney and an acid alcohol extraction of insulin was carried out. Liver mitochondria were isolated and insulin concentration was measured in these organelles. In addition, mitochondrial presence of insulin was assessed by confocal laser microscopy.

The concentrations measured in extrapancreatic tissues were consistent with bibliographic data. Furthermore, concentrations found in mitochondria suggest that this finding was not due to contamination, because it was equivalent to values determined in hepatocytes. Images from confocal microscopy showed that insulin and IDE are co-localized in mitochondria.

Based on these results, a new hypothesis about a direct mitochondrial function of insulin, not yet considered, could be established.

INTRODUCCIÓN

La insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 5,7 kDa, constituida por 51 aminoácidos. Está formada por dos cadenas peptídicas, A y B, conectadas entre sí por 2 puentes disulfuro. Posee también un puente disulfuro intracatenario entre dos residuos de cisteína de la cadena A.

En los mamíferos, esta proteína es sintetizada por las células beta de los islotes pancreáticos en forma de preprohormona, que luego de ser procesada en el retículo endoplasmático y en el complejo de Golgi se convierte en la hormona funcional. La porción aminoterminal de la molécula precursora compuesta por 86 aminoácidos se elimina inicialmente para dar lugar a la proinsulina. Finalmente, el péptido C (compuesto por 14 aminoácidos) de la proinsulina es escindido por una carboxipeptidasa, dejando unidas las cadenas A y B (1).

Efectos generales de la insulina en el metabolismo

Luego de la ingesta de alimentos, ante un incremento en la glucemia, la insulina es liberada por el páncreas para estimular el almacenamiento de combustibles, promoviendo la síntesis de glucógeno en hígado y músculo. La insulina permite que la glucosa ingrese al hígado a través del transportador de glucosa GLUT-2. Allí, la glucosa se une y activa a la glucoquinasa, que la convierte en glucosa 6-fosfato. Ante un aumento en los niveles de glucosa 6-fosfato, se incrementa el almacenamiento de glucógeno. En este proceso interviene también la fosforilasa a, encargada de la degradación del glucógeno, que al unirse a la glucosa se vuelve más sensible a la acción de la fosfatasa que la convierte a su forma inactiva, la fosforilasa b. De esta manera, se inhibe la glucogenólisis y se promueve el almacenamiento de glucosa.

Al mismo tiempo, la insulina estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis en el hígado. La activación de la glucólisis hepática, a su vez, favorece la síntesis de ácidos grasos. Los ácidos grasos se esterifican para formar triglicéridos, que son transportados por la sangre hacia el tejido adiposo en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Al llegar al tejido adiposo, los triglicéridos sintetizados en el hígado se convierten en ácidos grasos por medio de la acción de una lipoproteína lipasa ubicada en la cara externa del endotelio vascular y luego son depositados como grasa en el tejido adiposo por la ácido graso sintasa (FAS) de ubicación citoplasmática. Esta enzima es a su vez, activada por procesos

desencadenados por la insulina. Estos ácidos grasos pueden convertirse en acil-CoA grasos y ser transferidos al glicerol 3-fosfato para producir nuevamente triglicéridos. El glicerol 3-fosfato procede de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato producida durante la glucólisis. Por otro lado, los depósitos de grasa en las células adiposas pueden ser hidrolizados para la liberación de ácidos grasos por la lipasa dependiente de insulina. Estos se conjugan con la albúmina y son transportados hacia el hígado u otros tejidos para ser utilizados como combustible celular. El glicerol resultante de la degradación de los triglicéridos también se exporta al hígado.

El principal transportador de glucosa en los órganos periféricos como el músculo y el tejido adiposo es el GLUT-4, cuya translocación hacia la membrana plasmática desde sus compartimentos subcelulares se debe a la acción de la insulina. En las células adiposas la entrada de glucosa les permite disponer de glicerol 3-fosfato para la síntesis de triglicéridos. La insulina no sólo estimula la síntesis de lípidos, sino que detiene su degradación, por inhibición de la lipasa intracelular que los convierte en ácidos grasos.

En condiciones de ayuno prolongado el hígado puede catabolizar aminoácidos produciendo α -cetoácidos que serán utilizados en la gluconeogénesis o la síntesis de ácidos grasos, pero no puede hacerlo con los aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina). La insulina favorece la captación de aminoácidos ramificados por el músculo, donde pueden ser transaminados. Por otra parte, la insulina cumple un papel importante en el metabolismo de las proteínas, inhibiendo su degradación intracelular y estimulando su síntesis (2).

La insulina también actúa como un factor de crecimiento en una variedad de tipos celulares, desencadenando eventos de proliferación y diferenciación celular. Todos sus efectos la convierten en una hormona fundamental para el crecimiento y el desarrollo, ya que estimula la síntesis de las enzimas implicadas en los procesos anabólicos y provee intermediarios para la biosíntesis de grasas y proteínas.

Mecanismo de acción de la insulina en mamíferos

El receptor de insulina se encuentra presente, en mayor o menor concentración, en prácticamente todos los tejidos de los vertebrados. Es una glicoproteína transmembrana compuesta por dos subunidades α (135 kDa), unidas cada una a una subunidad β (95 kDa) unidas entre sí mediante puentes disulfuro, formando un heterotetrámero ($\alpha_2\beta_2$). Los dos tipos de subunidades derivan del procesamiento proteolítico de un proreceptor. Las 2 isoformas existentes del receptor se producen por *splicing* alternativo del transcripto del gen y se diferencian por la presencia de 12 aminoácidos adicionales cercanos al extremo C-terminal de

Fig. 1

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA EN MAMÍFEROS

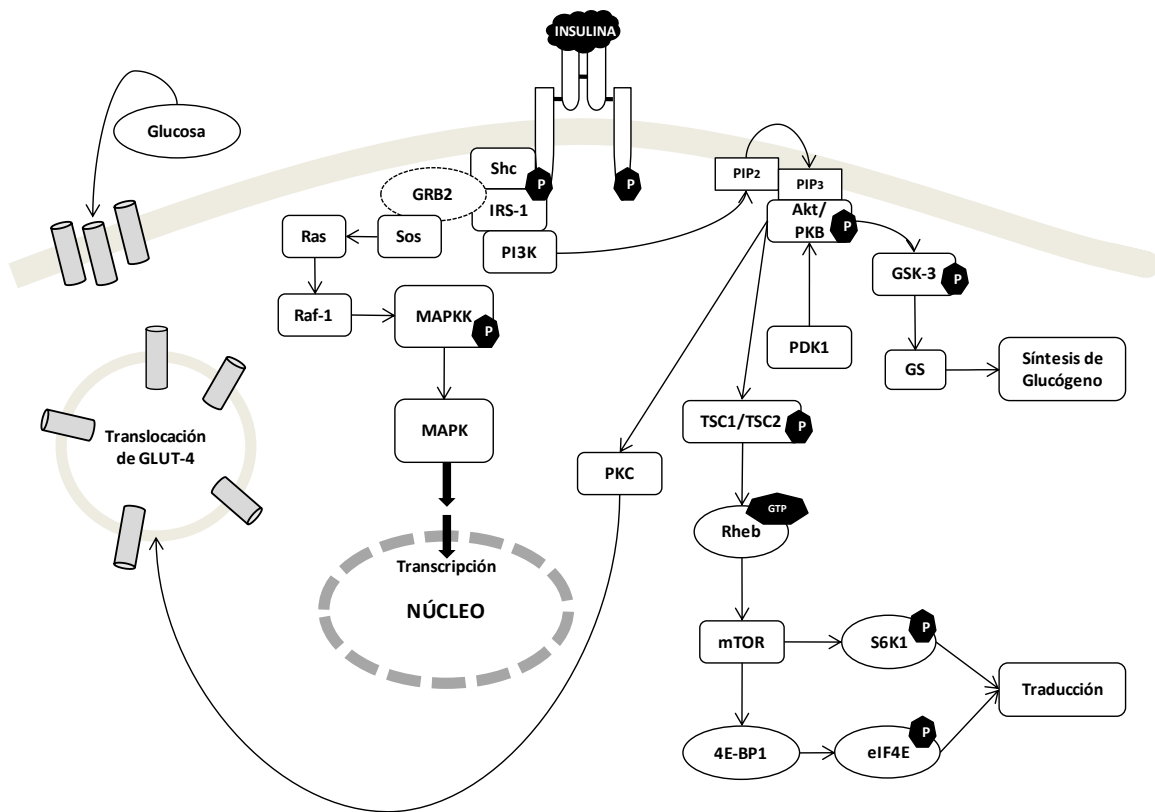


Figura 1: Mecanismo de acción de la insulina en mamíferos

Se muestra un diagrama del mecanismo de acción de la insulina descrito en el texto. P: Fosforilación. IRS-1: Sustrato principal del receptor de insulina. PI3K: Fosfatidilinositol 3'-quinasa. PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa 3. GS: Glucógeno sintasa. PDK1: Quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol. TSC: Complejo de esclerosis tuberosa. PKC: Proteína quinasa C. mTOR: Mammalian target of rapamycin. 4E-BP1: Proteína de unión al factor eucariótico de iniciación 4E. eIF4E: Factor eucariótico de iniciación 4E. S6K: Proteína quinasa ribosomal S6. MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos. MAPKK: Quinasa de MAPK. GLUT-4: Transportador de glucosa 4.

la subunidad α . Los 719 o 731 aminoácidos que constituyen las subunidades α se localizan en su totalidad en el espacio extracelular. Cada subunidad β se compone de 620 aminoácidos y presenta un dominio extracelular que se une a la subunidad α a través de un puente disulfuro, un dominio transmembrana que ancla el receptor a la membrana plasmática, y un dominio citoplasmático con actividad de tirosina quinasa encargado de generar la señal intracelular. Este dominio posee residuos de tirosina cuya fosforilación es el primer paso de la vía de transducción de señales.

Cuando las subunidades α del receptor están libres, la actividad de tirosina quinasa de las subunidades β se encuentra inhibida. Al unirse la insulina a las subunidades α , ocurre un cambio conformacional del receptor que permite que los residuos de tirosina de una de las cadenas β se posicionen en el centro activo de la otra para que se produzca una fosforilación cruzada. Esta autofosforilación activa las propiedades enzimáticas del receptor.

El paso siguiente de esta cadena de reacciones es la fosforilación del sustrato principal del receptor de insulina (IRS-1). Esta proteína de 180 kDa posee 21 sitios que pueden ser fosforilados en sus residuos de tirosina (6 en motivos YMXM, 3 en motivos YXXM, y 12 en motivos hidrofóbicos). Al menos 8 de los posibles residuos son fosforilados por el receptor de insulina. Esto le confiere al IRS-1 la capacidad de unirse a proteínas con dominios de homología 2 a Src (SH2), de las que la fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) es la más importante. La PI3K está compuesta por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad regulatoria de 85 kDa (p85 α) que posee dos dominios SH2. El IRS-1 fosforilado se une a los dominios SH2 de p85 α , activando a la enzima (3).

El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) es un fosfolípido localizado en la cara citosólica de la membrana plasmática. Una vez activada la PI3K, la subunidad catalítica fosforila al PIP₂, convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que actúa como segundo mensajero en la vía de señalización. El PIP₃ se une a la serina quinasa Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB), reclutándola hacia la membrana plasmática. Allí la Akt se activa al ser fosforilada en su residuo Thr³⁰⁸ por la proteína quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol (PDK1) (4). Akt activa, fosforila a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) inhibiendo su acción. Esto permite que se active la glucógeno sintasa (GS) y por ende, la síntesis de glucógeno (5).

Otra proteína que se asocia al IRS-1 es GRB-2. Esta es una proteína adaptadora, porque contiene un dominio SH2 a través del cual se une al residuo Tyr⁸⁹⁵ del IRS-1 (3) y dos dominios SH3 que le permiten unirse a regiones ricas en prolina de otras proteínas tales como Sos, que a su vez se une a Ras. Ras es una proteína señalizadora perteneciente a la familia de las proteínas G pequeñas o GTPasas pequeñas que, en su forma activa unida a GTP, estimulan el crecimiento y la diferenciación celular. Sos es una proteína que se conoce como "factor de

intercambio de nucleótidos de guanina (GEF)". Esto se debe a que, al unirse a Ras abre su centro de unión a nucleótidos, permitiendo la salida de GDP y la entrada de GTP. De esta forma, Ras puede unirse y activar a otras proteínas encargadas de promover el crecimiento celular (2). Se ha demostrado que Ras se une directamente a Raf-1, una serina-treonina quinasa que fosforila y activa a la MAPK quinasa (MAPKK, por *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*), resultando en la activación de la MAPK (3).

La activación de la vía Ras/MAPK puede ocurrir independientemente de la participación del IRS-1. En este caso, el receptor de insulina puede fosforilar a Shc, otra proteína que posee dominios SH2 y dominios de unión a fosfotirosina, y se presenta en tres isoformas, de 46, 52 y 66 kDa. Al ser fosforilado por el receptor de insulina, Shc puede unirse a GRB-2 para regular a Ras sin que intervenga el IRS-1 (5). De hecho, se ha observado que la ausencia de IRS-1 disminuye la acción mitogénica de la insulina pero no la elimina, lo que demuestra que existe una redundancia en la acción de esta hormona, es decir, que un mismo efecto puede producirse por diferentes procesos de señalización (6).

La translocación del receptor de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática también es resultado de la activación de Akt (5). Existen varios tipos de transportadores de glucosa: el GLUT-1 que se encuentra en el cerebro, los eritrocitos y las células endoteliales; es un transportador constitutivo de glucosa. El GLUT-2 tiene baja afinidad por la glucosa; es el encargado de percibir los cambios en la glucemia que permiten la liberación de insulina por las células β del páncreas, y también se encuentra presente en el hígado, el riñón y el epitelio del intestino delgado. El GLUT-3 se expresa en neuronas y la placenta y tiene alta afinidad por la glucosa. El GLUT-5 es el transportador de fructosa, presente en el intestino delgado, células espermáticas, riñón, cerebro, músculo y tejido adiposo. El GLUT-4 es el principal transportador de glucosa en células musculares y adiposas y es sensible a la insulina. En su ausencia, cerca del 90% del GLUT-4 se encuentra incorporado en vesículas. Cuando se activa la PI3K, con la consiguiente activación de Akt y la proteína quinasa C (PKC) se estimula el transporte de las vesículas hacia la membrana plasmática (7).

