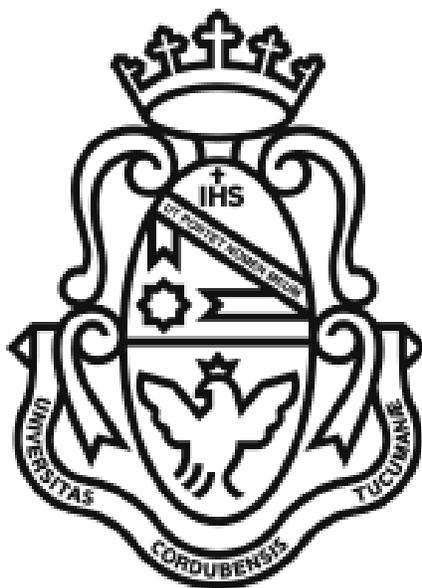


# **TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**VIRGINIA ACTIS DATO**



**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Bioquímica Clínica**

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**

**Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología**

**Córdoba, Argentina**

**Año 2019**



**“Estudio de la relación funcional entre el tráfico intracelular de LRP1 y la respuesta celular a la insulina”**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Prof. Dr. Gustavo A. Chiabrando**

**COMISIÓN ASESORA**

**Prof. Dra. Cecilia I. Álvarez**

**Prof. Dr. José Luis Daniotti**

**Prof. Dr. Gustavo R. Bonacci**

**EVALUADOR EXTERNO**

**Prof. Dr. Luis Segundo Mayorga**

**La presente tesis doctoral fue financiada a través de becas y subsidios provistos por las siguientes instituciones: FONCYT, CONICET, SECYT-UNC y EFSD.**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	1
RESUMEN .....	7
SUMMARY .....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Aspectos generales del LRP1 .....	16
1.1.1 La familia del receptor de lipoproteínas de baja densidad .....	16
1.1.2 Funciones biológicas del LRP1 .....	18
1.1.3 Organización estructural del LRP1 .....	19
1.1.4 Ligandos del LRP1 .....	20
1.1.5 LRP1 como receptor endocítico y de señalización intracelular.....	22
1.1.6 Distribución y tráfico intracelular del LRP1 .....	24
1.2 Regulación del tráfico intracelular y funcionalidad del LRP1 por Insulina .....	28
1.2.1 Aspectos generales y funciones biológicas de la insulina .....	28
1.2.2 Respuesta celular a la insulina .....	30
1.2.3 Resistencia a la insulina.....	34
1.2.4 Resistencia a la insulina y dislipemia.....	36
1.2.5 Resistencia a la insulina, dislipemia y disfunción cardiaca.....	41
2. OBJETIVOS .....	47
2.1 Objetivo general.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1 Materiales .....	50
3.2 Métodos .....	59
4. RESULTADOS .....	70
4.1 Caracterización del tráfico intracelular de LRP1 por acción de insulina .....	71
4.1.1 Expresión de LRP1 e IR en la línea de células gliales de Müller MIO-M1 .....	71
4.1.2 Distribución subcelular del LRP1 en células MIO-M1 .....	73
4.1.3 Distribución de LRP1 en membrana plasmática de células MIO-M1 .....	79
4.1.4 Nivel de LRP1 en la membrana plasmática de células MIO-M1.....	81
4.1.5 Evaluación de la expresión de LRP1 por acción de insulina en células MIO-M1 .....	85

4.1.6 Caracterización de vesículas intracelulares de almacenamiento de LRP1 en células MIO-M1 .....	86
4.1.7 Evaluación de la vía de señalización intracelular activada por insulina implicada en la translocación de LRP1 hacia la membrana plasmática en células MIO-M1.....	92
4.1.8 Participación de proteínas de transporte vesicular en el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática por acción de insulina en células MIO-M1 .....	96
4.1.9 Principales conclusiones de la seccion 4.1 .....	104
4.2 Evaluación de la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a la insulina .....	105
4.2.1 Captación de colesterol esterificado desde agLDL en la línea de celular HL-1 .....	105
4.2.2 Evaluación de la expresión de LRP1 por acción de agLDL en células HL-1 .....	108
4.2.3 Participación de LRP1 en la captación de agLDL en células HL-1 .....	109
4.2.4 Efecto de las agLDL en la distribución subcelular de LRP1 en células HL-1 .....	111
4.2.5 Efecto de las agLDL en la funcionalidad lisosomal en células HL-1 .....	114
4.2.6 Efecto de las agLDL en la asociación molecular entre LRP1 e IR en células HL-1 .....	118
4.2.7 Efecto de las agLDL en la distribución de LRP1 e IR en dominios de membranas enriquecidas en clatrina o caveolina en células HL-1 .....	123
4.2.8 Efecto de las agLDL en la expresión de LRP1 e IR en la membrana plasmática en células HL-1 .....	128
4.2.9 Efecto de las agLDL en la cascada de señalización intracelular inducida por insulina en células HL-1 .....	129
4.2.10 Efecto de las agLDL en la expresión de GLUT4 en la membrana plasmática en células HL-1 .....	133
4.2.11 Efecto de las agLDL sobre la captación de glucosa en células HL-1 .....	134
4.2.12 Principales conclusiones de la seccion 4.2 .....	137
5. DISCUSIÓN.....	138
5.1 Caracterización del tráfico intracelular de LRP1 por acción de insulina .....	139
5.2 Evaluación de la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a la insulina.....	145
5.3 Perspectivas .....	153
6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	155
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	159

# **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

# ABREVIATURAS Y SIGLAS

$\alpha_2M$	alfa 2-Macroglobulina
$\alpha_2M^*$	$\alpha_2M$ activa
Akt o PKB	<i>protein kinase B</i>
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
Apo	apolipoproteína
apoE	apolipoproteína E
ApoER2	<i>apolipoprotein E receptor 2</i>
ARNm	ARN mensajero
AS160	<i>Akt substrate of 160 kDa</i> o TBC1D4
ATP	Adenosín trifosfato
ATP1A1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa
BCA	ácido bicinconínico
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CE	colesterol esterificado
CL	colesterol libre
CRE	compartimento de reciclado endocítico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenyl-indol

Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
D.O.	densidad óptica
DIC	dominio intra-citoplasmático
DM	Diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucleico
EAP	exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
ECV	enfermedad cardiovascular
EDTA	ácido dietilaminotetracético
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
GSV	<i>GLUT4 storage vesicles</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HL-1	línea celular de músculo cardíaco
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>

IFM	intensidad de fluorescencia media
IR	receptor de insulina
LD	<i>lipid droplet</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDL-R	<i>low density lipoprotein receptor</i>
agLDL	lipoproteínas de baja densidad agregadas
nLDL	lipoproteínas de baja densidad nativas
oxLDL	lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPL	lipoproteína lipasa
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases</i>
mRNA	RNA mensajero
MEC	matriz extracelular
MET	microscopía electrónica de transmisión
MIO-M1	<i>Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MP	membrana plasmática

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro
MT1-MMP	<i>membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAI	<i>plaminogen activator inhibitor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGFRβ	<i>platelet-derived growth factor receptor β</i>
PI <sub>3</sub> K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding domain</i>
PZP	<i>pregnancy zone protein</i>
QM	quilomicrón
RAP	<i>receptor associated protein</i>
RBD	<i>region binding domain</i>
RD	retinopatía diabética
RFP	<i>red fluorescence protein</i>
RNA	ácido ribonucleico

RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SFB	suero fetal bovino
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Shc	<i>src homology</i>
shRNA	<i>small harping RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptor</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
Src	<i>Sarc</i>
TBS	tampón Tris salino
Tf	transferrina
TfR	receptor de transferrina
TG	triglicéridos
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>

uPAR	<i>urokinase receptor</i>
VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VLDL-R	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>

# **RESUMEN**

# RESUMEN

El LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) es un receptor que se encuentra expresado en diferentes tipos celulares tales como células gliales de Müller y cardiomiocitos. Entre las diversas funciones de este receptor se destaca su capacidad de regular la expresión y actividad de diferentes proteínas en la membrana plasmática, como ser el caso del receptor de insulina (IR). Se ha demostrado que la deficiencia de LRP1 en neuronas y hepatocitos genera resistencia a la insulina. En este sentido, la insulina estimula el tráfico de LRP1 a la superficie celular en adipocitos, hepatocitos y células musculares, aunque se desconoce cómo es la regulación de este tráfico intracelular. Esta movilización de LRP1 hacia la membrana plasmática, a su vez, le permitiría regular la actividad del IR en respuesta a la hormona.

Numerosos estudios relacionan la resistencia a la insulina con el incremento de subfracciones aterogénicas de lipoproteínas de baja densidad, como las modificadas por agregación (agLDL). El exceso de estas lipoproteínas es almacenado en diferentes tejidos, como músculo e hígado, contribuyendo con la resistencia a la insulina, aunque el mecanismo a través del cual esto ocurre no es del todo claro. El LRP1 es uno de los receptores involucrados en la captación de colesterol esterificado desde agLDL, lo que podría tener relación con alteración de la respuesta a la insulina.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo de tesis fue caracterizar la relación funcional entre el tráfico intracelular de LRP1 y la respuesta celular a la insulina. Dentro de este marco general se plantearon los siguientes objetivos específicos: i) Identificar las estructuras vesiculares de almacenamiento de LRP1, así como las proteínas de transporte vesicular y las vías de señalización intracelulares implicadas en el tráfico hacia la membrana plasmática de este receptor por acción de insulina; y ii) Establecer la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a insulina, y cómo este evento es alterado por la presencia de ligandos como las agLDL.

Como modelo experimental se utilizaron las líneas celulares: MIO-M1, células gliales de Müller de retinas humanas; y HL-1, cardiomiocitos de ratón. En cuanto al tráfico intracelular de LRP1 inducido por insulina en células MIO-M1, por microscopia confocal se evidenció un incremento significativo de la localización de LRP1 principalmente en endosomas tempranos [EEA1+] y en el compartimento de reciclado rápido [Rab4+] en presencia de insulina. Mediante ensayos de biotilación de proteínas de superficie celular, se evidenció que insulina promueve la movilización de LRP1 hacia la membrana plasmática en estas células. Este tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática fue mediado por la activación de la vía de señalización intracelular IR/PI<sub>3</sub>K/Akt, evidenciado mediante ensayos de *in cell Western blot*. Por microscopia electrónica de transmisión se pudo identificar vesículas intracelulares de ≈100 nm, que almacenan LRP1 junto con otras proteínas características de estas estructuras como sortilin y VAMP2. Finalmente, insulina promovió el tráfico de LRP1 a la superficie celular a través diferentes vías posibles de reciclado y/o exocitosis, entre ellas, la vía de reciclado rápido [Rab4+] y la vía exocítica mediada por Rab8A y Rab10, como se pudo observar mediante ensayos de biotilación de proteínas de superficie celular.

En cuanto a la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a insulina, y como este evento es afectado por las agLDL en células HL-1, se demostró que el tratamiento con agLDL durante 8 horas produjo una acumulación significativa de colesterol esterificado evidenciada por extracción lipídica y cromatografía en capa delgada. La captación de estas lipoproteínas modificadas fue mediada por LRP1, ya que este efecto fue bloqueado por GST-RAP. Mediante microscopia confocal se evidenció que la interacción entre las agLDL y LRP1 promovió la localización del receptor en compartimentos de degradación del tipo endosomas tardíos o lisosomas, los cuales resultaron ser disfuncionales, y afectó la localización de este receptor en regiones celulares ricas en caveolina por acción de insulina. Mediante ensayos de inmunoprecipitación, se evidenció la alteración de la asociación molecular entre LRP1 e IR. A continuación, mediante *Western blot*, ensayos de marcación de proteínas de superficie con biotina y microscopia confocal, encontramos que las agLDL afectaron la activación de la cascada de señalización

intracelular inducida por insulina lo que resultó en una reducción de la exocitosis hacia la membrana plasmática de GLUT4 y una menor captación de glucosa por acción de insulina en los cardiomiocitos expuestos a agLDL.

En conclusión, la insulina regularía el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática, principalmente desde vesículas intracelulares, a través de la activación de la cascada de señalización intracelular IR/PI<sub>3</sub>K/Akt, y en parte mediante una ruta de exocitosis regulada por insulina que involucraría la participación de Rab8A y Rab10. Este evento resulta en un aumento de la expresión de LRP1 en la superficie celular, lo cual tendría implicancias en la respuesta celular a la insulina. La presencia de un ligando específico de LRP1 como agLDL alteraría la distribución intracelular de este receptor, afectando la asociación molecular entre LRP1 e IR, la señalización intracelular inducida por insulina y la captación de glucosa extracelular en cardiomiocitos. Estos resultados en su conjunto presentan una nueva perspectiva en el estudio bioquímico y celular de la relación del tráfico intracelular de LRP1 y la respuesta celular a la insulina, lo que podría tener implicancias fisiopatológicas en los procesos de neovascularización y neurodegeneración retinal como así también en la alteración de la función cardíaca que se producen en situaciones de resistencia a la insulina.