La insulina también estimula la síntesis proteica mediante mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). mTOR es una proteína de 290 kDa, perteneciente a la superfamilia de las quinasas relacionadas con PI3K (PIKK, por *PI3K-Kinase-related Kinase*). Su función es la de regular el crecimiento y la progresión del ciclo celular integrando señales externas, como nutrientes y factores de crecimiento, permitiendo a las células proliferar sin perder su tamaño, y esto asegura que las células, y por lo tanto órganos y organismos completos mantengan un tamaño característico. mTOR actúa sobre dos proteínas implicadas en el control de la traducción: las proteína quinasas ribosomales S6 (S6Ks) y las proteínas de unión al factor

eucariótico de iniciación 4E (4E-BPs), como 4E-BP1, un represor del factor de iniciación de la traducción eIF4E (8).

Las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) convierten a las GTPasas de la forma activa (unida a GTP) a la forma inactiva (unida a GDP). La fosforilación de mTOR por Akt ocurre a través de la inactivación del complejo de esclerosis tuberosa (TSC). El complejo TSC1/TSC2 actúa como GAP, inhibiendo a Rheb, una proteína G (9). Cuando se estimula la vía de la PI3K, la PDK1 activa a la Akt, la cual fosforila a TSC2 e inhibe la actividad supresora de tumores del complejo (8), permitiendo que Rheb se una al ATP y pueda pasar del estado GDP inactivo al estado GTP activo (9). En su estado activo, Rheb modula positivamente la acción de mTOR, que fosforila a S6K1 y 4E-BP1 a través de distintas vías. Como resultado, se activa S6K1 mientras que 4E-BP1 se inactiva, permitiendo que se active eIF4E. Estas dos proteínas, independientemente, promueven el crecimiento y la progresión del ciclo celular (8).

Internalización, degradación y efectos intracelulares de la insulina

Una vez que la insulina se une a su receptor y desencadena una serie de reacciones intracelulares, la señal debe concluir. La insulina puede ser degradada en la membrana plasmática luego de ingresar a la célula por endocitosis mediada por su receptor. A concentraciones fisiológicas, ocurre una internalización de los complejos hormona-receptor, aunque a concentraciones más altas, la insulina puede ser internalizada por pinocitosis. En el primer caso, el proceso comienza con la invaginación de la membrana plasmática, dando lugar a la formación de vesículas endocíticas. Cuando se activa una bomba protónica que permite la acidificación de las vesículas, los complejos hormona-receptor se disocian. La insulina internalizada puede ser degradada con la posterior liberación al exterior celular de sus productos de degradación. Sin embargo, una pequeña cantidad puede regresar intacta a la circulación (proceso denominado retroendocitosis) (10). Aunque una pequeña fracción de los receptores se degrada en los lisosomas, en general el receptor se dirige en el interior de las vesículas hacia a membrana plasmática, donde puede volver a utilizarse. Por el contrario, la mayor parte de la insulina que ingresa a la célula es degradada y sólo una parte regresa intacta a la superficie celular. La insulina intacta también puede derivarse a compartimentos intracelulares (6).

La enzima degradante de insulina (EDI) es una zinc-metaloproteasa de 110 kDa presente en todos los tejidos. En homogenatos celulares EDI representa la mayor parte de la actividad degradante de insulina. Se ha demostrado que la degradación celular de la insulina se inhibe con la inyección intracelular de anticuerpos anti-EDI (11) y se incrementa cuando la enzima es

sobre-expresada (12). Por otro lado, en ratones con deleciones homocigotas del gen de EDI se observó hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (13) sustentando la evidencia de que EDI es esencial en el procesamiento de la insulina y su degradación. Sin embargo, la función degradante de EDI no es considerada como la única razón para la unión de la hormona con la enzima.

Aunque la remoción de la insulina de la circulación es necesaria para la finalización de la acción hormonal, su internalización y degradación están implicadas en algunas de sus funciones (6). EDI actuaría como un regulador de la acción insulínica. Por otro lado, se ha observado que la acción inhibitoria de la insulina sobre la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma sólo ocurre en presencia de EDI (14).

EDI también se encuentra asociada al proteasoma, y la actividad proteolítica del complejo está regulada por la insulina. Aparentemente, la inhibición de la proteólisis depende de que la insulina sea degradada por EDI, con la generación de fragmentos inhibitorios, aunque también es posible que la sola unión de la insulina a la enzima provoque su desplazamiento del complejo, reduciendo su actividad (15).

Por los efectos que ejercen la insulina y EDI en organelas comunes, se refuerza la idea de que EDI cumple un rol importante en la regulación de las funciones que tiene la insulina dentro de la célula. La importancia de la insulina intracelular se destaca aún más a partir de experimentos realizados que sugieren que los efectos de la hormona dentro de la célula son independientes del receptor de insulina (16) junto con otros en los que se observan efectos insulínicos en ovocitos tras la inyección intracelular directa de insulina (17)

Insulina en invertebrados

En organismos inferiores a los mamíferos en la escala evolutiva, existen sustancias análogas a la insulina y mecanismos de señalización relacionados que están implicados no solo en la ingesta, metabolismo, distribución y almacenamiento de los nutrientes, sino que también regulan la tasa de reproducción y la longevidad (18).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* contiene una familia de genes similar a la insulina que regulan el envejecimiento (19). En *C. elegans* el proceso de señalización mediado por las sustancias tipo insulina se inicia con la unión de INS a DAF-2, un homólogo del receptor de insulina de mamíferos que contiene dominios de unión a ligando y de tirosina quinasa. Este mecanismo de señalización se encuentra en neuronas, células del tracto gastrointestinal y

células musculares de este organismo (18).

Mutaciones en el gen *daf-2* inducen un estado de diapausa en este nematodo, prolongando la duración del estadio juvenil (20). Se detiene su desarrollo en el estadio larvario y, por lo tanto, se inhibe la reproducción y se reducen las tasas de metabolismo y crecimiento. Esto le permite sobrevivir hasta ocho veces más tiempo del que normalmente lo hace. De esta manera, el organismo puede adaptarse a condiciones adversas, como una disponibilidad limitada de alimento, un incremento en la densidad poblacional o temperaturas elevadas (19).

En respuesta a la ingesta de alimento, se libera uno o más sustratos INS por células neurosecretoras del sistema nervioso central (18). Al unirse al receptor DAF-2, ocurre una serie de reacciones que dan como resultado la activación de la proteína AGE-1. Esta proteína es homóloga de la de PI3K de mamíferos y su *knockout* produce el mismo efecto observado cuando se muta el gen *daf-2* (20). Otra proteína implicada en el proceso es DAF-16. En condiciones favorables, DAF-16 es inactivado por fosforilación. Esto permite que los procesos de crecimiento, almacenamiento de nutrientes y reproducción se lleven a cabo de manera normal. En cambio, frente a una situación de baja disponibilidad de alimentos se activa DAF-16, induciendo el estado de diapausa (18). En mamíferos el homólogo de DAF-16 es un factor de transcripción denominado FOXO. Se ha demostrado que FOXO1 regula la síntesis del receptor de insulina en función de las condiciones nutricionales en mamíferos (21).

En *Drosophila*, las moléculas similar insulina que son sintetizadas y secretadas por células neurosecretoras también regulan la longevidad y la reproducción. A partir de estudios realizados con *Drosophila* a los que se había realizado un *knockout* para el gen de una molécula similar al receptor de insulina, se determinó que la actividad de este receptor es esencial para la vida del insecto durante el desarrollo, ya que la ausencia del gen resultó letal (18). De forma similar a lo que ocurre con mutantes de *C.elegans* para *daf-2*, mutaciones en *Drosophila* en el gen que codifica para CHICO, homólogo de IRS, resultaron en una extensión de la longevidad -asociada con disminución del crecimiento y del número y tamaño celulares- y una reducción de la tasa reproductiva (22). Además, el sistema de señalización es dependiente de un homólogo de PI3K y cuenta con un factor de transcripción homólogo de DAF-16, denominado dFOXO (23).

Insulina en microorganismos eucariotas

Con el fin de hallar una cura para la diabetes, hace mucho tiempo se intentó aislar insulina de levaduras y plantas sin éxito. A partir de entonces, se estableció que la insulina era ajena a

cualquier organismo precedente a los vertebrados, asumiéndose como un producto exclusivo de los órganos endócrinos de estos animales. Esto implicaría un origen evolutivo relativamente reciente de esta hormona. Sin embargo, en diversos estudios se han aislado moléculas que se asemejan a la insulina en su estructura y actividad biológica a partir de microorganismos, y en otros casos se han observado efectos metabólicos inducibles por insulina de mamíferos. Estos resultados proveen evidencia de la existencia en microorganismos de vías funcionales de transducción de señales, capaces de reconocer y responder a estas hormonas. Se ha estudiado la presencia de diversas hormonas en microorganismos, de entre las cuales la insulina es la que se ha encontrado en cada microorganismo examinado para tal fin, incluyendo desde procariontas hasta eucariotas unicelulares (24). En base a estos estudios podría establecerse que esta hormona es ancestral y que su función se ha conservado durante millones de años a través de la evolución. Sin embargo, debido a las controversias que generaron estos experimentos, no se han estudiado con mayor profundidad la presencia y las funciones de la insulina y otras hormonas en microorganismos.

Se han encontrado sustancias semejantes a la insulina en organismos unicelulares eucariotas, como el protozoo ciliado *Tetrahymena pyriformis* y también en el medio en que fue cultivado, indicando que estas sustancias serían secretadas. En dos especies de hongos, *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa*, también se halló material con estas características. Esta sustancia similar a la insulina estimula la incorporación de glucosa en lípidos y, además, es similar a la insulina de mamíferos en cuanto a solubilidad en etanol ácido, perfil de elución en Sephadex G-50, reactividad cruzada con anticuerpos anti-insulina de cerdo, que también son capaces de neutralizar parcialmente su actividad biológica (25). Estos descubrimientos reforzaron la idea de que los mecanismos de comunicación intercelular se presentan como un sistema esencial de interacción entre las células individuales de todas las formas vivientes, y que su existencia no se limita a la presencia en organismos superiores de sistemas bien desarrollados y diferenciados para tal fin, como lo son el sistema nervioso y el sistema endocrino (26). La presencia de sustancias similar a la insulina en eucariotas unicelulares y en su medio de crecimiento indicaría que posiblemente la insulina actúa en estos organismos tanto como un mensajero inter- e intracelular y que forma parte de un sistema de comunicación que surgió mucho antes de que se desarrollaran sistemas anatómicos bien definidos, con células secretorias especializadas y vías de transporte de estos mensajeros, que caracterizan a los organismos multicelulares superiores (25).

Además de demostrar la existencia en estos organismos de material similar a la insulina capaz de estimular la incorporación de glucosa en lípidos, se ha descubierto que la insulina de cerdo induce la fosforilación de proteínas en células de *N. crassa*, sugiriendo que, al igual que ocurre en mamíferos, la insulina actúa en estas células iniciando una vía de transducción de señales

(27). También se determinó la presencia de una proteína que une insulina en la membrana de este organismo, que podría actuar como un receptor de estas sustancias semejantes a insulina, aunque no posee actividad de quinasa (28). También se clonó un segmento de ADN de *N. crassa* cuya secuencia proteica es muy similar a la de la preproinsulina. Sin embargo, debido a que carecía de secuencias reguladoras para la transcripción y la traducción se consideró un pseudogen (29).

Insulina en bacterias

En pruebas realizadas con células de *Escherichia coli* permeabilizadas con tolueno, se observó que la tasa de crecimiento celular en glucosa se duplicaba en presencia de insulina, mientras que otras hormonas no produjeron el mismo efecto. Los resultados indicaron que la insulina estaría estimulando el transporte o el metabolismo de la glucosa y para confirmarlo, se realizaron experimentos empleando un análogo no metabolizable de glucosa, el α -metilglucósido. Se observó que se incrementaba su transporte en un 50% en presencia de insulina. Por otra parte, intentaron determinar si la insulina producía algún efecto en la actividad de la adenilato ciclasa. Los resultados demostraron que al igual que ocurre en mamíferos, la actividad de esta enzima se inhibe en presencia de bajas concentraciones de insulina, aunque es estimulada considerablemente a concentraciones altas (30).

Estos resultados permiten comprobar que la insulina produce un efecto metabólico en bacterias, demostrando que su función no se limita a organismos multicelulares. Más aun, existe evidencia de la presencia de moléculas similares a la insulina de mamíferos, en cuanto a su actividad biológica e inmunoreactiva en *E. coli*. Los experimentos realizados por LeRoith y cols. (31) sugirieron que el material encontrado era improbablemente proinsulina y, de hecho, que era similar a la insulina en cuanto a su forma y tamaño. Por otra parte, la actividad de esta molécula fue neutralizada con anticuerpos anti-insulina de cerdo, descartando la posibilidad de que se tratara de un factor de crecimiento similar insulina (IGF), somatomedina, u otro material que pudiera producir efectos similares a la insulina, ya que dichas moléculas carecen de los sitios de interacción con el anticuerpo anti-insulina.

Además de lo expuesto, las bacterias poseen un complejo que se asemeja al proteasoma de eucariotas y archaeobacterias. En *E. coli* se aisló un complejo con actividad de proteasa dependiente de ATP que se asemeja a las subunidades β del proteasoma eucariótico en su secuencia proteica y función. En su funcionamiento están implicadas dos proteínas: HslV, de 19 kDa y HslU, de 50 kDa. La subunidad HslU, que actúa como chaperona, posee actividad de ATPasa, la cual es necesaria para la actividad proteolítica del complejo, llevada a cabo por la

subunidad HslV (32). El complejo HslVU es análogo del proteasoma 26S de eucariotas en cuanto posee una estructura de cuatro anillos. La subunidad HslV forma un dodecámero compuesto de dos anillos apilados de seis monómeros que, a su vez, están flanqueados por dos anillos hepta o hexaméricos de HslU (33).

En bacterias también existe una enzima homóloga a EDI, la proteasa III. Se trata de una zinc-metaloproteasa periplásmica de 110 kDa. Esta enzima degrada insulina, cortando la cadena B en dos sitios entre los residuos Tyr¹⁶-Leu¹⁷ y Phe²⁵-Tyr²⁶ (34).

Estos hechos podrían reforzar los hallazgos de moléculas símil insulina en bacterias y eucariotas unicelulares ya que, como se mencionara antes, EDI es la principal degradante de insulina en vertebrados y, por otro lado, la actividad del proteasoma es regulada por el complejo EDI-insulina.

Mitocondrias

Las mitocondrias son organelas fundamentales para el funcionamiento celular, ya que llevan a cabo la producción energética del metabolismo aeróbico en todos los tipos de células eucariotas. Su estructura cilíndrica se asemeja a la de las bacterias, con unos 3 µm de largo y 0,5 µm de diámetro, aproximadamente. Las mitocondrias poseen dos compartimentos, el espacio intermembrana y la matriz, limitados por dos membranas, externa e interna respectivamente. En la matriz mitocondrial se encuentran varias copias de ADN circular carente de histonas, trece tipos de ARN mensajero, dos de ARN ribosomal y veintidós de ARN de transferencia para los 20 aminoácidos. La membrana interna forma plegamientos hacia la matriz que reciben el nombre de crestas mitocondriales y sus dos caras son asimétricas, dado que posee una gran especialización.

Origen de las mitocondrias

Dependiendo de la especie, el tamaño del genoma mitocondrial puede variar. Por ejemplo, el genoma mitocondrial humano es de 16.569 pb de longitud, mientras que el ADN mitocondrial del protozoo *Plasmodium falciparum* posee menos de 6000 pb. Por otro lado, el genoma de las mitocondrias de muchas plantas tiene más de 200 kpb (2).

Fig. 2

EVENTOS FUNDAMENTALES DE LA EVOLUCIÓN

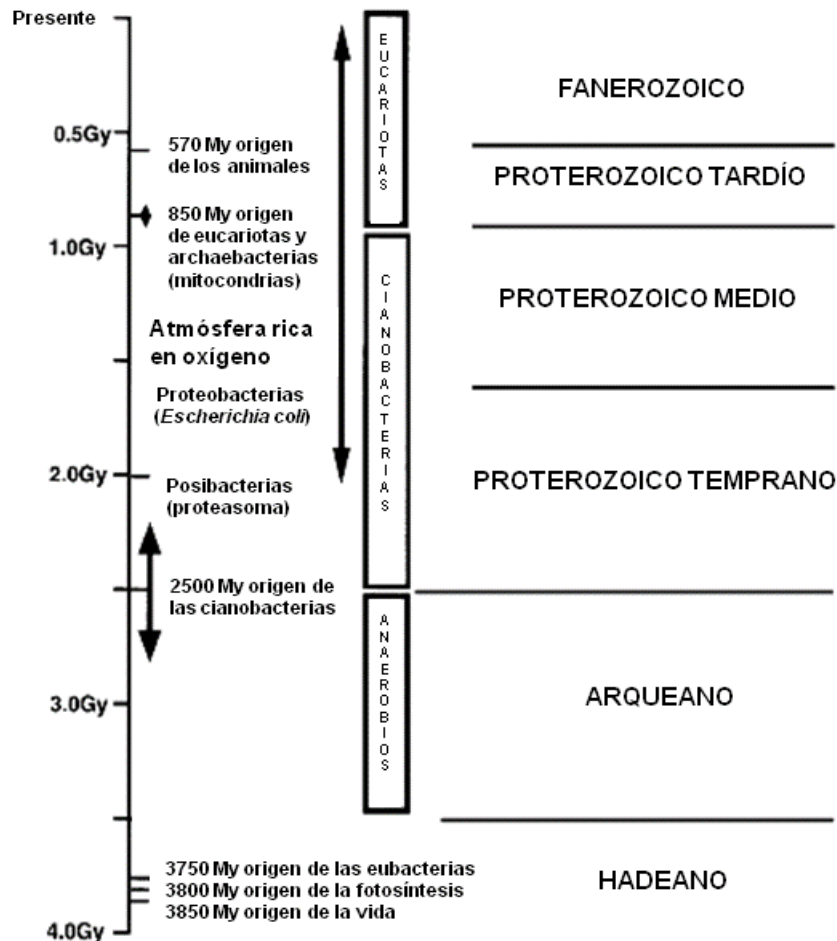


Figura 2: Eventos fundamentales de la evolución

Se muestran algunos eventos fundamentales que ocurrieron durante los distintos períodos geológicos, a partir del origen de la vida hasta la actualidad. Se ha enfatizado la aparición de las denominadas “posibacterias” como los primeros organismos portadores de estructuras similares al proteasoma, de las proteobacterias (como *Escherichia coli*), y de las mitocondrias.

Gy: 1000 millones de años. My: 1 millón de años.

Adaptado y modificado de Cavalier-Smith T (2002) J. Syst. Evol. Microb. 52: 7-76.

En su ADN las mitocondrias humanas codifican para 13 proteínas, que forman parte de los complejos de la cadena de transporte de electrones: 7 subunidades de las 46 que posee el complejo I, una subunidad (citocromo b) de las 11 del complejo III, 3 de las 13 proteínas que componen el complejo IV y 2 subunidades de las 16 que forman el complejo de la ATP sintasa (35). Sin embargo, más del 98% de las proteínas mitocondriales son codificadas por el ADN nuclear debido a que la célula eucariota y la mitocondria se han adaptado para coexistir en una relación simbiótica de mutua conveniencia, partir de un evento de endosimbiosis ocurrido hace alrededor de 850 millones de años.

Según Cavalier-Smith, las mitocondrias se originaron cuando una célula fagocitó una bacteria púrpura (no del azufre) y ésta escapó a la degradación fagosomal, permaneciendo intacta en el interior de la célula. Se hipotetiza que la conversión de este endosimbionte en una organela comenzó con la inserción de una proteína celular en su membrana interna, luego de atravesar la membrana externa. Este evento permitió la transferencia de material genético de la bacteria al núcleo celular, favoreciendo la necesidad de crear un sistema de transporte que permitiera retornar los productos de esos genes, que eran innecesarios para la célula, a su sitio original. Así, se desarrolló un sistema de inserción de proteínas con pre-secuencias (formadas por mutaciones en las copias nucleares) que las dirigían a la mitocondria y nuevas proteínas celulares se fueron incorporando en las membranas de la bacteria facilitadas por otras proteínas celulares o bien del periplasma bacteriano (36), hasta formar los complejos de translocación TOM y TIM presentes en las membranas mitocondriales externa e interna, respectivamente. Con el tiempo, los genes mitocondriales se perdieron y la supervivencia de este endosimbionte y de la célula se volvieron mutuamente dependientes.

Aunque en un principio se pensaba que la primera célula donde se originó la mitocondria era una archaeobacteria metanogénica anaerobia, mientras que la bacteria fagocitada era capaz de realizar la fosforilación oxidativa (37), Cavalier-Smith argumenta que existe una mayor probabilidad de que ambos organismos fueran aerobios facultativos. Supone que, aún así, el establecimiento de una relación mutualista beneficiaba al hospedador desde el punto de vista energético, ya que le otorgaba la posibilidad de compartimentar el proceso de respiración, permitiendo que la membrana celular quedara exenta de esta actividad para especializarse en otros mecanismos. Con respecto al endosimbionte, propone que se trataba de un organismo fotoautótrofo más que de un heterótrofo, y que esta relación le facilitaba la obtención de CO₂ producido en el metabolismo del hospedador y a su vez, la producción de fotosintatos era aprovechada por la célula. Luego, esta bacteria perdió la capacidad de fotosintetizar (36).

Además de su forma y tamaño, las mitocondrias poseen características similares a las de las bacterias, como la existencia de una doble membrana, con la presencia de numerosas porinas en la membrana externa, mientras que las bombas de protones y los complejos

sintetizadores de ATP se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias y en la correspondiente membrana plasmática de las bacterias. El hecho de que las mitocondrias contengan su propio ADN circular y sean capaces de sintetizar ARNs y proteínas esenciales para su funcionamiento también da pauta de su previa existencia como organismos independientes. Además, las mitocondrias se reproducen por fisión binaria, a partir de mitocondrias preexistentes, del mismo modo en que lo hacen las bacterias.

Funciones de las mitocondrias

Entre muchas otras funciones de señalización y síntesis de compuestos orgánicos indispensables, en la matriz mitocondrial ocurre la descarboxilación oxidativa del piruvato generado durante la glucólisis, llevada a cabo por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc). Otras actividades importantes que ocurren en la matriz son la β -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs. En la membrana interna se ubican los complejos que componen la cadena transportadora de electrones: complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa), complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa o citocromo b-c₁) y complejo IV (citocromo c oxidasa). A continuación se encuentra el complejo ATP sintasa, encargado de la fosforilación oxidativa que produce ATP.

La mitocondria es una organela multifuncional que no solo es esencial para la producción de energía sino que también es capaz de remover el Ca²⁺ citosólico cuando las concentraciones son demasiado elevadas, ya que en la membrana interna posee una Ca²⁺-ATPasa que bombea Ca²⁺ desde el citosol hacia la matriz. Por otro lado, las mitocondrias, principalmente las mitocondrias hepáticas, son capaces de llevar a cabo las primeras etapas de síntesis de algunos aminoácidos. En algunas células de la corteza suprarrenal y las gónadas las mitocondrias también tienen función esteroidogénica (1).

Estas organelas también intervienen en el proceso de apoptosis, que se inicia con la apertura del poro de transición de la permeabilidad (mtPTP), un complejo que atraviesa las membranas interna y externa de la mitocondria. La apertura del poro permite el escape de proteínas desde el espacio intermembrana al citosol. La liberación del citocromo c activa una proteína citosólica, Apaf-1, que a su vez inicia una cascada de enzimas proteolíticas denominadas caspasas; las caspasas destruyen proteínas esenciales para el mantenimiento de la estructura celular. Al mismo tiempo, este proceso permite que la endonucleasa G y el factor de inducción de apoptosis AIF se dirijan al núcleo, donde destruyen el ADN celular (35).

Enzimas mitocondriales reguladas por la vía de señalización de la insulina

Varias enzimas involucradas en la vía de señalización de la insulina y de otras sustancias mensajeras se encuentran presentes en las mitocondrias, como Akt y PKC δ , que se translocan a la mitocondria cuando son activadas (38). Esto podría sugerir que la mitocondria responde a estímulos externos, como las hormonas. Actualmente se acepta que la insulina no actúa directamente en la mitocondria sino a través de intermediarios. Se sabe que el mecanismo de acción de la insulina regula dos importantes complejos enzimáticos presentes en las mitocondrias.

Uno de ellos es la deshidrogenasa de aminoácidos ramificados (BCKD). Este complejo, encargado de iniciar el proceso catabólico de dichos aminoácidos, es regulado por una quinasa específica. Esta quinasa fosforila dos residuos de serina en la subunidad E1 α de BCKD, disminuyendo su actividad. Mediante un mecanismo que involucra a PI3K y mTOR, la insulina incrementa la síntesis de la quinasa, provocando la inhibición de BCKD y, por lo tanto, inhibiendo la degradación de aminoácidos ramificados (39).

La insulina también regula el complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) que convierte el piruvato resultante de la glucólisis en acetil-CoA para que ingrese en el ciclo de Krebs. En este caso, actúa la PKC δ fosforilando a la fosfatasa específica de PDHc, que posteriormente defosforila al complejo, provocando su activación (40).

OBJETIVOS

Objetivo general

Sobre la base de los hallazgos de sustancias símil insulina en procariotas, establecer una relación evolutiva entre las bacterias y las mitocondrias, para determinar la distribución intracelular de la insulina y su presencia en mitocondrias.

Objetivos específicos

- Determinar la distribución de insulina en tejidos de rata por radioinmunoanálisis.
- Determinar la presencia de insulina en mitocondrias hepáticas de rata por radioinmunoanálisis y microscopía confocal.

HIPÓTESIS

La insulina se internaliza en los tejidos no sólo para su degradación sino porque cumple algunas funciones a nivel intracelular. Teniendo en cuenta que las mitocondrias son organelas que derivan de un endosimbionte procarionta, se establece la hipótesis de que la insulina internalizada se dirige a la mitocondria, en base a los hallazgos de sustancias símil insulina y respuesta biológica a la insulina en procariotas.

ALCANCE

Dado que sustancias símil insulina se encuentran presentes en procariotas y en eucariotas unicelulares, si se determina la presencia de insulina endógena en mitocondrias, surgirán diversos interrogantes:

Este trabajo se relaciona con las investigaciones “in vitro” que se realizan en nuestro laboratorio sobre el transporte y degradación de insulina en mitocondrias. Su importancia reside en la demostración directa de insulina en las mitocondrias “in vivo”, con sus implicancias en la fisiología celular.

MATERIALES

La insulina de cerdo fue un obsequio del Dr. Anderson (Laboratorio Beta, Bs. As., Argentina); ^{125}I Na (17,4 Ci/mg) fue de DuPont (Boston, MA, USA); N-Etilmaleimida (NEM) fue de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA); HEPES fue de Santa Cruz Laboratorios (CA, USA), suero normal de conejo fue de Lab. Alfredo Gutierrez (Bs. As., Argentina). Conejo anti-IgG de cobayo unido a FITC y Cabra anti-IgG de ratón unido a Cy3 (Zymed Lab. Carlton Court, San Francisco, CA, USA). Anticuerpo anti-EDI monoclonal de ratón 9B12 fue un obsequio de Richard A. Roth (Stanford University, Stanford, CA). SAI 4 y SAI 15 (utilizado en el estudio confocal) fueron anticuerpos anti-insulina preparados en nuestro laboratorio. El resto de las drogas fueron de grado analítico.

MÉTODOS

Fundamentos para el desarrollo de un radioinmunoanálisis (RIA)

El método de radioinmunoanálisis surgió como una nueva técnica de ensayo de unión competitiva de un antígeno con un anticuerpo que hoy posibilita la cuantificación de muchas sustancias, en particular hormonas. Utilizando anticuerpos específicos es posible detectar concentraciones muy bajas de una hormona en una muestra.