# **SUMMARY**

# SUMMARY

LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein 1*) is a receptor expressed in different cell types such as Müller glial cells and cardiomyocytes. LRP1 can regulate the expression and activity of different membrane proteins in the cell surface, such as the insulin receptor (IR). It has been shown that LRP1 deficiency in neurons and hepatocytes generates insulin resistance. In this way, insulin stimulates the LRP1 translocation to the cell surface in adipocytes, hepatocytes and muscle cells, although the regulation of this intracellular traffic is unknown. This mobilization of LRP1 towards the plasma membrane, in turn, would allow it to regulate IR activity in response to the hormone, which could have pathophysiological implications in the retinal neovascularization and retinal neurodegeneration as well as in the alteration of cardiac function that occur in insulin resistance.

Several studies have linked insulin resistance with atherogenic subfractions of low density lipoproteins, such as those modified by aggregation (agLDL). The excess of these lipoproteins is stored in different tissues, such as muscle and liver, contributing to the resistance to insulin, although the mechanism through which this occurs is not clear. LRP1 is one of the receptors involved in the uptake of esterified cholesterol from agLDL, which could be related to impaired insulin response.

Taking this background into account, the principal aim of this Ph.D. thesis was to characterize the functional relationship between the intracellular trafficking of LRP1 and the cellular response to insulin. Within this general framework, the following specific aims will be considered: i) identify vesicular storage structures of LRP1, as well as vesicular transport proteins and intracellular signaling pathways involved in insulin-induced traffic of this receptor; and ii) to establish the participation of LRP1 on the cellular response to insulin, and how this event is altered by the presence of ligands such as agLDL.

As experimental model, cell lines were used: MIO-M1, Müller glial cells from human retinas; and HL-1, mouse cardiomyocytes. Regarding insulin-induced intracellular traffic of LRP1 in MIO-M1 cells, by confocal microscopy we showed a

significant increase in the localization of LRP1 mainly in early endosomes [EEA1 +] and in the recycling compartment [Rab4 +] in the presence of insulin, with respect to non-stimulated conditions. By biotinylation assays of cell surface proteins, it was evidenced that insulin promotes the LRP1 translocation towards the plasma membrane in these cells. This trafficking was mediated by the activation of the IR / PI3K / Akt intracellular signaling pathway, evidenced by cell surface proteins detection assays. Transmission electron microscopy characterized intracellular vesicles of  $\approx 100$  nm, which store LRP1 together with other proteins such as sortilin and VAMP2. Finally, insulin promoted the LRP1 translocation to the cell surface through two different possible pathways, including Rab4-dependent endocytic recycling pathway and Rab8A and Rab10 mediated exocytic route. Regarding the participation of LRP1 on the cellular response to insulin, and as this event is affected by agLDL in HL-1 cells, it was demonstrated that the treatment with agLDL for 8 hours produced a significant accumulation of esterified cholesterol evidenced by lipid extraction and thin layer chromatography, without the formation of lipid droplet in these cells. The uptake of these modified lipoproteins was mediated by LRP1, since this effect was blocked [by GST-RAP]. Confocal microscopy showed that agLDL promoted LRP1 localization of this receptor in degradation compartments of the late endosome or lysosome, which turned out to be dysfunctional. Moreover, agLDL also affected the LRP1 location in caveolin-rich cellular regions by insulin action. Through immunoprecipitation assays, alteration of the molecular association between LRP1 and IR was found. Then, by Western blot, cell surface protein biotin-labeling assay and confocal microscopy, we found that agLDL affected the activation of the insulin-induced intracellular signaling pathway, which resulted in a reduction of exocytosis towards the plasma membrane of GLUT4 and a lower glucose uptake by insulin action in cardiomyocytes exposed to agLDL.

In conclusion, insulin might regulate the LRP1 trafficking to the plasma membrane, mediated by the IR/PI<sub>3</sub>K/Akt activation and Rab8A/Rab10-dependent exocytosis. The presence of a specific ligand of LRP1 as agLDL could alter the intracellular distribution of this receptor, affecting the molecular association between LRP1 and

IR, the insulin-induced intracellular signaling and the extracellular glucose uptake in cardiomyocytes. These results present a new perspective in the biochemical and cellular study of the relationship of the intracellular traffic of LRP1 and the cellular response to insulin, which may be an important contribution in the research for new therapeutic targets for the treatment of diabetic retinopathy and cardiomyopathy.

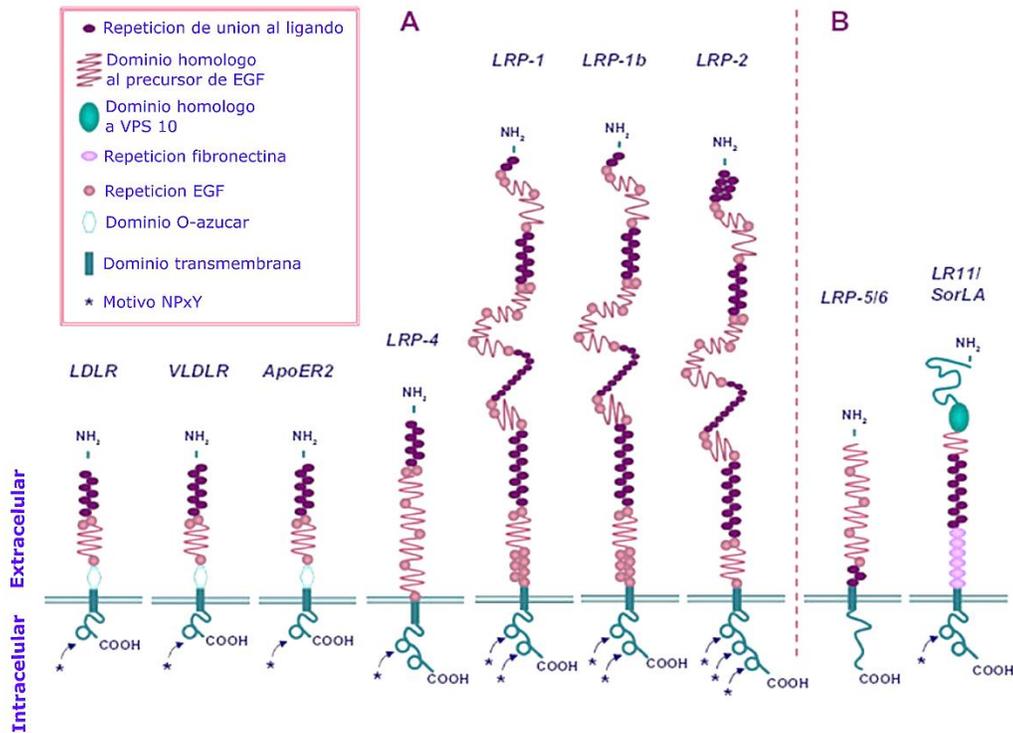
# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos generales del LRP1

### 1.1.1 La familia del receptor de lipoproteínas de baja densidad

La familia de genes de receptores de lipoproteínas de baja densidad (*ldl-r*) tiene como máximo exponente al LDL-R (del inglés *low density lipoprotein receptor*) (Goldstein y Brown, 2009). Esta familia está constituida por 7 miembros con alta homología estructural: LDL-R, VLDL-R (del inglés *very low density lipoprotein receptor*), ApoER2 (del inglés *apolipoprotein E receptor 2*), LRP4, LRP1 (del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 1*), LRP1b y LRP2 o Megalina (Figura 1 A). También pertenecen a esta familia otros 3 receptores que no son homólogos en estructura: LRP5, LRP6 y SorLa o LR11 (Figura 1 B) (Herz y Bock, 2002; Herz y Strickland, 2001; Lillis y col., 2008). Todos estos receptores participan de numerosos procesos biológicos, como ser en la unión e internalización de una gran variedad de ligandos extracelulares, en la regulación del metabolismo de lípidos y proteínas, así como también en la modulación del transporte y la actividad de diversas proteínas de superficie celular (van de Sluis, B., Wijers, M., Herz, J., 2017; Mahley, R.W., 2016; Wagner, T.y Pietrzik, C.U., 2012). Algunos de estos receptores son capaces de generar señalización intracelular a partir de su interacción con ligandos y tienen una activa participación en la regulación del desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (Herz y Bock, 2002; May y col., 2005).



**Figura 1. Miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad.** (A) Receptores que presentan alta homología estructural. (B) Miembros de la familia que no son homólogos estructuralmente. Modificado de Herz y colaboradores (Herz y Bock, 2002).

Dentro de esta familia de receptores, el LRP1 presenta una amplia distribución en diversos tejidos y tipos celulares como ser fibroblastos, monocitos y macrófagos, adipocitos, hepatocitos, cardiomiocitos, células epiteliales y musculares, neuronas y astrocitos, células gliales de Müller y células dendríticas intersticiales de riñón (Herz y col., 2001; Moestrup y col., 1992; Ferrer y col., 2014; Moestrup y col., 1990, Cal y col., 2012; Barcelona y col., 2010; Bonacci y col., 2007). El LRP1 también se expresa en diversos tipo de tumores como glioblastomas y leucemias mielomonocíticas (Moestrup y Hokland, 1992; Song y col., 2009).

Este receptor fue identificado y caracterizado a fines de la década de 1980, de manera casi simultánea por dos grupos de trabajo diferentes. Por un lado, Joachim Herz y colaboradores, lo describieron como una proteína de superficie celular altamente expresado en hígado y con similitudes estructurales y bioquímicas al LDL-R (Herz y col., 1988). Mientras que, James Ashcom y colaboradores, definieron a este receptor como una glicoproteína de superficie

celular de 420 kDa que reconocía a la  $\alpha_2$ -Macroglobulina activa (Ashcom y col., 1990). En ese momento fue considerado un mero receptor endocítico o transportador intracelular de ligandos, pero en la actualidad se sabe que es un regulador activo de importantes procesos fisiológicos y patológicos.

### 1.1.2 Funciones biológicas del LRP1

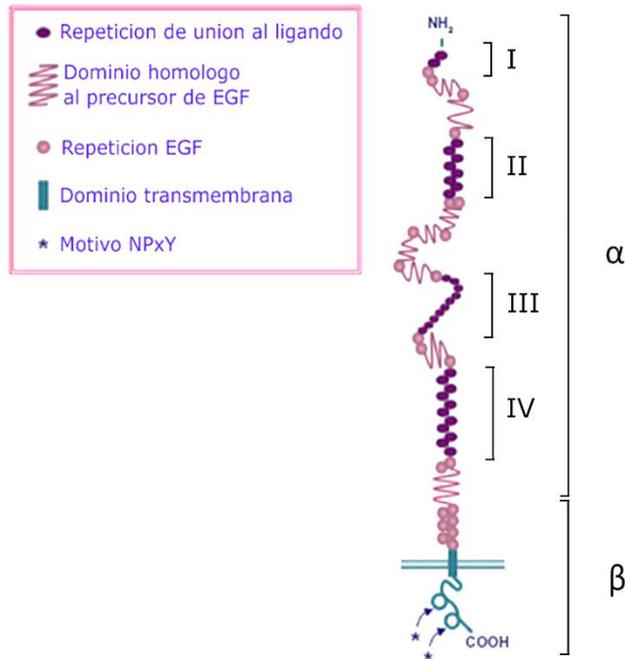
El LRP1 tiene la capacidad de unir más de 40 ligandos no relacionados ni estructural ni funcionalmente, entre los que se destacan proteasas y sus inhibidores, proteínas involucradas en el transporte de lípidos, factores de crecimiento, partículas virales y toxinas (Lillis y col., 2008). El LRP1 también es capaz de asociarse y regular el transporte a la membrana plasmática de diferentes proteínas y receptores transmembrana tales como,  $\beta$ 1-integrina, MT1-MMP (del inglés *membrane type 1 metalloproteinase*), GLUT4 (del inglés *glucose transporter type 4*), PDGFR $\beta$  (del inglés *platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ), uPAR (del inglés *urokinase receptor*) e IR (del inglés *insulin receptor*), entre otros (Ferrer y col., 2016 ; Barcelona y col., 2013; Bogan y col., 2010; Boucher y col., 2003; Gonias y col., 2011; Liu y col., 2015). Esta cualidad le permite participar activamente en una gran variedad de eventos fisiológicos y patológicos asociados principalmente con, la remodelación de la matriz extracelular ya que LRP1 actúa como un receptor depurador de proteasas mediante su interacción con  $\alpha_2$ M\* principalmente a nivel del hígado y a su vez regula la expresión de metaloproteinasas de matriz, como la MMP-9 en fibroblastos y macrófagos (Gaultier y col., 2010; Cáceres y col., 2010). Participa en la iniciación y progresión de procesos inflamatorios y en eventos de proliferación, diferenciación y migración celular (Baitsch y col., 2011; Xian y col., 2017; Bonacci y col., 2007; Mantuano y col., 2010; Barcelona y col., 2013, Ferrer y col., 2016). Este receptor está involucrado también en la regulación del metabolismo de lípidos y glúcidos. En este sentido, LRP1 actúa como receptor “scavenger” de lipoproteínas en su conformación nativa, principalmente en hígado, o modificadas en macrófagos y VSMCs, como así también participa en la regulación del tráfico intracelular de

transportadores de glucosa en células musculares y adipocitos (Lillis y col., 2015; Llorente- Cortes y col., 2006; Kruth, H.S., 2002; Jedrychowski y col., 2010; Kandror y Pilch, 2011). Además, este receptor está involucrado en el ingreso de virus y toxinas bacterianas a la célula, en la transducción de señales intracelulares y la transmisión nerviosa (Herz y Strickland, 2001; Lillis y col., 2008). Por último, LRP1 es clave para el desarrollo embrionario, proceso durante el cual cumple importantes funciones en la implantación del embrión y el desarrollo del sistema nervioso central y vascular (Pankov y Yamada, 2002; Lillis y col., 2008; Nakajima y col., 2014). En resumen, LRP1 tiene una activa participación en diversos procesos fisiológicos y patológicos que puede explicarse a partir de su capacidad de interactuar con un gran variedad de ligandos, promover su endocitosis y en algunos casos también la activación de cascadas de señalización intracelular, que regulan procesos biológicos tan diversos como la naturaleza de los ligandos que unen este receptor.