La técnica se basa en la competición entre un anticuerpo y moléculas de una hormona con moléculas de la misma hormona marcada radioactivamente en los grupos tirosina sin interferir con la inmunoreactividad o su comportamiento biológico. Si se utiliza una serie de patrones de concentraciones crecientes de la hormona en estudio, esta competición hace que disminuya progresivamente la cantidad de antígeno marcado (Ag^*) unido con respecto al antígeno frío (Ag). De esta manera, puede medirse la cantidad de hormona presente en una muestra desconocida, ya que los patrones competirán por el anticuerpo de la misma manera en que lo hace la hormona marcada. Para esto, es fundamental que la sustancia presente en la muestra y la correspondiente a la solución patrón sean idénticas, es decir que se comporten de la misma manera frente al anticuerpo.

El método se basa en la inhibición competitiva. A medida que la cantidad de antígeno no marcado se incrementa, los sitios de unión al anticuerpo se van saturando progresivamente, dejando menos posibilidades de que se unan moléculas del antígeno marcado. Al incubar el antígeno frío, el antígeno marcado y el anticuerpo, se obtiene una reacción de equilibrio dinámico que permite que las fracciones de antígeno unidas al anticuerpo se separen de las

fracciones libres. Para cuantificar la reacción, se mide la radioactividad presente en cada una de las fases (unida y libre).

Este método, desarrollado inicialmente con el fin de medir cuantitativamente insulina en suero, fue divulgado en 1960 por Solomon A. Berson y Rosalyn S. Yalow (41). A partir de ese momento, se convirtió en la técnica más ampliamente utilizada para medir no sólo insulina, sino muchas otras hormonas y sustancias.

Estudio de las variables para desarrollar un RIA de rata

Concentración del anticuerpo. Se probaron distintas diluciones (1/60000, 1/40000 y 1/30000) de una solución de anticuerpo de cobayo anti-insulina de cerdo. Se estableció la dilución de 1/30000 como la más apropiada para el ensayo.

Insulina radioactiva. En un principio se colocaron en cada tubo 10000 cpm de ^{125}I -insulina de cerdo con muy alta actividad específica. En ensayos posteriores se redujo la cantidad de actividad en cada tubo hasta aproximadamente 5000 o 3000 cpm, calculando el decaimiento radioactivo y para evitar errores en la determinación por el aumento progresivo de la masa de insulina fría con respecto a la marcación inicial.

La afinidad de la insulina marcada por el anticuerpo obligó a la purificación de la insulina en forma previa al análisis de la muestra. Esto se debe a que durante un estudio en condiciones de equilibrio transitorio, el cálculo de la masa por el decaimiento radioactivo es crítico y debe permanecer intacta la afinidad por el anticuerpo. Debido a esto fue necesario depurar sucesivamente la ^{125}I -insulina.

Dilución de la insulina de rata en las condiciones de trabajo. Se estableció una curva estándar con una dilución final de 1/20 agregando a cada tubo 100 μl de solución patrón en un volumen final de 2 ml. Posteriormente, se observó que el contador automático leía mal los tubos debido a un error de paralaje (eso se comprobó con la lectura de volúmenes variables de material marcado). Por tal motivo, se comenzó a trabajar con un volumen final de 1 ml y se usaron 50 μl de solución estándar de insulina de rata en lugar de 100 μl . Por ende, los valores de la curva no se modificaron, sino que se ajustaron al volumen final de cada tubo.

Incubación con el anticuerpo. Las soluciones estándar de insulina de rata se incubaron con una dilución 1/30000 de anticuerpo de cobayo anti-insulina de cerdo. Esta incubación se llevó a cabo durante 48 hs a 4°C. Luego del agregado de ^{125}I -insulina de cerdo, las muestras se incubaron durante 1 h en baño de hielo.

Separación. Se utilizó una mezcla de carbón-dextrán para separar la fase unida al anticuerpo (B "bound") de la fase libre (F "free"). El carbón adsorbe la porción de insulina libre, dejando en solución el complejo [insulina-anticuerpo]. A cada tubo se agregaron 0,1 ml de suero normal humano y 0,2 ml de la solución de carbón-dextrán. Luego se probaron distintos tiempos de agitación para homogeneizar la solución: 10 seg y 5 seg y el tiempo óptimo de agitación se estableció en 10 seg. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 4°C durante 15 min a 2500 rpm para separar la fracción unida de la fracción libre, la cual quedó adsorbida al carbón-dextrán al centrifugar.

Perfusión de hígados con N-etilmaleimida 2 mM

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 200-250 g (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* y se les dio un suplemento de manzana y huevo duro tres veces por semana.

Para la extracción de insulina de hígado los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y a algunos de ellos se les realizó una perfusión hepática con N-etilmaleimida (NEM) 2 mM en solución fisiológica (NaCl 0,9%). NEM es un derivado del ácido maleico, que reacciona de forma irreversible con los grupos tiol de las proteínas, dando como resultado un tioéter e inhibiendo la actividad enzimática. En este caso, se utilizó NEM para inhibir la degradación de la insulina por una enzima que la degrada específicamente (EDI). Se considera que la insulina no se encuentra libre en los citoplasmas celulares, sino unida a EDI; se supone que la concentración de insulina en células hepáticas y en mitocondrias será mayor de la que se encuentre presente en el tejido no perfundido con NEM, porque prevendría su degradación.

Se utilizaron dos grupos de animales, con los que se procedió de forma diferente previo a la perfusión. En un caso las ratas fueron sacrificadas y en otro, anestesiadas con inyección intraperitoneal de clorhidrato de ketamina 50 mg/kg, un anestésico general, no barbitúrico, de rápida acción asociado a 0,5 mg/kg de clonazepam inyectable. Los hígados se perfundieron con aproximadamente 25 ml de solución de NEM 2 mM utilizando una aguja por la vena porta hepática o por la vena cava.

Luego de la perfusión, se llevaron a cabo los pasos para la extracción de insulina como se describirá más adelante utilizando una porción del hígado removido. La mayor parte del tejido hepático se separó para la posterior extracción de mitocondrias.

Procesamiento de tejidos y extracción de insulina

Al método de extracción diseñado por Jephcott (42) se aplicaron las modificaciones introducidas por Grodsky (43) con ciertas adaptaciones.

Los animales sacrificados se diseccionaron y se extrajeron los siguientes tejidos: hígado, riñón, músculo y páncreas. Cada uno de los tejidos se pesó e inmediatamente después se colocó en un tubo cónico de 50 ml conteniendo una solución de ácido-alcohol (15 ml de HCl concentrado diluidos a 1 L en etanol 75%). Aunque el volumen mínimo requerido es de 4 ml de ácido-alcohol/g de tejido, en la mayoría de los casos se utilizó un volumen mayor para que los tejidos pudieran ser homogenizados adecuadamente.

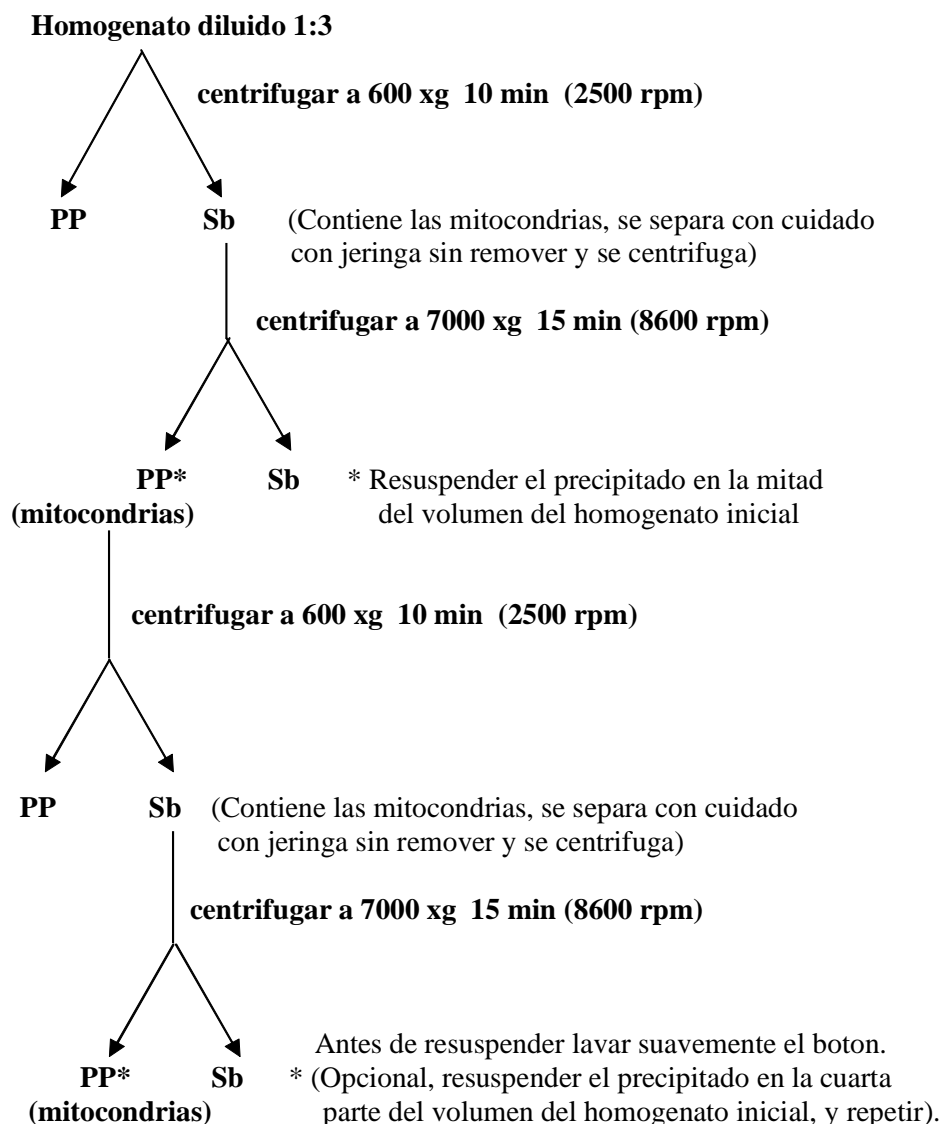
En cada tubo se agregó una cantidad definida de ^{125}I -insulina con el fin de determinar el porcentaje de recuperación de insulina intacta al final del proceso de extracción. Este agregado resulta esencial para determinar la cantidad de insulina, para evitar la subestimación en el RIA. Durante el tratamiento se pierde una cantidad de insulina en cada paso de purificación y al mismo tiempo, hay un deterioro de la insulina y se generan productos de degradación que no son detectados durante la determinación por RIA.

Posteriormente, cada tejido en solución ácido-alcohólica se procesó en un homogenizador automático de alta velocidad (IKA Works Inc, Wilmington, NC, USA) hasta su completa homogenización y se dejó en agitación durante toda la noche a 4°C. Luego, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm en centrífuga refrigerada a 4°C. Se realizó una re-extracción para recuperar la mayor cantidad de insulina posible. Para ello, el sobrenadante que contiene la insulina se separó y preservó en hielo. El precipitado se resuspendió en un volumen equivalente de ácido-alcohol y se puso a agitar durante 1 h más. La centrifugación se repitió en las mismas condiciones y se sumaron los dos sobrenadantes. Luego, se ajustó el pH a 8.5-9.0 con NaOH concentrado y se dejó toda la noche a 4°C para que precipiten las proteínas insolubles.

El sobrenadante se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm, 4°C. Se midió el sobrenadante y se agregaron 4 volúmenes de una solución de acetona-éter (1,5:2,5 v/v) para precipitar la insulina; luego se centrifugó a 4°C durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y los precipitados fueron ventilados para evaporar trazas de éter. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en buffer RIA (veronal 0,02 M, 0,25% seroalbúmina bovina, 1% suero normal de conejo, pH 8.6). El material insoluble se centrifugó nuevamente (5 min, 3000 rpm), se descartó el precipitado y los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta el día de la determinación.

Aislamiento de mitocondrias hepáticas

La extracción de mitocondrias se realizó utilizando el método de Parsons (44). Inicialmente se realizan cortes del hígado de aproximadamente 2 mm³, luego se homogeniza con un homogenizador de teflón y un volumen aproximado de 80 ml en buffer de extracción: sucrosa 70 mM, manitol 220 mM, HEPES 20 mM EDTA 1mM, pH 7.4. Luego se realiza una serie de centrifugaciones a 4°C:



El precipitado contiene las mitocondrias. Se resuspende en el mismo buffer y se homogeniza con homogenizador de vidrio con el fin de romper las mitocondrias y efectuar la extracción ácido-alcohólica. Se agrega 4 veces un volumen de ácido-alcohol al volumen de buffer mitocondrial y finalmente la muestra se sonifica 5 min a temperatura ambiente. Luego se continúa con el mismo procedimiento ya descrito para la extracción de insulina en los tejidos.

Estudio de la calidad de la insulina

Para estimar el porcentaje de insulina intacta al final de la extracción, las muestras se trataron con ácido tricloroacético (TCA) 5%. En estas condiciones se analizó la insulina extraída y la ^{125}I -insulina agregada al principio de la extracción. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 min, 2500 rpm. El porcentaje de insulina intacta se determinó midiendo la radioactividad precipitada.

El TCA precipita proteínas e insulina quedando en el sobrenadante los fragmentos de la hormona. La metodología es simple y se ha difundido por ese motivo, aunque presenta diferencias con la calidad de insulina determinada por otros métodos (anticuerpos, filtración en gel, unión a receptores). Los resultados se utilizaron para corregir los valores de recuperación de insulina, ya que no la totalidad de ^{125}I -insulina que se agrega al inicio se recupera en su estado nativo y biológicamente activo.

Microscopía electrónica de mitocondrias aisladas

Una muestra de la suspensión de mitocondrias recuperadas a 37°C, durante 15 min. con oxígeno 100%, en buffer mitocondrias (manitol 0,25 M, HEPES 20 mM, fosfato de potasio 5 mM, cloruro de magnesio 5 μM , ditioneitol 1 mM, coenzima A 50 μM , cocarboxilasa 50 μM y albúmina desgrasada 1 mg/ml) se centrifugó 10 minutos a 10000 xg. El precipitado se fijó durante 45 min a 4°C en glutaraldehído 3% y p-formaldehído 5% en buffer cacodilato de sodio 0,1 M, pH 6.9 con MgCl_2 0,01 M y CaCl_2 0,01 M. Luego, las muestras se lavaron con el mismo buffer y se fijaron 1 h a 4°C con tetróxido de osmio 1% en buffer cacodilato, se lavaron nuevamente y se tiñeron con una solución 70% de uranilacetato, se deshidrataron y se introdujeron en una resina epoxy durante la noche. Se realizaron cortes de 1 μm , que fueron teñidos con uranilacetato alcohólico saturado y subnitrito de bismuto. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) a 80 Kv.

Estudio confocal del comportamiento de la insulina endógena en mitocondrias

Una muestra de mitocondrias obtenidas y recuperadas como se describió más arriba, fueron sometidas a un estudio confocal. Para ello los precipitados de mitocondrias aisladas se deshidrataron luego de la fijación mediante sucesivos pasos en concentraciones crecientes de alcohol. Se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3-4 μm y se colocaron en placas Superfrost-Plus (Corning Glass, One Riverfront Plaza Corning, NY, USA). Se eliminó la parafina y las muestras se lavaron y se cubrieron con buffer PBS, pH 7. Luego de dos lavados en PBS, las muestras se cubrieron con un anticuerpo específico de cobayo anti-insulina (dilución 1/10000) o con un anticuerpo monoclonal específico de ratón anti-EDI (dilución 1/750) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego del lavado, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios: conejo anti-IgG de cobayo unido a FITC (Zymed Lab. Carlton Court, San Francisco, CA, USA) o cabra anti-IgG de ratón unido a Cy3 (Zymed Lab. Carlton Court, San Francisco, CA, USA), durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Los estudios de microscopía láser confocal se realizaron con Olympus FV300 (Olympus America Inc, Corporate Parkway, Center Valley, PA, USA) con 3 láseres: Argón 488 nm, Helio-Neón verde 543 nm, Helio-Neón rojo 633 nm; 2 objetivos de inmersión (UplanApo, 40X y PlanApo, 60X), escáneres 3D (XYZ, vectorial-Z) con aumentos de 0,025 μm en Z y zoom de 2,5X y 3X. Las imágenes fueron obtenidas con el software FluoView versión 3.3 y filtro Kalman.

Análisis estadístico

Se realizaron los estudios estadísticos con el programa GraphPad Prism, versión 4. Se consideró entre 2 variables una diferencia estadísticamente significativa en el test t de Student cuando el valor fue 5% o menor.

RESULTADOS

Desarrollo de un RIA para determinación de insulina de rata

Como se describió en la sección de “materiales y métodos”, se establecieron las condiciones apropiadas para realizar las determinaciones de insulina en tejidos y mitocondrias por radioinmunoanálisis:

Se realizó una dilución de 1/20 de los estándares de insulina de rata y las muestras se incubaron con un anticuerpo anti-insulina de cerdo en una concentración de 1/30000. Los patrones y las muestras desconocidas se incubaron durante 48 hs con el anticuerpo a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se agregó el antígeno radioactivo (insulina de cerdo), cuya actividad se ajustó según el tiempo transcurrido desde el día de la marcación, teniendo en cuenta el decaimiento del ¹²⁵I. Luego de una hora de incubación en baño de hielo se agregó 0,1 ml de suero normal humano para facilitar la separación de las fracciones B/F. Ambas fracciones se separaron con 0,2 ml de carbón-dextrán y centrifugaron a 4°C durante 15 min a 2500 rpm.

Todas estas condiciones fueron evaluadas para obtener la curva de dosis-respuesta de mayor reproducibilidad y sensibilidad. La curva que más asegura la calidad de un ensayo debe tener un valor entre el 25 y 30% de unión en el punto cero y una pendiente empinada. En este caso, se comenzó con una dilución del anticuerpo de 1/60000 para experimentalmente llegar a una concentración de 1/30000. Aumentando la concentración del anticuerpo, aumenta el porcentaje de captación, ampliando la posibilidad de competición con el antígeno frío (esto es importante ya que a medida que la dosis de antígeno frío se incrementa la respuesta es menor). Sin embargo, si la concentración del anticuerpo es demasiado alta se observará un *plateau* a dosis bajas del antígeno. Por otro lado, si se eleva la concentración del trazador (masa de antígeno marcado), se obtendrá una curva con una pendiente demasiado pequeña (45).

La elección del anticuerpo que se utilizó en los ensayos se realizó en base a pruebas realizadas con anterioridad con una serie de anticuerpos. Como ejemplo, en la figura 3 se presentan dos anticuerpos diferentes (SAI: suero anti-insulina), ambos obtenidos de cobayos inoculados con insulina de cerdo.

Fig. 3

ESTUDIO DE LOS ANTICUERPOS

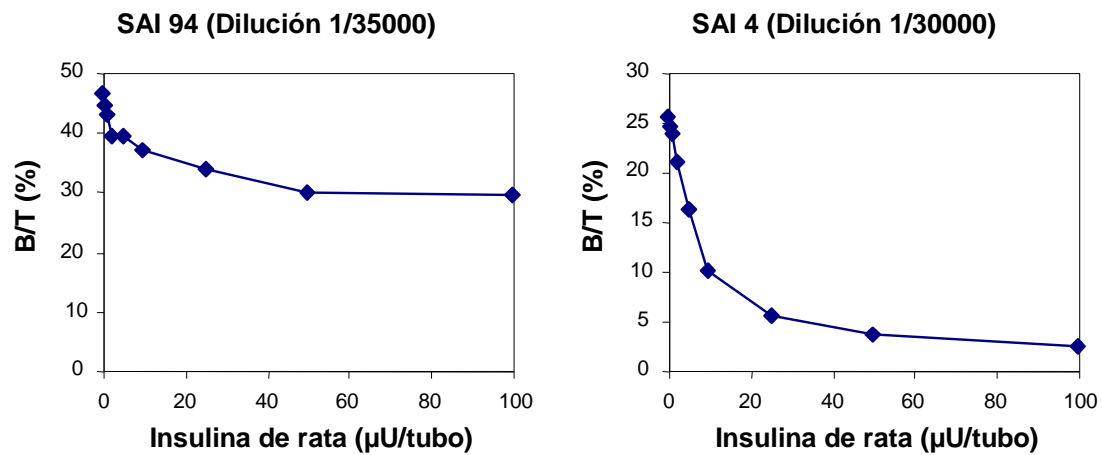


Figura 3: Estudio de los anticuerpos

Se comparan dos curvas de dosis-respuesta en las que se prueban dos anticuerpos distintos, ambos de cobayo, anti-insulina de cerdo. En los dos casos, los estándares de insulina de rata se incubaron con el anticuerpo 48 hs. Luego del agregado de insulina radioactiva se incubaron 1 h. SAI: suero anti-insulina.

El SAI 94 tiene una baja afinidad por el antígeno (insulina de rata) y se observa muy poco desplazamiento, obteniéndose una curva de dosis-respuesta con una competición muy deficiente. La concentración del anticuerpo es elevada con un valor B/T (Ag^* unido/ Ag^* total) alto pero una mayor dilución redujo el B/T pero aplanó la curva (disminuyó la competencia entre el antígeno frío y el marcado, no mostrado). Con este anticuerpo se obtendrían resultados inexactos y poco reproducibles. Por el contrario, el SAI 4 mostró tener un desplazamiento adecuado para el radioinmunoanálisis, ya que el ligando frío y el marcado compiten por los sitios de unión en las condiciones establecidas. Con él se obtuvo una curva con un porcentaje de captación útil y que, además de iniciar con un porcentaje alto de B/T tiene un desplazamiento competitivo amplio, lo que significa una buena sensibilidad. Así, es posible realizar un radioinmunoanálisis que permite determinar distintas concentraciones de las muestras con mayor precisión y sensibilidad.

Fig. 4
CURVA ESTÁNDAR DE INSULINA DE RATA

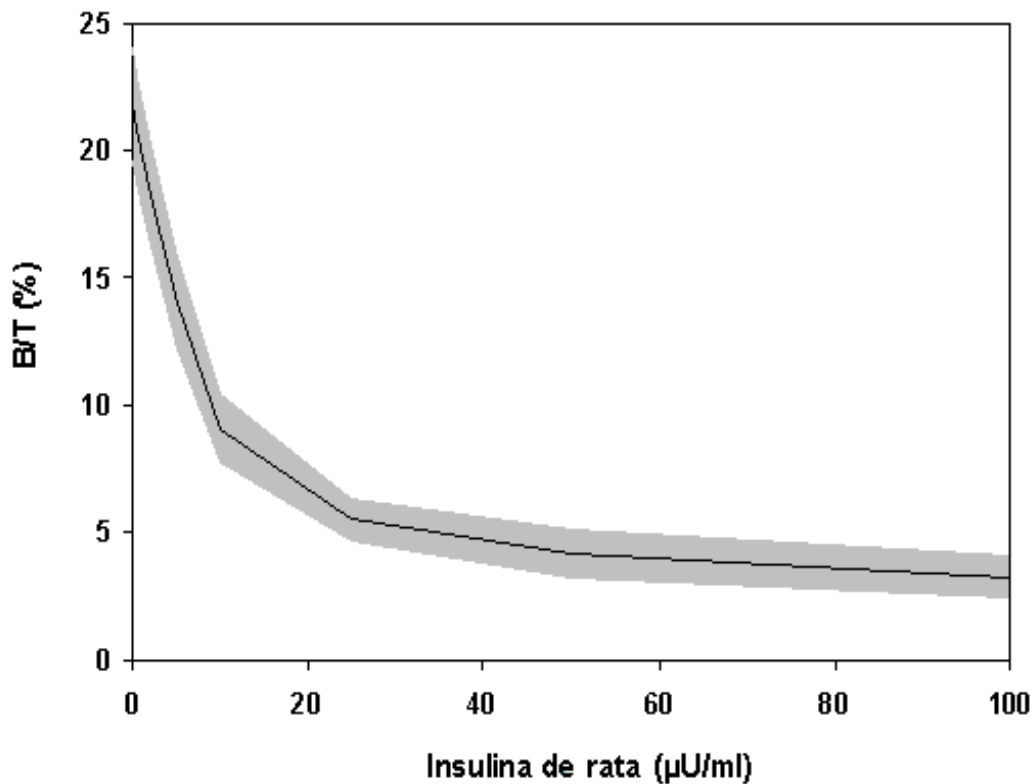


Figura 4: Curva estándar de insulina de rata

Curva estándar obtenida a partir del promedio de 8 curvas realizadas utilizando una dilución de 1/30000 del anticuerpo seleccionado. Los patrones de insulina de rata se incubaron durante 48 hs con el anticuerpo, y luego del agregado de 125 I-insulina de cerdo se incubaron 1 h más. El área sombreada representa $\bar{X} \pm 1$ desvío estándar. (25 µU = 1 ng)

Suero normal de rata (control): Se utilizaron 2 muestras distintas de suero normal de rata para calcular el coeficiente de variación (CV) de las determinaciones del RIA.

\bar{X} SNR 1: $116,82 \pm 7,65$ CV = 0,16 (n = 6)

\bar{X} SNR 2: $82,48 \pm 8,19$ CV = 0,24 (n = 6)

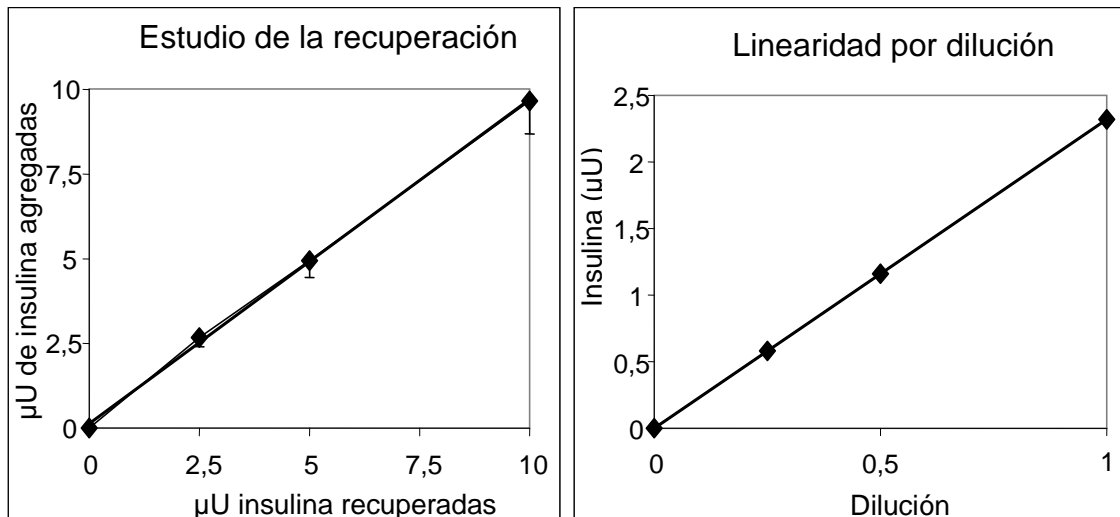
En la figura 4 se muestra una curva estándar de insulina de rata, que representa el promedio de 8 curvas que se utilizaron para realizar las determinaciones de insulina en las muestras. Como se mencionó previamente, el radioligando utilizado en los ensayos es ^{125}I -insulina de cerdo, los patrones son de insulina de rata, el desconocido es suero y extractos de tejido y de mitocondrias hepáticas de rata y el anticuerpo es de cobayo anti-insulina de cerdo. Al incubar el estándar de rata durante 48 hs con el anticuerpo se alcanza el equilibrio (un equilibrio de reacción suficiente para una competición con la insulina marcada de cerdo). Luego, al incorporar la insulina radioactiva que posee una mayor afinidad por el anticuerpo, el sistema se incuba durante 1 h y la competición transitoria que se produce es de tal grado que es posible obtener una curva de dosis-respuesta sensible y precisa. El desconocido debe ser tratado en las mismas condiciones de incubación y separación que el estándar de rata.