### **1.1.3 Organización estructural del LRP1**

El LRP1 es una proteína transmembrana tipo I que es sintetizada como una glicoproteína precursora de 600 kDa y luego del procesamiento proteolítico postraducciona mediado por furina en el compartimento de *trans*-Golgi, se conforma como un heterodímero asociado de manera no covalente, conteniendo dos subunidades: i) una subunidad extracelular de 515 kDa (subunidad  $\alpha$ ) y ii) una subunidad transmembrana e intracelular de 85 kDa (subunidad  $\beta$ ) (Herz y col., 1990; Willnow y col., 1996). Como se muestra en la Figura 2, la subunidad  $\alpha$  posee 31 repeticiones de tipo complemento ricas en cisteínas, las que se distribuyen en 4 dominios de unión a ligandos o *clusters* (I–IV), donde el dominio I posee dos repeticiones, el II ocho, el III diez y finalmente el dominio IV once repeticiones. Estos dominios se encuentran delimitados por uno o más dominios homólogos al precursor de EGF (del inglés *epidermal growth factor*), los cuales consisten en dos repeticiones EGF ricas en cisteínas seguidas de una repetición YWTD y una tercera del EGF-*like*. Por su parte la subunidad  $\beta$ , de 100

aminoácidos, está conformada por un ectodominio, una porción transmembrana y un dominio intracitoplasmático (DIC) que contiene motivos YxxL, di-Leucina (LL) y NPxY, además de residuos serina y treoninas, que son potenciales sitios de fosforilación y unión de proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Lillis y col., 2008; Herz y Strickland, 2001).



**Figura 2. Esquema de la conformación estructural de LRP1.** En la subunidad α los dominios I–IV representan los sitios de unión de ligandos. También se muestra la subunidad β cuyo sitio de unión con la subunidad α representa el sitio de corte de furina en el compartimento de *trans*-Golgi. Modificado de Herz y Strickland (Herz y Strickland, 2001).

### 1.1.4 Ligandos del LRP1

Como fue mencionado, el LRP1 es capaz de unir más de 40 ligandos no relacionados ni de manera estructural ni funcional. La mayoría de los ligandos reconocidos por este receptor se unen a los dominios II y IV de la subunidad α, a excepción de  $\alpha_2M^*$  que se une a los dominios I y II (Mikhailenko y col., 2001). A

continuación, se resumen algunos de los ligandos que interaccionan con LRP1 (Lillis y col., 2008).

## Ligandos de LRP1

### *Proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos*

Lipoproteínas ricas en Apolipoproteína E (apoE), Proteína activadora de esfingolípidos, Lipasa hepática, Lipoproteína lipasa (LPL),  $\beta$ -VLDL, LDL agregadas.

### *Proteasas y complejos proteasa/inhibidor*

$\alpha_2$  Macroglobulina activada ( $\alpha_2M^*$ ), Proteína precursora amiloide (isoformas conteniendo KPI), Complejos Trombospondina-2-MMP-2, MMP-9, MMP-13, Complejos tPA-PAI, tPA, Complejos uPA-PAI, Pro-uPA/uPA, Complejos PZP-proteasa, Complejos Neuroserpina-tPA, Complejos Trombina-PAI-1, Aprotinina, Trombina/Antitrombina III, Trombina/Proteasa Nexina-1, Inhibidor C1s-C1q, Factor IXa, Factor VIIa/TFPI, fVIII/fVIIIa, fXIa/Proteasa nexina 1, Cofactor II Trombina/Heparina, Neuroserpina, Elastasa/ $\alpha$ 1-anti-tripsina, Proteasa/Inhibidor de proteína C, TFPI.

### *Proteínas intracelulares*

RAP, Calreticulina, Proteína Tat de HIV.

### *Proteínas de la matriz extracelular*

Trombospondina 1, Trombospondina 2, Fibronectina.

### *Factores de crecimiento*

PDGF, TGF- $\beta$ , Midkina, CTGF.

### *Otros*

Lactoferrina, Péptido A $\beta$  (monómero), C3 (complemento), Ricina A, Gentamicina, Colectina (vía calreticulina), Saposina, Polimicina B, Proteína Circumsporozoito, Rhinovirus, Exotoxina A de *Pseudomonas* (EAPs).

En general, estos ligandos no compiten entre sí por la unión a LRP1, a excepción de la proteína asociada al receptor RAP (del inglés *receptor associated protein*), de 39 kDa capaz de interactuar con alta afinidad con los dominios I-IV bloqueando así la unión de todos los ligandos conocidos al receptor (Willnow y col., 1996; Chiabrando y col., 2002). RAP es esencial durante el procesamiento post-traducciona l de LRP1, ya que impide por acción alostérica la unión de otros ligandos durante el plegamiento de la proteína y su posterior secreción a la membrana plasmática (Herz y col., 1991). La estructura primaria de RAP fue determinada por Strickland y colaboradores (Strickland y col., 1991) y mediante técnicas de biología molecular se generó un homólogo recombinante acoplado a GST (del inglés *glutathione S-transferase*) que puede ser utilizado de manera exógena para inhibir la unión de ligandos a LRP1 (Barcelona y col., 2013; Ferrer y col., 2016).

### **1.1.5 LRP1 como receptor endocítico y de señalización intracelular**

El LRP1 une e internaliza sus ligandos principalmente a través de un mecanismo de endocitosis mediada por clatrina, junto con la participación de proteínas adaptadoras y otros receptores de membrana (May y col., 2005; Lillis y col., 2008). No obstante, el LRP1 ha sido localizado de manera transitoria en dominios de la membrana plasmática de tipo *lipid rafts/caveolae* en asociación con los receptores uPAR y PDGFR $\beta$ , con determinadas quinesinas y proteínas adaptadoras y en adipocitos cultivados en presencia de insulina (Boucher y col., 2003; Gonias y col., 2011; Kanai y col., 2014; Loukinova y col., 2002; Wu y Gonias, 2005; Zhang y col., 2004; Delint-Ramirez y col., 2015). En general, la internalización de ligandos por endocitosis mediada por clatrina genera inicialmente un proceso de invaginación de la membrana plasmática o *clathrin coated pit*, a partir del cual se produce el reclutamiento de la proteína AP2 (del inglés *adaptor-related protein type 2*) (Edeling y col., 2006). Luego, por acción de proteínas como epsina y endofilina, se produce la formación de la vesícula endocítica, que se desprende de la membrana plasmática por un proceso de fisión llevado a cabo principalmente por acción de

dinamina. Paso siguiente, la vesícula se fusiona con endosomas tempranos o preexistentes, que interaccionan, de forma simultánea, con diversas estructuras subcelulares direccionando a las moléculas cargo hacia diferentes destinos dentro de la célula como ser hacia, endosomas tardíos para su degradación, el compartimento de reciclado endocítico para que las moléculas cargo sean devueltas a la membrana plasmática o también es posible que algunas moléculas retornen directamente desde estos endosomas tempranos hacia la superficie celular (Maxfield y McGraw, 2004).

Los ligandos de LRP1 ingresan a la célula a través un mecanismo común pero no todos tienen el mismo destino intracelular. En el caso de  $\alpha_2M^*$  luego de su endocitosis sufre degradación a nivel de lisosomas (Salzman y Maxfield, 1989; Borth, 1992; Tesis Doctoral Dr. Jaldin-Fincati FCQ-UNC, 2014). Mientras que la apolipoproteína E (apoE) se localiza en endosomas tempranos, luego se disocia de su receptor y se ubica en endosomas que no contienen LRP1, desde donde recicla a la membrana plasmática para su eliminación a través de lipoproteínas de alta densidad HDL (Laatsch y col., 2012). Otro caso particular es el de la exotoxina A de *Pseudomonas* (EAP) la cual se acumula en el retículo endoplasmático y evade la vía de degradación al igual que apoE (Walters y Berwin, 2005). En resumen, no existen rutas endocíticas comunes para el transporte intracelular de los diferentes ligandos de LRP1, lo que permite explicar la ausencia de redundancia funcional de este receptor en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas.

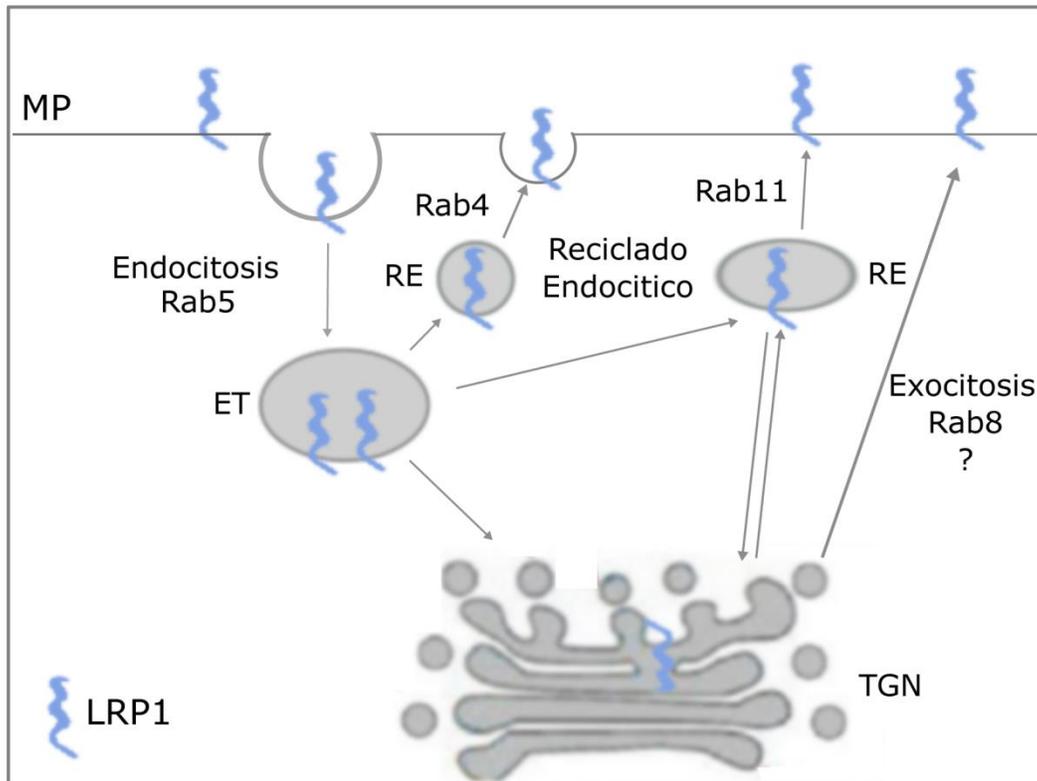
Por otro lado, la subunidad  $\beta$  de LRP1 contiene los motivos YxxL, LL y NPxY que participan de la endocitosis del receptor, aunque los mecanismos moleculares involucrados en este proceso no están completamente esclarecidos (Donoso y col., 2009; Farfan y col., 2013; Herz y Strickland, 2001). Los motivos NPxY cumplen funciones adicionales a la de endocitosis ya que participan en la activación de la señalización intracelular mediada por este receptor, interaccionando con dominios denominados PTB (del inglés *phosphotyrosine binding domain*) de diversas proteínas adaptadoras citosólicas, que son las encargadas de reclutar moléculas que promueven la activación de vías de

señalización intracelular (Lee y col., 2008; Beffert y col., 2006; Tao y col., 2016). El LRP1 contiene dos motivos NPxY en el DIC de la subunidad  $\beta$ , siendo el motivo distal el que tiene potencial de unir proteínas adaptadoras conteniendo dominios PTB (Gotthardt y col., 2000). Al presente, se desconoce bajo qué condiciones se promueve la interacción del DIC de LRP1 con las diferentes proteínas adaptadoras, así como tampoco se ha establecido si los diferentes ligandos de este receptor condicionan dicha interacción (Tao y col., 2016). Si bien la totalidad de los ligandos son endocitados por este receptor, no todos activan de manera redundante las mismas vías de señalización intracelular ni producen, por consiguiente, los mismos eventos celulares. Por ejemplo,  $\alpha_2M^*$  activa vías de señalización del tipo MAPK/ERK responsables de promover síntesis de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias en macrófagos y células de Schwann; apoE activa la vía de supervivencia celular PKB (del inglés *protein kinase B*) (PI<sub>3</sub>K/Akt) en neuronas; y lactoferrina activa AMPc y PKA, que regulan la producción de colágeno en fibroblastos (Bonacci y col., 2007; Caceres y col., 2010; Mantuano y col., 2011; May y col., 2005; Shi y col., 2011; Takayama y Takezawa, 2006).