Determinaciones de insulina en tejidos y mitocondrias hepáticas de rata

En la figura 6 se muestran las concentraciones de insulina de rata en hígado, músculo, riñón y páncreas. Se representa el promedio de las determinaciones para cada tejido expresadas en ng/g de tejido. Los valores de insulina en hígado corresponden a las determinaciones realizadas con hígados sin NEM. La escala de la derecha refiere la concentración de insulina en páncreas expresada también en ng/g.

Considerando sólo los tejidos extrapancreáticos, la concentración de insulina fue mayor en riñón que en el resto de los tejidos analizados. A su vez, la concentración de insulina en músculo fue mayor que en hígado. Para cada tejido, se representa la concentración de insulina determinada de forma directa en el radioinmunoanálisis (columnas celestes), y la misma concentración corregida por el porcentaje de insulina que se pierde durante la extracción (columnas violetas). Como se describe en la sección de "materiales y métodos", la pérdida de insulina durante la extracción se calcula como porcentaje de ^{125}I -insulina agregada inicialmente que no se recupera al final de la extracción. Los valores también fueron corregidos por el porcentaje de precipitación en TCA 5%, teniendo en cuenta que de toda la insulina que se recupera al final de la extracción ácido-alcohólica, un porcentaje no es insulina intacta, sino probablemente fragmentos de la hormona, que no son reconocidos por el anticuerpo en el RIA. De todas formas, en la mayoría de los casos, la precipitación de la insulina recuperada al final del proceso fue mayor al 90%, indicando que con cada paso de la extracción se selecciona insulina intacta.

Fig. 5

ESTUDIO DE LA PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD DEL RIA**Figura 5: Estudio de la precisión y reproducibilidad del RIA**

Izquierda: Se muestra un gráfico correspondiente a la recuperación de insulina en el RIA, es decir μU de insulina agregadas (solución patrón de insulina de rata) Vs. μU de insulina recuperadas según los valores determinados en la curva estándar, lo cual demuestra la precisión del ensayo desarrollado en este trabajo. n: 3

Derecha: La reproducibilidad del RIA se aprecia en la linealidad observada utilizando volúmenes crecientes de suero de rata en la determinación, ya que a medida que se incrementa la dosis, se obtiene una respuesta lineal de los valores de insulina determinados en el ensayo. n: 2

Fig. 6

DETERMINACIÓN DE INSULINA EN TEJIDOS DE RATA

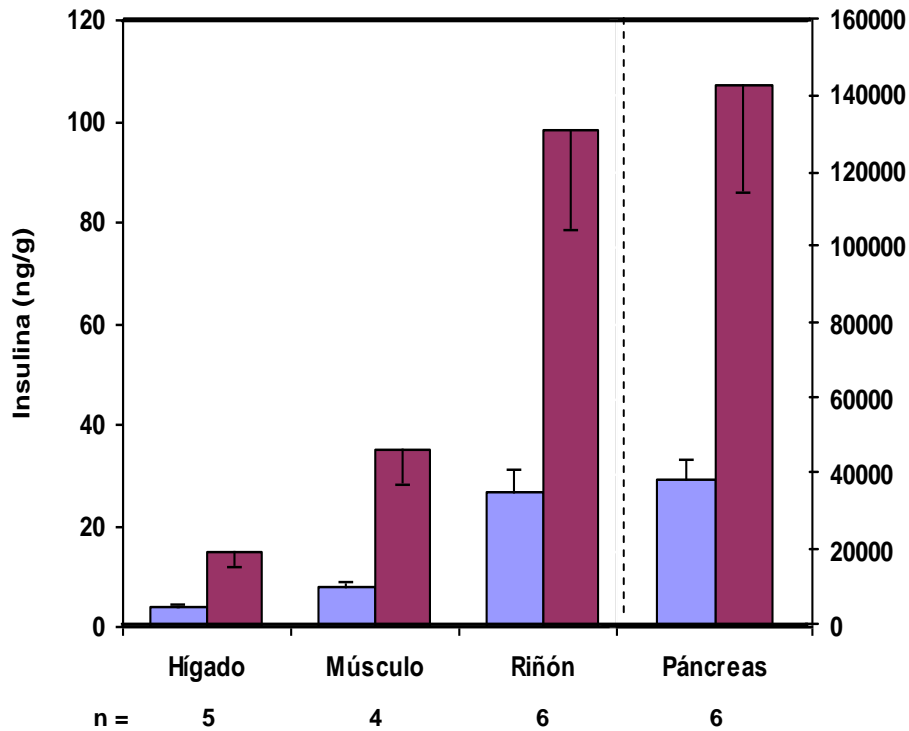


Figura 6: Determinación de insulina en tejidos de rata

Columnas celestes: Determinación directa de insulina sin recuperación.
Columnas violetas: Determinación de insulina total corregida por la recuperación. \pm : $\bar{X} \pm ES$

Columnas celestes - Hígado: 3.83 ± 0.66 ; Músculo: 7.84 ± 1.12 ; Riñón: 26.87 ± 7.83 ; Páncreas: 38643 ± 7439

Columnas violetas - Hígado: 14.82 ± 0.97 ; Músculo: 35.25 ± 11.31 ; Riñón: 98.28 ± 29.66 ; Páncreas: 142907 ± 48990

Fig. 7

DETERMINACIÓN DE INSULINA EN HÍGADO

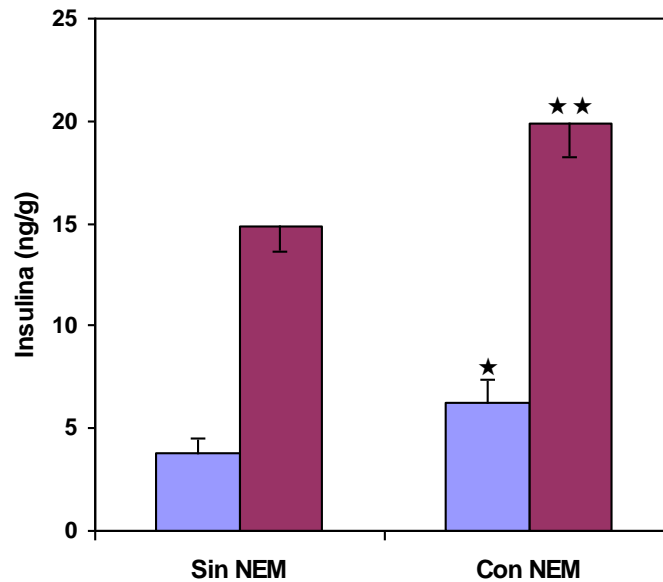


Figura 7: Determinación de insulina en hígado de rata

Se comparan las concentraciones de insulina halladas en hígados sin y con N-Etilmaleimida (NEM) 2 mM. Columnas celestes: Determinación directa de insulina sin recuperación. Columnas violetas: Determinación de insulina corregida por la recuperación. \perp : $\bar{X} \pm ES$

Columnas celestes – Sin NEM: 3.83 ± 0.66 (n: 5); Con NEM: 6.30 ± 0.69 (n: 6)
★ $p < 0.02$

Columnas violetas – Sin NEM: 14.82 ± 0.97 (n: 5); Con NEM: 19.83 ± 1.89 (n: 7)
★★ $p < 0.04$

En la figura 7 se comparan las concentraciones de insulina determinadas en hígado sin perfundir y en hígado perfundido con N-etilmaleimida (NEM) 2 mM. Las columnas celestes representan el promedio de las determinaciones directas en el RIA, mientras que las columnas violetas representan los valores de insulina corregida por su recuperación. Se observan diferencias significativas entre las determinaciones directas de insulina en hígados sin NEM y con NEM ($p < 0.02$). Lo mismo se observa cuando se comparan dichos valores corregidos por la recuperación de insulina durante la extracción ácido-alcohólica ($p < 0.04$). Las concentraciones de insulina en hígados perfundidos con NEM fueron equivalentes en animales con y sin anestesia (no mostrado).

En la figura 8 se observan los valores de concentración de insulina en mitocondrias hepáticas de rata extraídas de hígados sin perfundir y perfundidos con NEM 2 mM. En este caso, se muestran directamente los valores de insulina corregidos por la recuperación y se refieren en $\mu\text{U}/\text{mg}$ de proteínas mitocondriales totales (la determinación de proteínas se realizó utilizando el método de Lowry) (46). En la figura se evidencia un aumento significativo de la concentración de insulina en mitocondrias con NEM ($p < 0.05$) con respecto a las mitocondrias sin NEM.

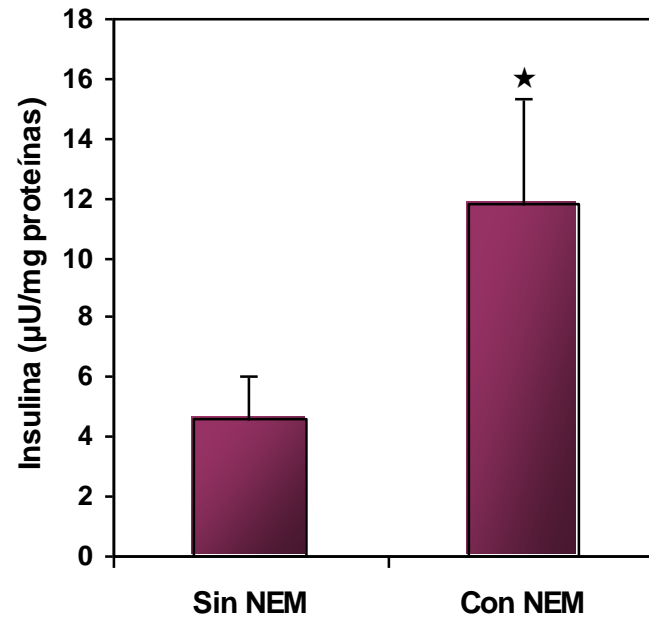
Estudios de microscopía de insulina en mitocondrias

En la figura 9 se observa una imagen obtenida con un microscopio electrónico de transmisión de mitocondrias aisladas de hígado de rata. Se observan las mitocondrias intactas y fragmentos de membrana pertenecientes, probablemente, a retículo endoplasmático rugoso.

Las mitocondrias aisladas se utilizaron para realizar un estudio de microscopía láser confocal con anticuerpos asociados a fluorocromos. Como se describe en la sección de "materiales y métodos", se utilizaron dos anticuerpos: un anticuerpo monoclonal específico de ratón anti-EDI y un anticuerpo específico de cobayo anti-insulina. Las muestras fijadas y preparadas se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y anti-IgG de cobayo están asociados a Cy3 (fluorescencia roja) y FITC (fluorescencia verde), respectivamente.

Fig. 8

DETERMINACIÓN DE INSULINA EN MITOCONDRIAS

**Figura 8: Determinación de insulina en mitocondrias hepáticas de rata**

Se comparan las concentraciones de insulina halladas en mitocondrias extraídas de hígados sin perfundir y perfundidos con N-Etilmaleimida (NEM) 2 mM. Los valores se refieren en µU/mg de proteínas totales y se representan corregidos por la recuperación. \pm : $\bar{X} \pm ES$

Sin NEM: 4.62 ± 1.65 (n: 5); Con NEM: 11.81 ± 3.28 (n: 6) $\star p < 0.05$

Fig. 9
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE
MITOCONDRIAS AISLADAS

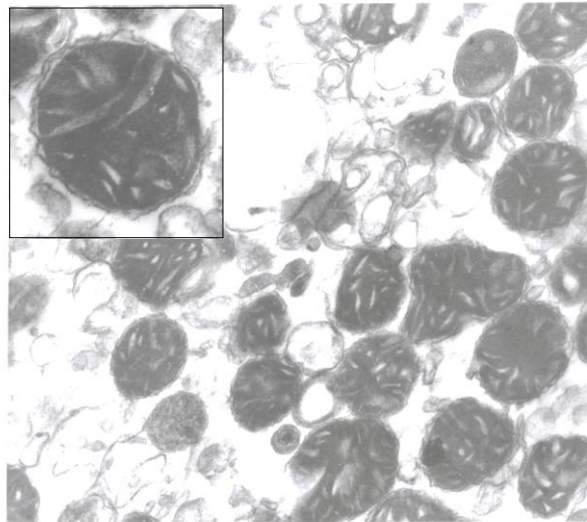
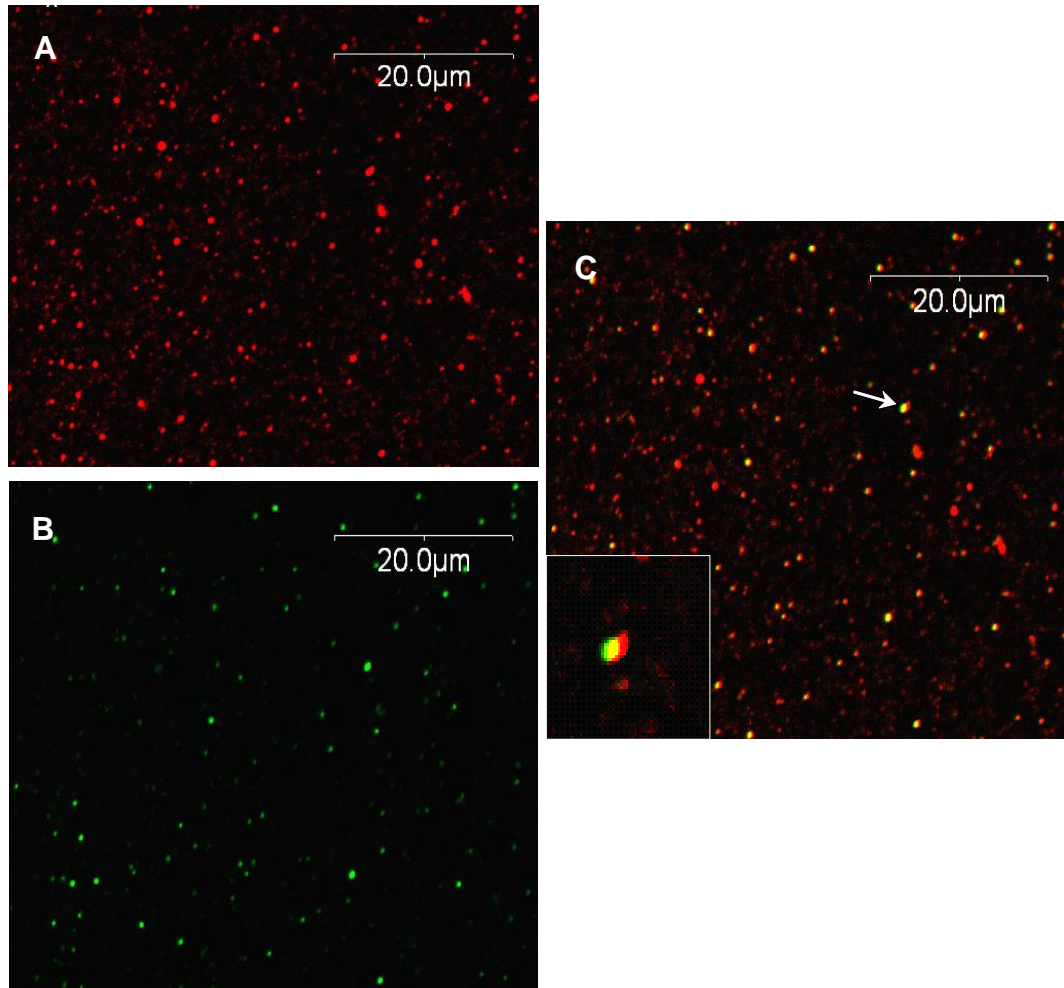


Figura 9: Microscopía electrónica de mitocondrias aisladas

Se observa un grupo de mitocondrias aisladas como se describe en la sección de “materiales y métodos”, con su doble membrana (TEM: 25000X). En la imagen interna se muestra una mitocondria amplificada (TEM: 50000X).