### **1.1.6 Distribución y tráfico intracelular del LRP1**

En relación a la localización subcelular de LRP1, en condiciones basales este receptor se localiza principalmente a nivel intracelular, ocupando la región perinuclear en estructuras vesiculares y tubulares. Una pequeña proporción de LRP1 se localiza a nivel de la superficie celular, este porcentaje oscila de 10-20% dependiendo del tipo celular y puede ser modificado por la presencia de ligandos o también por otros factores extracelulares que no son ligandos de este receptor, tal es el caso de la insulina (Barcelona y col., 2013; Ferrer y col., 2016; Ding y col., 2016; Laatsch y col., 2009). Luego de la interacción de LRP1 con algún ligando, se desencadena un evento de endocitosis seguido de la disociación ligando/receptor en los endosomas tempranos, a partir de allí el LRP1 es reciclado a la membrana plasmática a través de más de una vía posible, como se puede ver en la Figura 3. En este sentido una de las posibilidades es que LRP1 retorne a la superficie

celular mediante reciclado endocítico rápido o lento. El reciclado endocítico rápido se produce directamente desde los endosomas tempranos hacia la membrana plasmática con la participación de la GTPasa Rab4 e insume aproximadamente 2 minutos desde el ingreso del receptor a la célula (Maxfield y McGraw, 2004). Mientras que el reciclado endocítico lento se produce a través del compartimento de reciclado endocítico (CRE), insume aproximadamente 12 minutos desde la endocitosis del receptor y es mediado por la GTPasa Rab11 (Donoso y col., 2009; Farfan y col., 2013). Otra posibilidad además del reciclado endocítico, es que LRP1 sea transportado a la membrana plasmática directamente desde el compartimento de *trans*-Golgi mediante la participación de la GTPasa Rab8, que además regula el equilibrio entre este compartimento y el retículo endoplásmico. Sin embargo, en presencia de ciertos estímulos como  $\alpha_2M^*$ , LRP1 retorna a la superficie celular por vías independientes del reciclado endocítico rápido y lento (Barcelona y col., 2013). Es también conocido que insulina estimula la movilización de LRP1 hacia la membrana plasmática en hepatocitos, aunque la ruta de tráfico intracelular aún no ha sido caracterizada (Laatsch y col., 2009).



**Figura 3. Distribución intracelular de LRP1.** Bajo condiciones basales LRP1 se encuentra principalmente a el nivel intracelular y se endocita constitutivamente desde la membrana plasmática (MP) hasta los endosomas tempranos (ET), y luego regresa a la superficie celular a través de una ruta de reciclado endocítico (RE) dependiente de la GTPasa Rab4 (reciclado rápido) o Rab11 (reciclado lento), una tercera posibilidad de retorno a la MP se produciría luego de ciertos estímulos mediante una exocitosis regulada directamente desde el compartimento de *trans*-Golgi mediante la participación de la GTPasa Rab8.

Algunos aspectos de la regulación del tráfico de LRP1 por acción de insulina parecen ser similares a lo que ocurre en adipocitos y células musculares con el transportador de glucosa GLUT4. Este transportador es movilizado hacia la membrana plasmática desde vesículas intracelulares sensibles a insulina denominadas GSV (del inglés *GLUT4 storage vesicles*) mediante un mecanismo conocido como exocitosis regulada (Bogan y Kandror, 2010; Bogan y col., 2012). Es importante destacar que LRP1 es una de las proteínas constitutivas mayoritarias de estas GSV y es fundamental tanto para la formación como para la funcionalidad de las mismas (Bogan y Kandror, 2010; Jedrychowski y col. 2010;

Kandror y Pilch, 2011). Por acción de insulina estas GSV son traficadas y fusionadas a la membrana plasmática mediante la activación de la cascada de señalización intracelular de IR/PI<sub>3</sub>K/Akt y de un conjunto de diversas GTPasas que participan de la vía exocítica tales como Rab8A y Rab10, entre otras (Leto y col., 2012; Sun y col., 2014; Chen y col., 2013). Si bien este mecanismo de exocitosis regulada por insulina podría ser compartido para LRP1 en adipocitos y células musculares, no se conoce cómo es la regulación de este tráfico en estas células y menos aún como se produce en otros tipos celulares que no expresan GLUT4 como ser hepatocitos y células gliales de Müller, entre otras. En este sentido, ha sido demostrado por varios grupos de investigación que LRP1 cumple importantes funciones en la regulación de procesos que involucran migración y activación de las células gliales de Müller en la retina, como ser durante la neovascularización inducida por isquemia, donde se evidencia un incremento en la expresión de LRP1 en estas células y en el humor vítreo de pacientes con ciertos desórdenes proliferativos (Barcelona y col., 2010; Hollborn y col., 2004; Sanchez y col., 2007). Por su parte, también existe evidencia que los niveles de LRP1 en la superficie de las células gliales de Müller son claves para la regulación de la migración de este tipo de células, la remodelación de la matriz extracelular y la vascularización en la retina (Tesis Doctoral del Dr. Jaldin-Fincati, FCQ-UNC, 2014; Barcelona y col., 2013, Hossaina y col., 2017). Sin embargo, las funciones de este receptor en dichos procesos, como así también la regulación de su tráfico intracelular aún no han sido completamente esclarecidas.

Las células gliales de Müller son las principales células gliales de la retina que dan soporte estructural y funcional a neuronas y vasos sanguíneos en este tejido (Limb y col., 2002; Subirada y col., 2018). Ha sido demostrado que la insulina presente en el microambiente retinal es capaz de regular diversos procesos en estas células (Barnet y col., 2000; Biswas y col., 2008; Reiter y col., 2003). Uno de estos procesos es la regulación de la actividad y contenido de la enzima glutamina sintasa (GS) involucrada en la conversión del glutamato del microambiente retinal a glutamina previniendo así la neurotoxicidad inducida por el neurotransmisor, sin embargo aún no se conoce el mecanismo intracelular que regula este evento

(Lieth y col., 2000). Adicionalmente, las células gliales de Müller cumplirían importantes funciones en la regeneración neuronal, lo que se deduce a partir de los hallazgos que muestran que células MIO-M1 (del inglés *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*) poseen características de células madre pluripotentes neuronales (Lawrence y col., 2007). Dichas cualidades llevaron a estas células a ser consideradas como potenciales agentes terapéuticos para la restauración de la función de la retina luego de injurias provocadas por diversas alteraciones patológicas o mecánicas (Bull y col., 2008; Johnson y col., 2009). En relación al presente trabajo de tesis, el tejido retinal es una región del organismo que se encuentra en contacto con insulina, siendo varias de sus funciones reguladas por la presencia de esta hormona (Klefter y col., 2016). En situaciones de resistencia a la insulina se desencadenan eventos de migración celular, remodelación de la matriz extracelular y vascularización anormal, en los cuales ha sido demostrado que LRP1 tiene participación, que en conjunto forman parte de lo que se denomina como retinopatía diabética (RD) (Lutty y col., 2013). Teniendo en cuenta todos estos aspectos, resultó de interés la utilización de la línea celular MIO-M1 para el estudio de los efectos que provoca la insulina sobre la distribución y tráfico intracelular de LRP1, con el propósito de entender su participación en diferentes procesos patológicos a nivel de la retina, que se desarrollan debido a la resistencia a la insulina en patologías como la Diabetes Mellitus.

## **1.2 Regulación del tráfico intracelular y funcionalidad del LRP1 por Insulina**

### **1.2.1 Aspectos generales y funciones biológicas de la insulina**

La insulina es una hormona polipeptídica producida y secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Entre los vertebrados, esta hormona conserva una íntima similitud estructural. En las células  $\beta$ , la insulina se sintetiza como proinsulina y por acción de enzimas proteolíticas en el compartimento de Golgi, pierde una región del centro de la molécula denominada péptido C quedando libres los extremos C-terminal y N-terminal. Estos extremos tienen 51

aminoácidos en total y se denominan cadenas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), los cuales están unidos entre sí por medio de puentes disulfuro (Sanlioglu y col., 2013). De esta manera, la insulina se une a  $Zn^{2+}$  conformando una estructura hexamérica que se almacena en vesículas secretorias en el interior celular, mientras que la forma activa de esta hormona es la estructura monomérica que se genera cuando la insulina es liberada a la circulación sanguínea (Doyle y col., 2003).

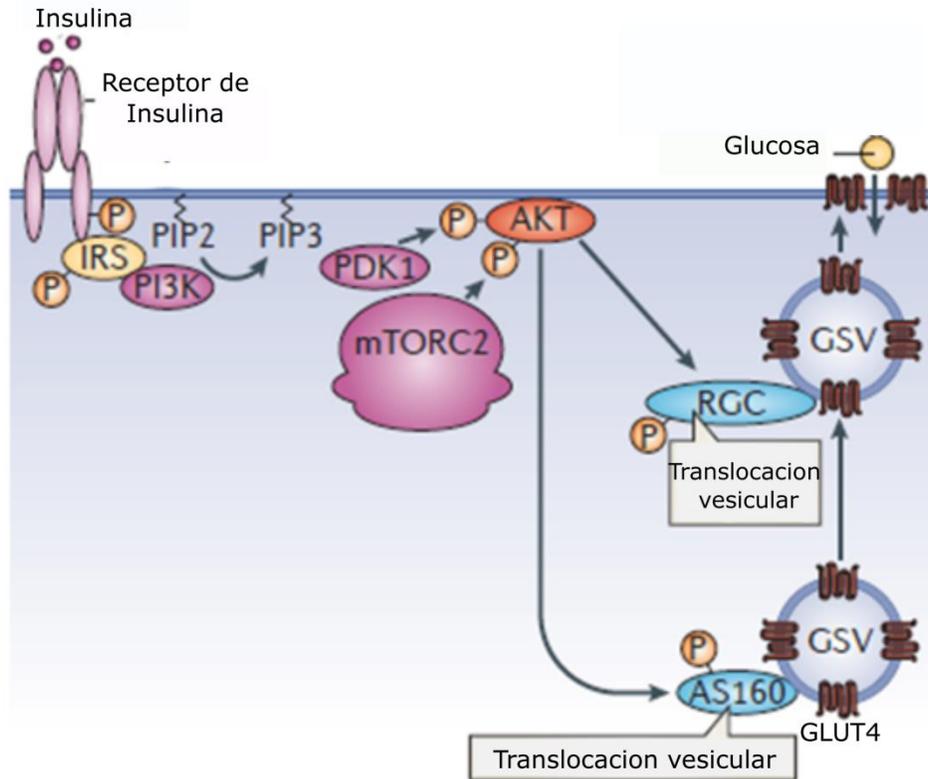
La insulina es secretada por el páncreas bajo la influencia de varios estímulos, como ser la ingesta de carbohidratos, grasas y proteínas, también por acción de la hormona del crecimiento y el neurotransmisor acetilcolina, entre otros. En individuos sanos hay una liberación basal constante de insulina en respuesta a la producción de glucosa hepática. Mientras que luego de la ingesta de alimentos se produce una liberación bifásica de la insulina, donde la primera fase de secreción se desencadena rápidamente dentro de los 5 minutos después del estímulo y consiste principalmente en la liberación de insulina existente que se encuentra almacenada en vesículas secretorias intracelulares. La segunda fase (fase de meseta), en contraste, requiere del procesamiento de la insulina recién sintetizada que se libera de manera sostenida y lenta durante 1- 2 horas hasta que se reestablece la normogluemia (Yaribeygi y col., 2018).

La insulina es la principal hormona anabólica en el ser humano. En sus tejidos diana, principalmente hígado, músculo y tejido adiposo, incrementa la captación de glucosa favoreciendo su utilización y almacenamiento como glucógeno, inhibe la glucogenolisis, promueve la glucólisis y favorece la síntesis de triglicéridos y proteínas. Con la reducción de la concentración de glucosa circulante, se produce la degradación de la insulina secretada, finalizando así la respuesta 2-3 horas luego del estímulo (Kraegen y col., 1985; Saltiel y Kahn, 2001).

## 1.2.2 Respuesta celular a la insulina

La vía de señalización de insulina se inicia después de la interacción de la hormona con su receptor específico IR en la superficie celular de hepatocitos, adipocitos, células musculares, entre otras. Es conocido que IR se localiza principalmente en dominios de la membrana plasmática ricos en colesterol o *lipid rafts/caveolae* (Delint-Ramirez y col., 2015). Este receptor es una proteína heterotetramérica compuesta por dos subunidades  $\alpha$  idénticas extracelulares y dos subunidades  $\beta$  transmembrana también idénticas entre sí y unidas por puentes disulfuro. Las unidades  $\alpha$  contienen los “sitios” de unión de la insulina. Como se puede ver en la Figura 4, luego de la interacción de IR con la hormona se produce la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  del receptor lo que conduce al reclutamiento y fosforilación de residuos Tyr del sustrato del receptor de insulina (IRS) que sirven como sitios de acoplamiento para el dominio SH2 de la subunidad p85 de PI<sub>3</sub>K, para su subsecuente activación y producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). A su vez, el PIP3 sirve como sitio de acoplamiento para residuos Ser/Thr de ciertas quinasas como PDK1 (del inglés *phosphoinositide-dependent kinase 1*) y Akt (también conocida como PKB). PDK1 y mTORC2 (del inglés *mammalian target of rapamycin complex 2*) activan a Akt mediante la fosforilación dual de residuos Ser/Thr. Akt es un eje clave que conecta la señalización intracelular de insulina con el tráfico de GLUT4 en adipocitos y células musculares que expresan este transportador (Saltiel y Khan 2001; Bai y col., 2007; Gonzalez y McGraw, 2006). En este sentido, es conocido que Akt actúa sobre dos proteínas reguladoras de GTPasas, una de ella es AS160 (también conocido como TBC1D4) y la otra es el complejo RAL-GAP (RGC). Cuando Akt se activa, fosforila a AS160 y a RGC favoreciendo la activación de GTPasas involucradas en la exocitosis de las vesículas GSVs que almacenan GLUT4, como ser Rab8A y Rab14 en células musculares y Rab10 en adipocitos (Sun y col., 2010; Miinea y col., 2005; Sano y col., 2007; Chen y col., 2010). No obstante, Akt también es capaz de actuar sobre algunas proteínas reguladoras del tipo *SNARE*, como Synip (también conocida como STXBP4) y CDP138 (del inglés *138 kDa C2*

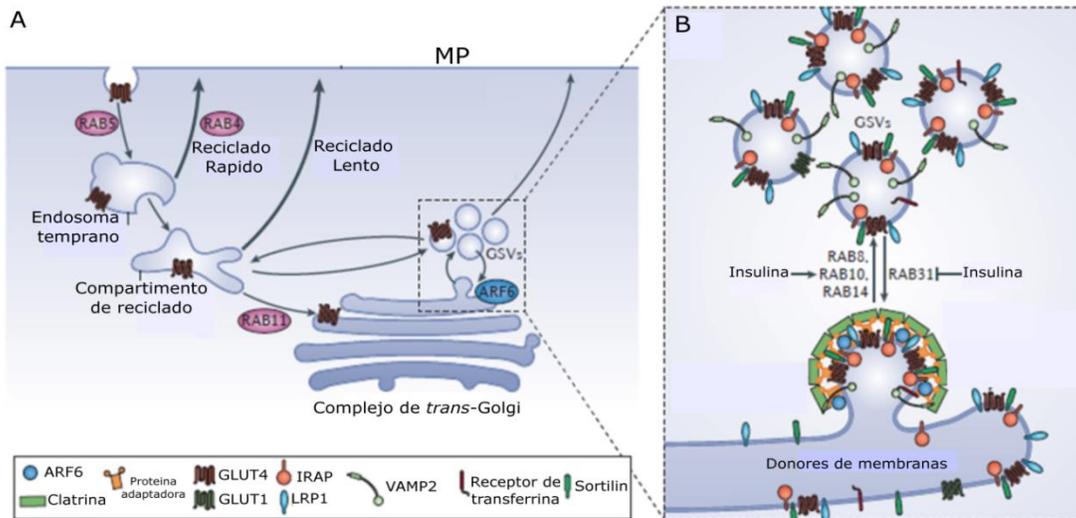
*domain-containing phosphoprotein*) que regulan la fusión de las GSVs con la membrana plasmática (Xie y col., 2011; Yamada y col., 2005).



**Figura 4. Señalización intracelular de insulina.** La cascada de señalización de insulina se inicia cuando la hormona interacciona con IR en la superficie celular, este se autofosforila y activa a IRS y PI<sub>3</sub>K. Esta última quinasa convierte el fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que sirve como plataforma para el reclutamiento de PDK1 y AKT. Cuando en la membrana plasmática, AKT es fosforilado por PDK1 y mTORC2, se promueve la fosforilación de AS160 y RGC lo que lleva a sus respectivas inhibiciones y la subsecuente exocitosis de GSV mediante la activación de GTPasas involucradas en la exocitosis de estas vesículas. Modificado de Leto y Saltiel (Leto y Saltiel, 2012).

Este tipo de exocitosis regulada de GLUT4 inducida por insulina ha sido bien estudiada en adipocitos y células musculares (Pessin y Saltiel, 2000). GLUT4 es uno de los miembros de la familia de transportadores de hexosas GLUT o SLC2, que presenta alta afinidad por la glucosa y esta expresado principalmente en músculo y tejido adiposo (Mueckler y Thorens, 2013). Ante el estímulo con insulina o el ejercicio físico, se produce la exocitosis de estas vesículas GSVs que almacenan este transportador, lo que aumenta más de diez veces la captación de

glucosa por los tejidos respecto a una situación basal (Bogan y Kandror, 2010). Respecto a la estructura de las GSVs, son vesículas de doble membrana que se originan a partir del compartimento de *trans*-Golgi y que se encuentran en un equilibrio dinámico con el mismo y con compartimentos endosomales como los compartimentos de reciclado endocítico (Figura 5) (Shewan y col., 2003; Karylowski, Zeigerer, Cohen y McGraw, 2004). En base a la composición proteica las GSVs se caracterizan por la presencia de GLUT4, IRAP (del inglés *insulin-responsive aminopeptidase*), sortilin, VAMP2 (del inglés *vesicle-associated membrane protein 2*) y LRP1, como los componentes mayoritarios de estas vesículas (Leto y Saltiel, 2012; Jedrychowski y col., 2010). Aunque las funciones de estas proteínas en las GSVs aún no han sido caracterizadas completamente, se conoce que sortilin, IRAP y LRP1 interactúan en el lumen de estas vesículas lo que sería clave para la formación y estabilidad de las mismas (Jedrychowski y col., 2010; Shi, Huang y Kandror, 2008). Mientras que, VAMP2 es una  $\nu$ -SNARE requerida para la fusión de las GSVs a la membrana plasmática (Leto y Saltiel, 2012).



**Figura 5. Tráfico intracelular de GLUT4.** **A)** GLUT4 cicla constantemente entre compartimentos endosomales y la MP. Luego de su endocitosis, GLUT4 puede retornar a la superficie celular a través de diferentes vías, una de ellas implica su paso por endosomas de reciclado endocítico rápido o lento en condiciones basales. Otra de las posibilidades, es que ante el estímulo con insulina se promueva además su exocitosis desde vesículas GSVs hacia la MP. Insulina es capaz de aumentar de 10-40 veces los niveles de GLUT4 en la superficie celular al favorecer no solo el reciclado endocítico sino además la exocitosis de GSVs que almacenan este transportador. Este tráfico intracelular de GLUT4 requiere de la participación de varias GTPasas involucradas en los diferentes pasos, como ser Rab5, Rab4 y Rab11, entre otras. **B)** La formación de las GSVs se produce gracias a la donación de membrana principalmente a partir del compartimento de *trans*-Golgi. En el lumen de esta estructura GLUT4, IRAP, sortilina y LRP1 interaccionan entre sí formando complejos de proteínas oligoméricas. Mediante la participación de la GTPasa ARF6 y el reclutamiento de proteínas adaptadoras y clatrina se produce la formación de las GSVs. Ante el estímulo de insulina se produce el aumento de la liberación de GSVs ya que se inactiva Rab31 y se activan las GTPasas involucradas en la vía exocítica como Rab10 en adipocitos y Rab8 y Rab14 en células musculares que favorecen la movilización de GSVs hacia la MP. Modificado de Leto y Saltiel (Leto y Saltiel, 2012).

Las GSVs no se movilizan a la membrana plasmática, o lo hacen muy lentamente en ausencia de insulina, lo que sugiere la existencia de un mecanismo especializado que retiene a estas vesículas en el interior celular en músculo y tejido adiposo (Zeigerer y col., 2002; Govers y col., 2004; Muretta y col., 2008). Ante el estímulo con insulina, se produce una rápida movilización de las GSVs hacia la superficie, pero cuando el reservorio de GSVs preformadas se agota se ve favorecida la producción de nuevas GSVs desde los compartimentos donores de estas estructuras (Muretta y col., 2008; Xu y col., 2011). Además la insulina favorece el reciclado endocítico de GLUT4 a través de compartimentos de reciclado endocítico rápido, dependientes de la GTPasa Rab4, o lento, dependiente de la

GTPasa Rab11 (Mari y col., 2006). Si bien el reciclado endocítico de GLUT4 se ve favorecido, la insulina incrementa la expresión de este transportador en la superficie celular principalmente promoviendo la exocitosis de las GSVs. Este evento se puede separar en tres procesos distintos: movilización a la periferia celular; anclaje y fusión con la membrana plasmática (Leto y Saltiel, 2012). De esta manera incrementa la expresión de GLUT4 en la superficie celular lo que favorece la captación de glucosa extracelular. Cualquier alteración en el tráfico GLUT4 hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina puede llevar al desarrollo de resistencia a insulina (Ng y col., 2008).

### **1.2.3 Resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina es la disminución de la capacidad de ésta hormona para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como músculo esquelético, hígado o tejido adiposo, y se presenta de manera sostenida en enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes mellitus (DM) tipo 2, siendo una de las principales causas de la enfermedad cardiovascular (ECV) (Yaribeygi y col., 2018). Existen otras circunstancias como son la edad, la gestación y el síndrome de ovario poliquístico, donde la resistencia a la insulina también juega un papel importante (Fachinni y col., 2001).

La resistencia a la insulina es, quizás, el componente esencial del síndrome metabólico (SM), pero estos términos no son equivalentes. La resistencia a la insulina se refiere a un mecanismo fisiopatológico, mientras que el SM es un término descriptivo de una situación clínica de alto riesgo para el desarrollo de ECV.

Los mecanismos responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina son múltiples y están sujetos a variabilidad interindividual. Los mismos se clasifican según el nivel topográfico en: a) *nivel pre – receptor* (antes de la unión insulina – IR), b) *nivel receptor* (en la unión insulina – IR) o c) *nivel post – receptor* (tras la unión de insulina –IR). Los defectos post – receptor son los más frecuentes en situaciones patológicas de mayor prevalencia clínico – epidemiológica como la

obesidad, SM y DM tipo 2, y están asociados a una o varias de las siguientes alteraciones:

a) Defectos del IR, en la activación de proteínas IRS o de la fosfatidilinositol-3-quinasa, como se ha detectado en el músculo esquelético en pacientes con DM tipo 2 (Saltiel y Khan 2001). En este sentido, es importante destacar que en cerebro e hígado se ha demostrado que LRP1 es crucial para la activación del IR mediado por insulina. De esta manera la pérdida de la expresión de LRP1 lleva a la alteración en el tráfico de IR hacia la membrana plasmática, lo que genera una disminución de la señalización intracelular inducida por insulina y, por ende, la reducción de la captación de glucosa en neuronas y hepatocitos (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016).

b) Antagonismo de la acción de la insulina por citoquinas del tejido adiposo, como la leptina, TNF- $\alpha$ , resistina, adiponectina o la proteína acrp30, que tienen efectos parácrinos y autócrinos, que pueden modular la actividad de otros tejidos sensibles a la insulina (Hotamisligil y col., 1996; Matsubara y col., 2000; Weyer y col., 2001; Berg y col., 2001).

c) Antagonismo de la acción de insulina por ácidos grasos no esterificados (AGNE) y / o ácidos grasos libres (AGL). En la DM tipo 2 o en la obesidad las concentraciones plasmáticas de AGNE y AGL están aumentadas, por lo que se les atribuye un papel importante en el desarrollo y mantención de la resistencia a la insulina, ya que interfieren con los procesos de captación, transporte y utilización de glucosa inducidos por la insulina en el músculo esquelético y cardíaco. El mecanismo por el que estos ácidos grasos ejercen su acción antiinsulínica aún es desconocido, pero se cree que tiene un efecto reductor de la activación de proteínas claves, como IRS o PI3K, lo que altera la cascada de señalización intracelular inducida por insulina (Chen y col., 2018).

d) El estrés oxidativo, que se asocia a la disfunción endotelial precoz en la obesidad, DM tipo 2 y SM, e inhibe la señalización intracelular inducida por

insulina, lo que reduce la efectividad de la acción de la hormona promoviendo o potenciando la resistencia a la insulina (Aoi y col., 2013).

e) Debido a otras alteraciones relacionadas a factores genéticos (Itahana y col., 2018; Davegardh y col., 2018; Wen y Duffy, 2017) o a diversas situaciones fisiopatológicas que se caracterizan por una producción inapropiada de determinadas hormonas con efectos opuestos a la acción de la insulina, como la hormona del crecimiento (por ejemplo, en la acromegalia) o catecolaminas (por ejemplo, en el feocromocitoma) que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina (Sánchez-Margalet, 1999).