Fig. 10

ESTUDIOS CONFOCALES EN MITOCONDRIAS

**Figura 10: Estudios confocales en mitocondrias**

Se observan mitocondrias aisladas luego de la incubación con anticuerpos fluorescentes (ver “materiales y métodos”). **A.** En rojo se observan las mitocondrias incubadas con un anticuerpo anti-EDI. **B.** Se muestra la misma imagen utilizando un anticuerpo anti-insulina (mitocondrias en verde). **C.** Superposición de ambas imágenes (*merge*); las mitocondrias se ven de color amarillo, debido a la proximidad de las moléculas en estudio (EDI e insulina).

Las mitocondrias se obtuvieron con aumento 60X y zoom 6X. La imagen interna muestra una mitocondria tomada en estas condiciones y amplificada 4 veces en la computadora.

En la figura 10 se observa la misma imagen reproducida utilizando distintas líneas de emisión. En la figura 10A se observa la fluorescencia roja del anticuerpo secundario anti-EDI, mientras que la figura 10B es la misma imagen pero se observa una cantidad menor de mitocondrias en color verde, que corresponde con el fluorocromo asociado al anticuerpo secundario anti-insulina. Es decir que en condiciones basales (ratas ayunadas 12 hs) la concentración de insulina es menor que la de EDI. En la figura 10C se ven las figuras 10A y 10B superpuestas (*merge*), de manera que las mitocondrias se ven de color amarillo. Sin embargo, no se observan mitocondrias de color verde. Esto indica que la insulina y EDI se encuentran muy próximas entre sí, demostrando su co-localización en las mitocondrias.

DISCUSIÓN

Introducción

El objetivo de este trabajo parte de los conocimientos sobre biología evolutiva que se refieren a los cambios y adaptaciones que sufrieron los seres vivos desde los orígenes de la vida. A partir del surgimiento de las primeras células (procariotas) la evolución permitió el desarrollo de una vasta diversidad de organismos. Las primeras células eucariotas adquirieron la capacidad de comunicarse y agruparse para formar colonias dentro de las cuales se desarrollaron funciones específicas. De esta manera se formaron los primeros tejidos y posteriormente los órganos y sistemas. Dentro del reino animal, los mamíferos representan el mayor grado de complejización y organización.

Las hormonas peptídicas son mensajeros que transmiten señales entre células, tejidos u órganos. La insulina es una hormona anabólica sintetizada por el páncreas de los vertebrados e implicada en diversos procesos esenciales del metabolismo. Los invertebrados, como los nematodos, moluscos e insectos poseen péptidos relacionados con la insulina que son sintetizados en el sistema nervioso central. INS-6, uno de los polipéptidos símil insulina caracterizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, posee una estructura terciaria muy similar a la insulina humana, aunque sus secuencias aminoacídicas sean muy diferentes (19). Las vías de señalización desencadenadas por estos péptidos símil insulina poseen componentes homólogos a los que forman parte en el mecanismo de acción insulínica en mamíferos (18) y sus efectos están relacionados con el desarrollo, la supervivencia y la reproducción. El aumento de la concentración de azúcares en la sangre es un mecanismo de adaptación de los insectos que favorece la supervivencia durante los períodos de bajas temperaturas. En *Drosophila* los péptidos símil insulina (designados DILPs) también regulan las concentraciones de azúcares en la hemolinfa, de los cuales la trehalosa es el azúcar predominante (47, 48).

En eucariotas primitivos, como protozoos y hongos también se han encontrado sustancias muy semejantes a las hormonas de los mamíferos. En el protozoo *Tetrahymena pyriformis*, investigaciones sobre el hallazgo de una molécula símil insulina (25) y de una proteína semejante a la relaxina (una hormona perteneciente a la superfamilia de la insulina, asociada a la reproducción en animales superiores), sugieren que genes separados para las dos hormonas han existido desde el principio de la vida, y que sus productos génicos habrían provisto el potencial para el desarrollo de la complejidad en organismos multicelulares (49). Del mismo modo, se ha propuesto que las diversas sustancias semejantes a hormonas halladas en organismos eucariotas unicelulares originalmente cumplían funciones de comunicación

intercelular (50).

La insulina intracelular se encuentra asociada a la enzima degradante de insulina (EDI). EDI se encuentra presente en muchas especies. Esta enzima no sólo degrada la hormona, sino que está íntimamente implicada en algunas de sus funciones. Por ejemplo, la degradación de insulina por EDI aparentemente cumple un rol regulatorio en la actividad del proteasoma (15). El proteasoma es un complejo proteico encargado de la degradación de proteínas presente en todas las células eucariotas y en el dominio Archaea. Se ha determinado la existencia de complejos proteolíticos análogos en bacterias como *Escherichia coli* (32, 33), y en diversas especies de cianobacterias y proteobacterias (51), que se originaron entre 2500 y 850 millones de años atrás (Fig. 2).

En la bacteria *Escherichia coli* se han caracterizado proteasas capaces de hidrolizar insulina. Se determinó la presencia de actividad degradante de insulina en las regiones periplásmica y citosólica de este procarionta, asociada a las enzimas denominadas Pi y Ci, respectivamente, aunque Pi es aparentemente idéntica a la proteasa III (52). La proteasa III es estructuralmente similar a EDI y de manera análoga, posee la capacidad de degradar insulina (53). En la mosca *Drosophila*, EDI cumple la función de antagonista de la vía de señalización de la insulina. La alteración de la expresión de EDI en las denominadas células productoras de insulina (localizadas en células neuroendócrinas) produce una reducción en el tamaño del organismo, y altera la fecundidad y la longevidad (54).

En base a estos hallazgos sobre la degradación de la insulina en bacterias, y teniendo en cuenta el vínculo existente entre bacterias y mitocondrias, Desautels y Goldberg (55) estudiaron la degradación de proteínas en la mitocondria. Lo que demostraron fue que las proteasas presentes en estas organelas, encargadas de degradar proteínas mitocondriales, también tienen la capacidad de degradar insulina, y observaron que la mayor parte de la actividad degradante de insulina independiente de ATP estaba presente en la matriz mitocondrial.

Discusión de la metodología

Considerando todo lo expuesto, en este trabajo se propuso el estudio de la distribución de la insulina tisular endógena en la rata, como base para fundamentar la hipótesis de que la insulina endocitada en los tejidos se dirige a la mitocondria. Para la concreción de este proyecto, debió desarrollarse una herramienta apropiada para la determinación de insulina en tejidos y mitocondrias hepáticas de rata.

La técnica de RIA se basa en una reacción fisicoquímica que depende de la constante de afinidad del anticuerpo por el antígeno, la temperatura y el tiempo de incubación. Es un modelo de equilibrio transitorio, que para su confiabilidad requiere del mantenimiento de las variables en forma constante. Por otro lado, a medida que la ^{125}I -insulina decae, la masa de insulina fría aumenta en forma gradual haciendo que los ensayos pierdan reproducibilidad.

El RIA puede realizarse de diferentes formas, agregando los distintos componentes del ensayo a distintos tiempos. En el caso de incubación del antígeno combinado (marcado y no marcado) el equilibrio final se alcanza por competencia estable y lo que se debe buscar es el punto final de equilibrio. Si se incuban el antígeno frío con el anticuerpo hasta que se alcance el equilibrio dinámico y el antígeno marcado se incorpora luego, se obtiene una curva más sensible que incubando con el antígeno frío y el marcado al mismo tiempo. La razón es que el antígeno marcado debe competir por su unión al anticuerpo con un antígeno en equilibrio previo por la incubación efectuada (en este caso de 48 hs) y desplazarlo.

En el primer caso, la sensibilidad dependerá de la masa del trazador, de la constante de afinidad del anticuerpo y el tiempo de incubación para llegar al equilibrio. En el segundo caso la constante de afinidad del anticuerpo y la masa del trazador intervienen igualmente, pero el equilibrio entre el antígeno frío y el marcado difieren, por lo cual el equilibrio alcanzado es transitorio y refleja la afinidad del anticuerpo por los antígenos colocados en diferentes momentos. Esta característica fisicoquímica es la que permite usar antígenos diferentes en las determinaciones hormonales, siempre que el patrón estándar y el desconocido coincidan en su competencia con el antisuero. La determinación se realiza en equilibrio transitorio y es sumamente reproducible (Fig. 5).

El laboratorio dispone de anticuerpos anti-insulina preparados hace tiempo para diferentes tipos de insulina y con diferentes constantes de afinidad. En los ensayos realizados para determinar insulina en tejidos de rata se probó con un anticuerpo anti-insulina de cerdo, con una constante de afinidad del orden de 10^{-9} M.

En este trabajo se logró establecer las condiciones óptimas para la obtención de un método preciso y reproducible para cuantificar insulina en tejidos y mitocondrias de rata. Se utilizaron dos muestras diferentes de suero de rata con un error estándar pequeño y un coeficiente de variación bajo, lo que demuestra la reproducibilidad de la técnica empleada.

Las concentraciones de insulina en tejidos de rata determinadas por el RIA diseñado en este trabajo son comparables a las obtenidas por Rosenzweig y cols. (56), con una concentración de la hormona mayor en riñón que en el resto de los tejidos extrapancreáticos, como se demuestra en la Fig. 6. La recuperación de insulina durante la extracción en ácido-

alcohol, calculada como el porcentaje de ^{125}I -insulina recuperada al final del proceso, fue mayor en el tratamiento de las mitocondrias que en los tejidos. En hígados y mitocondrias se calculó el porcentaje de insulina que se pierde en los sucesivos pasos de la extracción. En promedio, luego de la extracción ácido-alcohólica durante la noche y la re-extracción durante 1 hora se pierde aproximadamente el 55% de la actividad en hígados y el 30% en mitocondrias. Sin embargo, como no se estudió la calidad de la insulina no puede afirmarse qué porcentaje de la actividad perdida era insulina intacta.

Cuando los precipitados obtenidos luego del tratamiento con éter-acetona, previamente a las determinaciones se resuspenden en buffer RIA con pH alcalino, se forma un precipitado insoluble que se elimina por centrifugación. En promedio, en este paso se pierde un 10% de actividad en los extractos de hígado y un 3% en los extractos de mitocondrias. Probablemente se trate de fragmentos de insulina, no de insulina intacta.

Discusión de los resultados

Los niveles intracelulares de insulina están distribuidos de acuerdo a la posición anatómica del tejido (hígado por ej.) y al flujo plasmático tisular (riñón por ej.) que modifican la concentración de insulina respecto de otros tejidos. Esto hace que en estos tejidos haya una correlación directa entre la concentración tisular de insulina y su concentración plasmática. En experimentos realizados in vivo con inyección de ^{125}I -insulina, se observó esta distribución intracelular de la insulina en la rata. Los estudios experimentales demuestran que la insulina se une a su receptor y se transloca al interior celular en forma dependiente de la concentración de insulina(57). La insulina internalizada rápidamente se asocia con organelas intracelulares, como endosomas, retículo endoplasmático, núcleo, etc. y puede mantenerse a concentraciones intracelulares mayores a la insulina circulante (58). Se libera a medida que es degradada.

Los estudios de Penhos y cols. (59) en 1975 demostraron esta capacidad celular de acumulación de insulina y los estudios de Marshall y cols. (60) demostraron la existencia de la retroendocitosis como mecanismo de liberación de insulina intacta cuando la célula estuvo en contacto con altas dosis de insulina. Cresto y cols. (58) demostraron que esta insulina no solamente era inmunoreactiva sino que conservaba su actividad biológica.

En 1938, Krebs (61) determinó que la insulina no tiene efectos en el consumo de oxígeno celular. Desde entonces, se aceptó la idea de que la insulina *per se* no poseía efectos a nivel mitocondrial. Sin embargo, resultados de experimentos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la insulina por sí misma posee efectos de regulación en la actividad del

complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) (62). En el presente trabajo, la determinación *in vivo* de insulina en mitocondrias permite generar argumentos a favor de dichos hallazgos.

En la imagen de microscopía electrónica de mitocondrias aisladas (Fig. 9) se pueden apreciar a estas organelas con su estructura intacta y su doble membrana. Se observan fragmentos de membrana pertenecientes a retículo endoplasmático, pero no se presentan lisosomas ni peroxisomas en la muestra, indicando que el método de aislamiento utilizado permite la obtención de mitocondrias con una pobre contaminación con otras organelas que pudieran alterar la interpretación de los resultados obtenidos.