En resumen, las consecuencias de la resistencia a la insulina son muy amplias, ya que se generan una gran variedad de anormalidades entre las que se incluyen hiperglucemia, hiperinsulinemia, aumento del nivel de triglicéridos y LDL en sangre, una disminución de los niveles de HDL, aumento de secreción de VLDL por parte del hígado, desórdenes en la coagulación, aumento de resistencia vascular, cambios en las concentraciones de hormonas tiroideas, atenuación del flujo de sangre periférico y ganancia de peso. Por todo ello, la resistencia a la insulina se asocia con obesidad, hipertensión, dislipemia, aterosclerosis y la ECV.

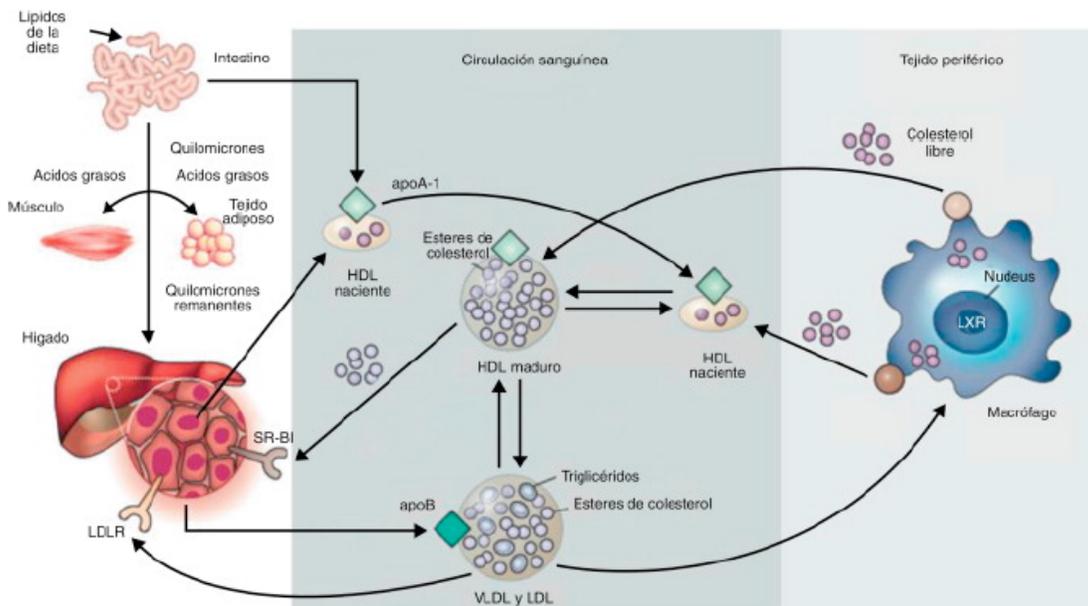
#### **1.2.4 Resistencia a la insulina y dislipemia**

La resistencia a la insulina se asocia a distintos trastornos del metabolismo de los lípidos, promoviendo un aumento de la lipólisis y de la movilización de ácidos grasos libres hacia la circulación sanguínea, lo que lleva a la alteración del perfil lipídico y de lipoproteínas. Las lipoproteínas son complejos moleculares formados por lípidos y proteínas (apolipoproteínas), que presentan una estructura pseudomicelar. Dependiendo del tamaño, densidad y porcentaje de lípidos las lipoproteínas se dividen en quilomicrones (QM) y lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad (HDL, LDL y VLDL, respectivamente). En la tabla 1, se resumen las principales características físico-químicas y funciones de las lipoproteínas.

**Tabla 1.** Características físico-químicas y principales funciones de las lipoproteínas.

Lipoproteína	QM	VLDL	LDL	HDL
%	2	7	21	46
Tamaño (nm)	>200	30-200	10-30	<10
Densidad (g/ml)	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Triglicéridos (%)	87	64-80	10	2-5
Colesterol (%)	6	8-13	45	20
Fosfolípidos (%)	4	6-15	25	30
Principales apolipoproteínas	B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E	A-IV, B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E
Origen	Lípidos dieta	Lípidos hepáticos	Metabolismo VLDL	Lípidos tisulares
Función	Transporte de triglicéridos de la dieta (postprandial)	Transporte de triglicéridos hepáticos a tejidos periféricos	Transporte de colesterol y fosfolípidos a tejidos periféricos	Transporte reverso de colesterol

Mientras tanto, la Figura 6. resume los principales mecanismos que median el metabolismo exógeno y endógeno de las lipoproteínas.

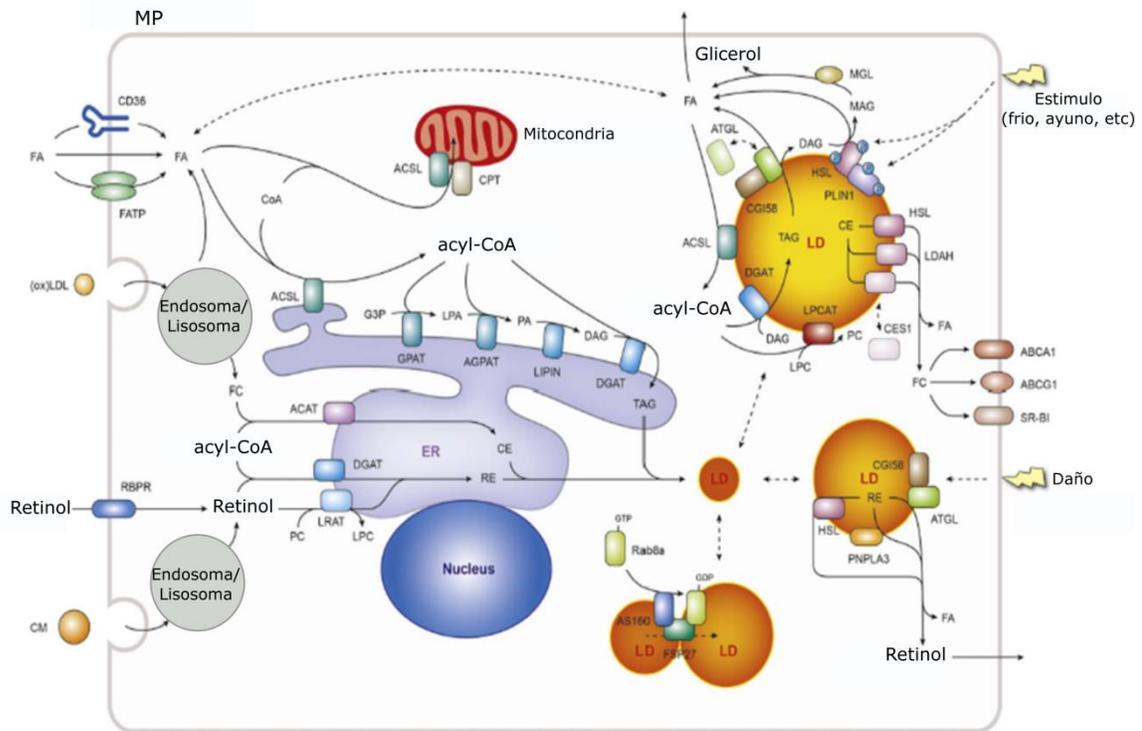


**Figura 6. Metabolismo de las lipoproteínas.** Los lípidos de la dieta son absorbidos en el intestino y empaquetados en forma de QM que son transportados a través de la sangre hacia los tejidos periféricos. La lipoproteína lipasa (LPL) del endotelio hidroliza los TG de los QM lo que permite la captación de ácidos grasos por el músculo y el tejido adiposo, mientras que los quilomicrones remanentes son metabolizados en el hígado. En hígado se forman las VLDL que se encargan del transporte endógeno del colesterol, estas lipoproteínas se convierten en LDL por medio de la acción de la LPL. Las LDL son captadas en el hígado y demás órganos mediante su interacción con LDL-R, lo que favorece la utilización del colesterol por los tejidos. Por otra parte, las HDL son las partículas encargadas del transporte reverso del colesterol. Estas lipoproteínas se generan en el hígado e intestino y captan el colesterol desde los tejidos periféricos a través del transportador ABCA-1. Finalmente, las HDL son captadas por el hígado a través del receptor *scavenger-B1*. Modificado de Rader y Daugherty, 2008.

El exceso de ácidos grasos libres, que se libera en condiciones de insulino-resistencia, se reesterifica en el hígado para la formación de triglicéridos, que junto con las apolipoproteínas B-100, E y C y colesterol esterificado (CE), conllevan al incremento en la formación de VLDL (Gibbons y col., 2004). Paralelamente, en condiciones de resistencia a la insulina se produce una disminución en la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), enzima que digiere los triglicéridos de las VLDL en el endotelio de capilares de tejido adiposo y muscular (Su y Abumrad, 2009). El exceso en la secreción de VLDL y su inadecuado procesamiento por la LPL genera la acumulación de partículas como IDL (lipoproteína de densidad intermedia o VLDL remanente) y LDL, ricas en triglicéridos y con menos colesterol que el habitual lo que hace que tengan un menor tamaño y una densidad

incrementada por lo que se las denomina como LDL “pequeñas y densas” y presentan altas características aterogénicas (Laws y col., 1997; Goldberg, 2001; Wilcox, 2005, Grundy, 2006). Estas LDL se unen con facilidad a los proteoglicanos de la matriz extracelular arterial, lo que favorece la modificación de las mismas mediante oxidación, glicosilación, agregación (agLDL), entre otras modificaciones a nivel del endotelio (Bancells y col., 2010, Soran y col., 2016). El exceso de estas lipoproteínas modificadas se acumula de manera ectópica en diferentes tejidos, entre ellos músculo liso, esquelético y miocardio alterando la funcionalidad de los mismos (Mcneely y col., 2001; Laclaustra y col., 2005; Samouillan y col., 2014; Borén y col., 2013). Los receptores involucrados en la captación de estas lipoproteínas son los receptores tipo *scavenger* (SR) y los de la familia del LDL-R (LRP1 y VLDL-R) principalmente. Los receptores tipo *scavenger* (SR) son una familia de receptores de superficie celular que unen múltiples ligandos y participan en diversos procesos (Canton, J., Neculai, D. y Grinstein, S., 2013; Feng y col., 2011). Si bien existen diferentes clases de SR, los más involucrados en la captación de lipoproteínas modificadas son los de clase A y B. Dentro de los SR de clase B, es importante destacar el rol de CD36 en la captación de LDL oxidadas en macrófagos lo que lleva a su transformación a células espumosa, contribuyendo al desarrollo y agravamiento de la lesión aterosclerótica (Febbraio y col., 2000; Park y col., 2009). Por otro lado, dentro de la familia de LDL-R, ha sido demostrado que LRP1 es clave en la internalización de agLDL en VSMCs, ya que la utilización de ligandos de LRP1 como lactoferrina, como así también de anticuerpos anti-LRP1 o siRNA para este receptor redujeron de manera significativa la captación de CE, siendo el dominio CR9 del clúster II del LRP1 crítico para la captación de las agLDL (Llorente-Cortés y col., 2000; Llorente-Cortés y Badimon, 2005; Costales y col., 2015). Por otro lado, las agLDL prolongan el tiempo de vida media de LRP1 en VSMCs, lo que favorece la captación de CE a partir de estas lipoproteínas modificadas en este tipo celular (Cal y col., 2013). La acumulación ectópica de lipoproteínas modificadas lleva a la formación de *lipid droplets* (LD) en hepatocitos y células musculares, estas organelas son sintetizadas a partir de membrana donada por el retículo

endoplásmico y por aporte de colesterol esterificado de la captación de las lipoproteínas procesadas en los lisosomas (Figura 7) (Walther y Farese, 2012; Walther y col., 2017; Xu y col., 2017). Ha sido demostrado que la formación de LD en células diferentes a las del tejido adiposo como en hepatocitos y células musculares está asociado con la alteración en la respuesta a insulina en esos tejidos, aunque el mecanismo involucrado en este proceso es aún desconocido (Boren y col., 2013). Si bien los adipocitos son células que forman LD para la reserva de lípidos neutros, la sobreexposición a estos genera la alteración de la respuesta a la insulina en estas células principalmente atribuida en la actualidad al efecto estérico de estos LD en el citoplasma celular (Kim y col., 2015).



**Figura 7. Dinámica de la biogénesis de *Lipid droplets*.** Los ácidos grasos (FA) ingresan a la célula mediante su unión a receptores como CD36 y FATP. Mientras que las lipoproteínas LDL (principalmente en hepatocitos) u oxLDL (principalmente en macrófago) ingresan a la célula mediante endocitosis mediada por receptor. El CE de estas lipoproteínas se hidroliza a FA y colesterol libre (CL) en los lisosomas. El CL es transportado hacia el retículo endoplásmico (ER) a través de peroxisoma y se reesterifica a CE en ER por acción de la enzima acyl-CoA-colesterol acyltransferasa (ACAT). Este CE es empaquetado con fosfolípidos y proteínas provenientes de la membrana del ER formando los *lipid droplets* (LD). Estas organelas pueden sufrir hidrólisis por estímulos como el frío o la inanición, de esta manera se liberan FA que sufren  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias para la obtención de energía. Modificado de Xu y col., 2017.

### 1.2.5 Resistencia a la insulina, dislipemia y disfunción cardíaca

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2011). En base a datos estadísticos, se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV (Mathers et al., 2006). En los últimos años, en las sociedades occidentales, ha incrementado la prevalencia de la obesidad y de las enfermedades metabólicas relacionadas con la ECV, como el SM y la DM tipo 2 (Haffner y Taegtmeier, 2003). Una característica subyacente en los individuos que presentan dichas patologías, es la resistencia a la insulina y el daño cardiovascular (Saltiel y Khan, 2001; Falcão-Pires y Leite-Moreira, 2012). Como

resultado, estos pacientes tienen un riesgo mucho mayor de infarto agudo de miocardio y de apoplejía. A lo largo de varios estudios clínicos se ha demostrado una fuerte relación entre la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, que parece tener un importante papel en el desarrollo de las complicaciones patogénicas macrovasculares (Ebara y col., 2000; Wong y Marwick, 2007; Witteles y Fowler, 2008). Sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo molecular implicado en el impacto de la resistencia a la acción de la insulina en la función cardíaca.

El corazón es un órgano que requiere de una enorme cantidad de energía para su función diaria. El metabolismo cardíaco está regulado por la disponibilidad de sustratos, presencia de hormonas como la insulina, demanda de energía por trabajo cardíaco y el aporte de oxígeno. Dada la importancia de la función contráctil continua de este órgano, es de esperar que el corazón sea capaz de utilizar sustratos diferentes, como ser ácidos grasos, cuerpos cetónicos, aminoácidos o glucosa, para generar ATP bajo diversas situaciones fisiológicas y patológicas (Depre y col., 1999). La captación de glucosa por el miocardio representa aproximadamente el 30 % de la fuente de energía disponible para este tejido, y está determinada principalmente por dos factores independientes pero interrelacionados, como son la concentración local de insulina y la intensidad del ejercicio/contracción. La insulina favorece la captación y utilización de glucosa en los cardiomiocitos, mediante la activación de la cascada de señalización intracelular inducida por la hormona y la movilización de GLUT4 hacia la membrana plasmática (McQueen y col., 2005; Bertrand y col., 2008; Domenighetti y col., 2010; Saha y col., 2011). De esta manera, la resistencia a la insulina tiene una marcada influencia en el metabolismo cardíaco debido a que la acción de la insulina en el miocardio se ve afectada, el aporte de sustratos se encuentra alterado y existen inconvenientes en las adaptaciones metabólicas en este órgano (Young y col., 2002; Neubauer y col., 2007; Doehener y col., 2014).

La resistencia a la insulina produce un marcado incremento de la ECV debido a la cardiomiopatía diabética, definida como una disfunción ventricular producida en ausencia de enfermedad coronaria o hipertensión. Es importante destacar que el

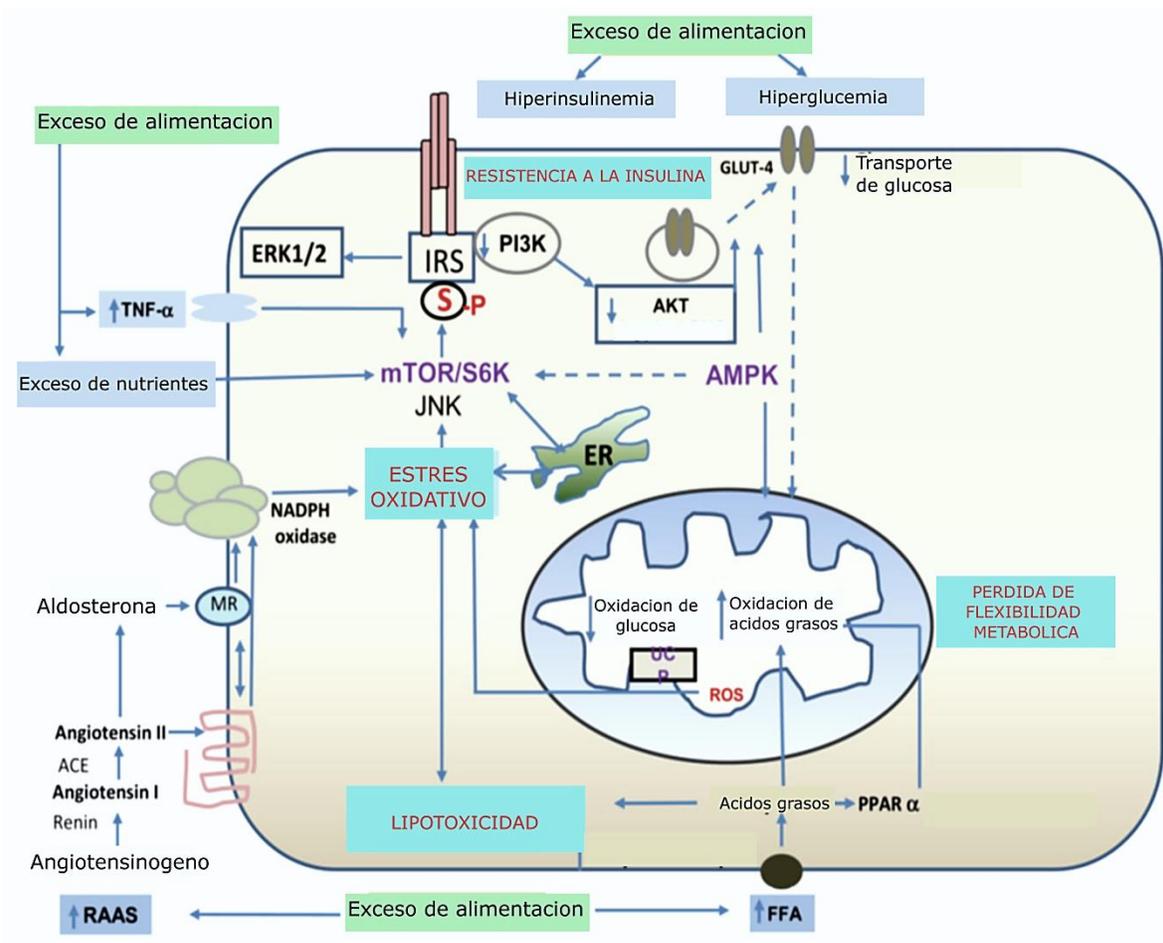
miocardio que presenta mayor actividad metabólica y, que por ende, es afectado por acción de insulina es principalmente el del ventrículo izquierdo. Si bien la patogénesis de la cardiomiopatía diabética es indudablemente multifactorial, se ha propuesto que las alteraciones en el metabolismo energético cardíaco, como el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos, serían uno de los principales mecanismos implicados (Jagasia y McNulty, 2003). Los pacientes con cardiomiopatía diabética muestran cambios en la estructura cardíaca con hipertrofia ventricular izquierda concéntrica y aumento de la masa cardíaca. Mientras que a nivel de la ultraestructura se observa hipertrofia de los cardiomiocitos, fibrosis perivascular y un incremento en el depósito de lípidos y colágeno (Horwich y Fonarow, 2010; Ashrafian, Frenneaux y Opie, 2007; Gray y Kim, 2011).

Durante la resistencia a la insulina el corazón está expuesto a un ambiente hiperinsulinémico e hiperglucémico. Inicialmente, este órgano se adapta a este ambiente incrementando la expresión de proteínas y receptores involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, de esta forma aumenta su dependencia a este sustrato como combustible ya que no puede utilizar glucosa, este cambio del metabolismo de la glucosa al de los ácidos grasos disminuye la eficiencia cardíaca (Nagoshi y col., 2011; Saha y col., 2011; Sowers, 2012; Gray y Kim, 2011, Ormazabal y col., 2018). Sin embargo, la exposición continuada a este ambiente metabólico conduce a una disfunción cardíaca, debido a que la excesiva disponibilidad de ácidos grasos excede la tasa de uso por el corazón, produciendo una acumulación lipídica nociva en los cardiomiocitos (van de Weijer, Schrauwen-Hinderling y Schrauwen, 2011; Samouillan y col., 2014).

La resistencia sistémica a la insulina junto con el depósito patológico de lípidos en el corazón modifica múltiples procesos intracelulares como la apoptosis inducida por ceramida, la producción de especies reactiva de oxígeno, la inflamación, la disfunción mitocondrial y/o el estrés del retículo endoplásmico (RE), como se resume en la Figura 8 (Bugger y Abel, 2014; Chokshi y col., 2012; Kim, Wei y Sowers, 2008; Aroor y col., 2012; Cnop, Fougelle y Velloso, 2012; Park y Goldberg, 2012; Rocha y Folco, 2011; Sena y col., 2009). Estos eventos llevan a la alteración

de la flexibilidad metabólica, con menor utilización de la glucosa debido por un lado a la alteración de la señalización de la insulina y por otro a la disminución de la expresión de genes de enzimas involucradas en la glicolisis y oxidación de la glucosa, lo que termina generando resistencia a la insulina cardíaca secundaria (Bertrand y col., 2008; Zhang y col., 2008; Pulakat y col., 2012; Falcão-Pires y Leite-Moreira, 2012). Esto tiene impacto sobre la utilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y por ende en la contractibilidad cardíaca (Lebeche, Davidoff y Hajjar, 2008; Domenighetti y col., 2010; Ruiz-Ramírez y col., 2016). Todas estas alteraciones a nivel intracelular, contribuyen al remodelado cardíaco que resulta en la hipertrofia ventricular izquierda, alteración de la función diastólica, muerte de cardiomiocitos y fibrosis cardíaca que son características de la cardiomiopatía diabética (Horwich y Fonarow, 2010; Ashrafian, Frenneaux y Opie, 2007; Gray y Kim, 2011; Tuunanen y Knuuti, 2011; Samoullian y col., 2014).

Aunque la relación entre resistencia a la insulina, dislipemia y la enfermedad cardiovascular se conocen desde hace décadas, los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de estos procesos y su interrelación aún no están claros.



**Figura 8. Mecanismos moleculares de la resistencia a insulina, dislipemia y disfunción cardíaca.** Las principales consecuencias de la resistencia a la insulina y la dislipemia en el miocardio son los problemas en el manejo del calcio intracelular, inflexibilidad metabólica, disfunción mitocondrial y endotelial y estrés de RE. Estos eventos contribuyen a la hipertrofia cardíaca, muerte los cardiomiocitos, fibrosis cardíaca y disfunción diastólica. La progresión de la lesión cardíaca conduce a disfunción contráctil e insuficiencia cardíaca. Modificado de Annayya y col., 2012.

En resumen, parte de los mecanismos moleculares, bioquímicos y celulares implicados en la resistencia a la insulina podrían ser explicados desde el aporte funcional del LRP1 y su capacidad de regular la actividad del IR. En este sentido, y basados en los antecedentes descritos en este capítulo, es posible que LRP1 desempeñe diversas funciones celulares inducidas por la insulina, influyendo de algún modo la distribución subcelular y el tráfico intracelular de este receptor regulado por acción de la hormona. Este efecto regulatorio de la insulina permitiría que LRP1 esté involucrado en procesos de migración y activación del componente

celular retinal, en particular de células gliales de Müller, en procesos fisiológicos y patológicos de la retina. De la misma manera, sería importante establecer si LRP1 tiene una activa capacidad de regular la función del IR, actuando como un receptor de andamiaje o *scaffold protein* necesario para la activación de IR inducida por la hormona. En este sentido, la producción de lipoproteínas modificadas del tipo agLDL, que se unen a LRP1 podrían ser responsables de inducir cambios en la funcionalidad de este receptor, lo que afectaría la activación de IR llevando consecuentemente a resistencia a la insulina. Este fenómeno, extrapolado a nivel de los cardiomiocitos, podría ser responsable de la producción de esteatosis y disfunción cardíaca. Es por ello, que el estudio bioquímico y celular de la relación del tráfico intracelular de LRP1 y la respuesta celular a la insulina constituye un aspecto interesante para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la retinopatía y la cardiomiopatía diabética.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue caracterizar la relación funcional entre el tráfico intracelular de LRP1 y la respuesta a la insulina. Dentro de este marco general, se pretendió evaluar si insulina cumple algún rol en la regulación del tráfico intracelular de LRP1, y como este evento regulatorio a su vez impacta en los procesos metabólicos celulares regulados por la insulina. De este modo, este trabajo de tesis presenta una nueva perspectiva en el estudio bioquímico y celular de la participación de LRP1 en la respuesta celular a la insulina tanto a nivel de la retina como asociado a las dislipemias a nivel del músculo cardiaco, dos de las dianas tisulares más afectadas durante la resistencia a la insulina.