Como los estudios de microscopía electrónica sugieren una baja contaminación peroxisomal o lisosomal en las mitocondrias aisladas en nuestro laboratorio, los estudios de microscopía confocal demuestran que la insulina y EDI se co-localizan en las mitocondrias (Fig. 10). EDI es un marcador mitocondrial, ya que posee una secuencia señal que la dirige hacia la mitocondria (63), por lo tanto las imágenes observadas representan mitocondrias marcadas por el anticuerpo, ya que la contaminación mitocondrial en microscopía electrónica es baja. La insulina en el interior celular se encuentra asociada a la enzima degradante y como se expusiera en la introducción a este trabajo, la asociación de ambas es aparentemente fundamental para que la hormona lleve a cabo sus funciones intracelulares.

En experimentos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, se determinó que EDI es capaz de actuar como un transportador de insulina hacia el interior de la mitocondria. Más aún, se estudió la incorporación de insulina en la matriz mitocondrial y se observó que en presencia de la enzima, esta incorporación se incrementa significativamente. Los resultados obtenidos indicarían que la insulina se acumula en la mitocondria en una forma dependiente del tiempo y la concentración enzimática (64).

Esta capacidad de acumulación celular de insulina es la que se estudió en el presente trabajo. Debido a que NEM inhibe la degradación de insulina (65), las concentraciones de insulina en hígados perfundidos son significativamente mayores que en hígados sin perfundir, como se observa en la Fig. 7, y este efecto se observa también en las mitocondrias. Como puede apreciarse en la sección de “resultados”, con respecto a las concentraciones halladas en mitocondrias hepáticas, se observan diferencias significativas entre los valores obtenidos en mitocondrias extraídas de hígados no tratados y en mitocondrias extraídas luego de la perfusión hepática con NEM 2 mM (Fig. 8).

Podría estimarse en la rata que el número de hepatocitos de un hígado de 8 gramos es de 10^8 , y se calcula que hay entre 1000 y 1500 mitocondrias por hepatocito (66), mientras que la concentración proteica total de las mitocondrias aisladas es de 57 a 60 mg por hígado.

Teniendo en cuenta que la concentración de insulina en hígado se refiere en ng/g de tejido húmedo y la concentración de insulina en mitocondrias se representa en ng/mg de proteínas totales en mitocondrias aisladas, si se realiza una comparación grosera de los valores obtenidos en hígados y en mitocondrias, podría decirse que las concentraciones de insulina hallada en mitocondrias son equivalentes, o hasta superiores a las concentraciones de insulina en hepatocitos. Esto hace poco probable que los resultados obtenidos sean resultado de una contaminación durante el procedimiento de extracción.

Este hallazgo de insulina en mitocondrias demostrado *in vivo* por primera vez, sugiere una hipótesis sobre su mecanismo de acción. La hormona es internalizada aunque su señal siga distintos pasos metabólicos que van desde la glucólisis hasta la síntesis proteica. Estos pasos metabólicos tienen distintos sitios de autorregulación, desde *down regulation* (67) del receptor de insulina en la membrana celular hasta la activación de mTOR para limitar el exceso de la señal insulínica a nivel de los sustratos 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2) (68). Ninguno de ellos implica la degradación de la hormona internalizada. Únicamente al arribar a la mitocondria se produce en células hepáticas su degradación masiva (calculada por Desautels y Goldberg en 70 ng/min) (55). Esta degradación mitocondrial de la insulina internalizada sugiere una actividad mitocondrial crítica en la función hormonal, en donde la insulina actuaría como el propio mensajero de su señal.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 De Robertis EMF, Hib J (2001). "Fundamentos de biología celular y molecular". El Ateneo, 3ª edición. Buenos Aires, Argentina.
- 2 Stryer L, Berg J, Tymoczko J (2003). "Bioquímica". Reverté, 5ª edición. Barcelona, España.
- 3 White MF, Kahn CR (1994). "Minireview: The insulin signaling system". *The Journal of Biological Chemistry* 269(1): 1-4.
- 4 Pinzón CE, et al. (2009). "Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos". *Revista Ciencias de la Salud* 7(2): 47-66.
- 5 Bevan P (2001). "Insulin signaling". *Journal of Cell Science* 144(8): 1429-1430.
- 6 Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1997). "The significance of intracellular insulin to insulin action". *Journal of Investigative Medicine* 45(2): 20-27.
- 7 Shepherd PR, Khan, BB (1999). "Glucose transporters and insulin action". *The New England Journal of Medicine* 22: 248-257.
- 8 Fingar DC (2004). "Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression". *Oncogene* 23: 3151-3171.
- 9 Machín RP, Rodríguez Díaz Y, Vega Hernández MC (2006). "La ruta mTOR como diana terapéutica". *Biocáncer* 3.
- 10 Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998). "Insulin degradation: progress and potential". *Endocrine Reviews* 19(5): 608-624.
- 11 Shii K, Roth RA (1986). "Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosolic protease". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 4147-4151.
- 12 Kuo WL, Gehm BD, Rosner MR (1991). "Regulation of insulin degradation: expression of an evolutionarily conserved insulin-degrading enzyme increases degradation via an intracellular pathway". *Molecular Endocrinology* 5: 1467-1476.
- 13 Farris, W (2003). "Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(7): 4162-4167.

- 14 Bennett RG, Hamel FG, Duckworth WC (1996). "Insulin inhibition of fatty acid β -oxidation in isolated peroxisomes". *Diabetes* 45: 310A.
- 15 Bennett RG (2003). "Insulin inhibition of the proteasome is dependent on degradation of insulin by insulin-degrading enzyme". *The Journal of Endocrinology* 177(3): 399-405.
- 16 Hofmann CA, Lotan RM, Ku WW, Oeltman TN (1983). "Insulin-ricin B hybrid molecules mediate an insulin-associated effect on cells which do not bind insulin". *The Journal of Biological Chemistry* 258: 11774-11779.
- 17 Miller DS (1988). "Stimulation of RNA and protein synthesis by intracellular insulin". *Science* 240: 506-509.
- 18 Porte D Jr., Baskin DG, Schwartz MW (2005). "Insulin signaling in the central nervous system. A critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans". *Diabetes* 54: 1264-1276.
- 19 Hua Q, Nakagawa SH, et al. (2003). "A divergent INS protein in *Caenorhabditis elegans* structurally resembles human insulin and activates the human insulin receptor". *Genes & Development* 17(7): 826–831.
- 20 Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997). "*daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*". *Science* 277: 942-946.
- 21 Puig O, Tjian R (2005). "Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1". *Genes & Development* 19: 2435-2446.
- 22 Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (2001). "A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function". *Science* 292: 107-110.
- 23 Puig O, Marr MT, Ruhf ML, Tjian R (2003). "Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway". *Genes & Development* 17: 2006-2020.
- 24 Lenard J (1992). "Mammalian hormones in microbial cells". *Trends in Biochemical Sciences* 17(4): 147-150.
- 25 LeRoith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA (1980). "Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(10): 6184-6188.

- 26 LeRoith D, Shemer J, Roberts CT Jr. (1992). "Evolutionary origins of intercellular communication systems: Implications for mammalian biology". *Hormone Research* 38(2): 1-6.
- 27 Kole HK, Lenard J (1991). "Insulin-induced stimulation of protein phosphorylation in *Neurospora crassa* cells". *The FASEB Journal* 5(12): 2728-2734.
- 28 Kole HK, Muthukumar G, Lenard J (1991). "Purification and properties of a membrane-bound insulin binding protein, a putative receptor, from *Neurospora crassa*". *Biochemistry* 30: 682-688.
- 29 Muthukumar G, Lenard J (1991). "A preproinsulin-like pseudogene from *Neurospora crassa*". *Molecular and Cellular Endocrinology* 82(2-3): 275-283.
- 30 Abou-Sabe M, Reilly T (1978). "Insulin action on *Escherichia coli*. Regulation of the adenylate cyclase and phosphotransferase enzymes". *Biochimica et Biophysica Acta* 542: 442-455.
- 31 LeRoith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA (1981). "Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*". *The Journal of Biological Chemistry* 256(13): 6533-6536.
- 32 Rohrwild M (1996). "HsIV-HsIU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5808-5813.
- 33 Rohrwild M (1997). "The ATP-dependent HsIVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome". *Nature Structural & Molecular Biology* 4: 133-139.
- 34 Cheng YS, Zipser D (1979). "Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli*". *The Journal of Biological Chemistry* 254: 4698-4706.
- 35 Wallace DC (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary"
- 36 Cavalier-Smith T (2006). "Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium". *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1943-1952.
- 37 Martin W, Muller M (1998). "The hydrogen hypothesis of the first eukaryote". *Nature* 392: 37-44.
- 38 Salvi M (2005). "Tyrosine phosphorylation in mitochondria: A new frontier in mitochondrial signaling". *Free Radical Biology & Medicine* 38: 1267-1277.

- 39 Nellis MM (2002). "Insulin increases branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase expression in Clone 9 rat cells". *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 283: E853-E860.
- 40 Patel MS (2006). "Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex". *Biochemical Society Transactions* 34(2): 217-222.
- 41 Yalow RS, Berson SA (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man". *Journal of Clinical Investigation* 39: 1157-1175.
- 42 Jephcott CM (1931). "Extraction of insulin and stability of various preparations". *Transactions of the Royal Society Canada (Sec. V)* 25: 183-186.
- 43 Grodsky GM, Forsham PH (1960). "An immunochemical assay of total extractable insulin in man". *Journal of Clinical Investigation* 39(7): 1070–1079.
- 44 Parsons DF, Williams GR, Thompson W, Wilson DF, Chance B (1967). "Mitochondrial structure and compartmentation". Quagliariello E, Papa S, Slater EC, Tager JM. *Adriatica Editrice*.
- 45 Odell WD, Daughaday WH (1971). "Principles or competitive protein-binding assays". *Lippincott. USA*.
- 46 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall UL (1951). "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- 47 Zhang H, Liu J, Li CR, Momen B, Kohanski RA, Pick L (2009). "Deletion of *Drosophila* insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(46): 19617-19622).
- 48 Broughton SJ, Piper MDW, Ikeya T, Bass TM, Jacobson J, Drieger Y, Martinez P, Hafen E, Withers DJ, Leivers SJ, Partridge L (2005). "Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(8): 3105-3110)
- 49 Schwabe C, LeRoith D, Thompson RP, Shiloach J, Roth J (1983). "Relaxin extracted from protozoa (*Tetrahymena pyriformis*). Molecular and immunologic properties". *The Journal of Biological Chemistry* 258(5): 2778-2781.
- 50 Roth J, LeRoith D, Collier ES, Weaver NR, Watkinson A, Cleland CF, Glick SM (1985). "Evolutionary origins of neuropeptides, hormones, and receptors: possible applications to immunology". *The Journal of Immunology* 135(2): 816-819.

- 51 Valas RE, Bourne PE (2008). "Rethinking proteasome evolution: two novel bacterial proteasomes". *Journal of Molecular Evolution* 66:494-504).
- 52 Sreedara Swamy KH, Goldberg AL (1982). "Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology* 149(3): 1027-1033.
- 53 Affholter JA, Fried VA, Roth RA (1988). "Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III". *Science* 242(4884): 1415-1418.
- 54 Hyun J, Hashimoto C (2011). "Physiological effects of manipulating the level of insulin-degrading enzyme in insulin-producing cells of *Drosophila*". *Fly (Austin)* 5(1): 53-57.
- 55 Desautels M, Goldberg AL (1982). "Demonstration of an ATP-dependent, vanadate-sensitive endoprotease in the matrix of rat liver mitochondria". *The Journal of Biological Chemistry* 257(19): 11673-11679.
- 56 Rosenzweig JL, Havrankova J, Lesniak MA, Brownstein M, Roth J (1980). "Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(1): 572-576.
- 57 Goldfine ID, Jones AL, Hradek GT, Wong KY (1981). "Electron microscope autoradiographic analysis of [¹²⁵I]iodoinsulin entry into adult rat hepatocytes *in vivo*: evidence of multiple sites of hormone localization. *Endocrinology* 108: 1821.
- 58 Cresto JC, Camberos MC, D'Alessandro V, Basabe JC (1989). "Internalization and release of insulin from hepatocytes". *Acta Diabetológica Latina* 26: 103-113.
- 59 Penhos JC, Ezequiel M, Lepp A, Ramey ER (1975). "Plasma immunoreactive insulin (IRI) and immunoreactive glucagon (IRG) after evisceration with and without a functional liver". *Diabetes* 24(7): 637-640.
- 60 Marshall S (1985). "Dual pathways for the intracellular processing of insulin. Relationship between retroendocytosis of intact hormone and the recycling of insulin receptors". *Journal of Biological Chemistry* 260: 13524.
- 61 Krebs HA, Eggleston LV (1938). "The effect of insulin on oxidation in isolated muscle tissue". *Biochemistry* 32: 913-925.
- 62 Cresto J, Camberos M, Cao G, Martucci L (2011). "Insulina en mitocondria: regulación de la piruvato deshidrogenasa". *Medicina Vol. 71 Supl. III. Buenos Aires.*

- 63 Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, Selkoe DJ (2004). "Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria". *Journal of Biochemistry* 383: 439-446.
- 64 Passicot GA, Camberos MC, Cresto JC (2007). "Transporte mitocondrial de insulina". *Medicina* 67 (Supl III): 128 (0226).
- 65 Cresto J, Camberos M, Cao G, Martucci L (2010). "El transporte de insulina al mitoplasto es dependiente de la degradación mitocondrial". *Medicina* Vol. 70 Supl. II. Buenos Aires.
- 66 Allard C, De Lamirande G, Cantero A (1952). "Mitochondrial population of mammalian cells: II. Variation in the mitochondrial population of the average rat liver cell during regeneration. Use of the mitochondrion as a unit of measurement". *Cancer Research* 12: 580-583.
- 67 Udrisar DP, Camberos MC, Basabe JC, Cresto JC (1984). "Insulin processing. Its correlation with glucose conversion to CO₂". *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana* 34: 427-440.
- 68 White M (2006). "Regulating insulin signaling and β -cell function through IRS proteins". *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: 725-737.
- 69 Cavalier-Smith T (2002). "The neomuran origin of archaeobacteria, the neobacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 7-76.