### **2.2 Objetivos específicos**

Como objetivos específicos se propuso:

- 1) Estudiar el tráfico intracelular de LRP1 por acción de insulina, caracterizando:
  - i) Las estructuras vesiculares de almacenamiento de LRP1.
  - ii) Las vías de señalización intracelular implicadas en el tráfico de LRP1 activadas por insulina.
  - iii) Las proteínas de transporte vesicular implicadas en el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática activadas por acción de insulina.
- 2) Establecer la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a insulina, y cómo este evento es regulado por la presencia de agLDL, caracterizando:
  - i) El rol de LRP1 en la captación de agLDL.
  - ii) La distribución subcelular de LRP1 en presencia de agLDL.
  - iii) La asociación molecular entre IR y LRP1, la señalización intracelular inducida por insulina y la regulación de la exocitosis de GLUT4 en presencia de agLDL.

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Materiales

### Kits y reactivos

GlutaMAX™	Gibco®
HBSS buffer	Gibco®
DMEM High Glucose	Gibco®
Medio Claycomb High Glucose	Sigma-Aldrich
<i>Penicillin/Streptomycin</i> 10 000 U/ml	Gibco®
Nor-epinefrina	Sigma-Aldrich
Fibronectina	Sigma-Aldrich
Gelatina	Sigma-Aldrich
Cóctel de inhibidores de proteasas	Sigma-Aldrich
EZ Link Sulfo-NHS-SS Biotina	Thermo Scientific
<i>Hoestch</i> 33258	Molecular Probes®
Lipofectamine® 2000	Invitrogen
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen
Insulina	Sanofi-Aventis
RNAiMAX	Invitrogen
Lysotracker <i>red</i> DND-99	Molecular Probes®
LY-294002	Sigma-Aldrich
Kit para MiniPreps	Qiagen
Kit para MidiPreps	PureLink®
PEI	Polysciences, Inc.
PMA	Sigma-Aldrich

Suero fetal bovino	Internegocios
Suero fetal de cabra	Gibco®
Trypsin 0,5% EDTA	Gibco®
HEPES	Gibco®
Opti-MEM 1X	Gibco®
Protein A-conjugated agarose beads	Santa Cruz Biotechnology
Pierce™ Streptavidin Agarose beads	Thermo Scientific
TRIzol®	Invitrogen
Wortmannina	Sigma-Aldrich

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marca comercial</b>
APT1A1 (mouse)	WB: 1/2000	Thermo Scientific
Akt (rabbit)	WB: 1/ 500	Cell signaling
p-Akt (rabbit)	WB: 1/500	Merck
AS160 (rabbit)	WB: 1/1000	AbCam
p-AS160 (rabbit)	WB: 1/1000	AbCam
Calreticulina (rabbit)	WB: 1/5000 IF: 1/200	Santa Cruz
Caveolina (rabbit)	IF: 1/250	AbCam
Clatrina (rabbit)	IF: 1/250	Sigma-Aldrich
EEA1 (rabbit)	IF: 1/200	AbCam
Gal1 (mouse)	IF: 1/50	AbCam
Gal3 Alexa 488	IF: 1/200	AbCam
GLUT1 (mouse)	IF: 1/200	AbCam
GLUT2 (mouse)	IF: 1/200	AbCam
GLUT4 (rabbit)	WB: 1/ 2000 IF:1/150 ME: 1/15	AbCam
GLUT4 (mouse)	WB: 1/1000 IF: 1/200	AbCam
HA (rabbit)	IF: 1/ 500	Sigma-Aldrich
IR (rabbit)	WB: 1/1000 IF: 1/ 100 IP:2 ug/200 ug proteina	Cell signaling
p-IR (rabbit)	WB:1/500	Cell signaling
LRP1 $\beta$ (rabbit)	WB: 1/10000 IF: 1/200 ME: 1/ 20	AbCam
LRP1 (mouse)	IF: 1/100	AbCam
LAMP2 (mouse)	IF: 1/100	AbCam
Myc (mouse)	IF: 1/100	AbCam
$\beta$ -actina (mouse)	WB: 1/5000	AbCam
Rab4 (rabbit)	IF: 1/100	AbCam
Rab5 (rabbit)	IF: 1/250	AbCam

Rab7 (rabbit)	IF: 1/100	AbCam
Rab8A (mouse)	IF: 1/100	AbCam
Rab10 (mouse)	IF: 1/100	AbCam
Rab11 (rabbit)	IF: 1/100	AbCam
Sortilin (rabbit)	WB: 1/200 IF: 1/200 200 ME: 1/20	AbCam
TGN46 (rabbit)	IF: 1/250	AbCam
TfR (mouse)	WB: 1/1000	Abnova
VAMP2 (rabbit)	WB: 1/2000 IF: 1/250 ME:1/25	AbCam

<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marca comercial</b>
Goat anti-mouse Alexa flúor 488	IF: 1/800	Molecular Probes®
Goat anti-mouse Alexa flúor 594		
Goat anti-mouse Alexa flúor 647		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 488		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 594		
Goat anti-rabbit Alexa flúor 647 Donkey anti-goat Alexa fluor 488		
Goat anti-mouse IgG IRDye® 680CW	WB: 1/10000	LI-COR®
Goat anti-rabbit IgG IRDye® 800CW		

## Plásmidos

### Construcción

mLRP4-GFP

GLUT4-GFP

Rab8A-GFP

Rab8AT22N-GFP

Rab10-GFP

Rab10T23N-GFP

siRNA-Rab8A

siRNA-Rab10

siRNA-Random

Vector GFP

### Procedencia

Ceschin DG, Chiabrande Lab.

Amira Klip (Toronto, Canada)

Ambion (Austin, TX, EE.UU.)

Sigma-Aldrich

Ambion (Austin, TX, EE.UU.)

María Isabel Colombo (Mendoza, Argentina)

## Medios, buffers y soluciones

### Buffer de corrida

3,03 g Tris

14,4 g glicina

1,0 g SDS

H<sub>2</sub>O d.c.s.p. 1000 ml

### PBS 10X

1,4 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>O d.c.s.p. 1000 ml

pH 7,3

### Buffer de transferencia

3,03 g Tris

14,4 g glicina

### Stacking buffer

10 g Tris base

H<sub>2</sub>O d.c.s.p. 100 ml

200 ml metanol (20%)  
H<sub>2</sub>Od c.s.p. 1000 ml  
pH 6,8

LB

10 g tripeína (triptona)  
5 g extracto de levadura  
10 g NaCl  
H<sub>2</sub>Od c.s.p. 1000 ml  
Autoclavar 20 min a 121 °C

Resolving buffer

18,5 g Tris base  
H<sub>2</sub>Od c.s.p. 100 ml  
pH 8,8

LB-Agar

100 ml LB  
1,5 g agar-agar  
Autoclavar 20 min a 121° C

Sample buffer

1,25 ml *stacking buffer*  
2,5 ml glicerol  
2 m SDS al 10%  
0,2 ml Azul de bromofenol 0,5% (v/v)  
H<sub>2</sub>Od c.s.p. 9,5 ml

Medio para congelamiento 95 %

0.5 ml DMSO  
9.5 ml SFB

Solución de bloqueo para *Western blot*

5 g leche descremada

Solución de Albumina/Saponina 100X

20 g albúmina sérica bovina  
5 g saponina

PBS 1X c.s.p. 100 ml

Solución de incubación con anticuerpo

TBS 1X c.s.p. 100 ml

5 g albúmina sérica bovina

TBS 1X c.s.p. 100 ml

Solución de lisis no desnaturizante

20 mM Tris-HCl

137 mM NaCl

10% de glicerol

1% Triton-X100

EDTA 2 mM

pH 8,0

1 mM PMSF

10 mM orto-vanadato de sodio

Inhibidores de proteasas

Solución de lisis RIPA

50 mM Tris-HCl pH 8

150 mM NaCl

1% Tritón X-100

0,5% desoxicolato de sodio

0,1% SDS

1 mM PMSF

10 mM orto-vanadato de sodio

Inhibidores de proteasas

Solución de montaje

2,4 g Mowiol 4-88

6 g glicerol

6 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

12 ml *buffer* fosfato 0,2 M

Solución de *quenching*

50 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS 1X

TBS 10X

137 mM NaCl

20 mM Tris

TBS-Tween 20

TBS 1X

0,5% Tween 20

Solución de persulfato de amonio

10 g persulfato de amonio

H<sub>2</sub>Od c.s.p. 100 ml

FACS buffer

2% SFB

5 mM EDTA

0,1% azida sódica

En PBS 1X

Solución colorante

0,25 g Azul Brillante Coomassie R-250

45,0 ml metanol

10 ml ácido acético glacial

H<sub>2</sub>Od c.s.p. 100 ml

Solución decolorante

30 ml metanol

10 ml ácido acético

H<sub>2</sub>Od c.s.p. 100 ml

Detaching buffer

10 mM glucosa

3 mM EDTA

PBS 1X

pH 7,4

Medio de ayuno

DMEM-High glucose

0% SFB

## **Líneas celulares y cepas bacterianas**

Línea celular MIO-M1: (del inglés *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*) es una línea de células gliales de Müller inmortalizadas aisladas de retinas humanas. La línea MIO-M1, fue amablemente donada por la Dra. G. Astrid Limb

(University College London, Institute of Ophthalmology y Moorfields Eye Hospital, London, United Kingdom) a la Dra. María Cecilia Sanchez (CIBICI–CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, FCQ–UNC). Esta línea posee las mismas características fenotípicas y funcionales que los cultivos primarios de células de Müller en relación a marcadores antigénicos y respuesta electrofisiológica al glutamato, respectivamente. En cultivo *in vitro* crecen como una monocapa de células adherentes con morfología bipolar. Esta línea celular fue cultivada en medio DMEM-High glucose (4,5 mg / ml) suplementado con 2 mM de L-glutamina (GlutaMAX; Invitrogen), suero fetal bovino (SFB) 10 % y 100 U / ml de penicilina / estreptomicina (Invitrogen) a 37 ° C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Línea celular HL-1: es una línea celular de cardiomiocitos de ratón generada por el Dr. W.C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, Nueva Orleans, Louisiana, EE. UU.). Esta línea celular presenta características fenotípicas y electrofisiológicas similares a los cardiomiocitos adultos. Las células HL-1 fueron cultivadas en medio Claycomb (Sigma-Aldrich) Suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen), 100 µ norndinefrina (Sigma-Aldrich), 100 unidades / ml de penicilina, 100 g / ml de estreptomicina (Invitrogen) y l-glutamina 2 mM (GlutaMAX; Invitrogen) en placas de plástico, recubiertos con 12,5 g / ml de fibronectina (Sigma-Aldrich) y gelatina al 0,02% , en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 ° C.

## **Bacterias**

*E. coli* BL21: se emplearon para la purificación de la proteína recombinante GST-RAP.

*E. coli* DH5α: se emplearon para la purificación de plásmidos utilizados en ensayos de transfección transiente de células eucariotas.

*E. coli* TOP10: se emplearon para la purificación de plásmidos utilizados en ensayos de transfección transiente de células eucariotas.

## **Software**

Adobe Photoshop CS4

Adobe Illustrator CS4

ImageJ

ImageStudio

FlowJo

FluoView 4.0

Graphpad Prism 5.0

Sequence Detection v1.4

Microsoft Office 2010

## **3.2 Métodos**

### Procedimiento de transfección transiente

Se cultivaron células MIO-M1 ( $4 \times 10^5$  células / posillo) en placas de 6 posillos con Opti-MEM 1X suplementado con 10% de SFB, y se transfectaron transitoriamente con 2  $\mu$ g / posillo de plásmidos durante 4 horas, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y Opti-MEM 1X (Gibco®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, estas células se lavaron con HBSS e incubaron durante 18 horas en DMEM-high glucose a 37 ° C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### Procedimiento de silenciamiento

Para inhibir la expresión de proteínas GTPasa, se cultivaron células MIO-M1 (15000 células / ml) en placas de 96 posillos y se transfectaron transitoriamente con 5 pmol / pocillo de siRNA durante 24 horas, utilizando reactivo Lipofectamina ARNiMAX (Invitrogen) y Opti-MEM 1X (Gibco®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para controlar el efecto del silenciamiento, se usó el siRNA de control negativo Silencer™ (Ambion 4390846). El siRNA-Rab8A (Ambion 4390824)

utilizado fue un 21-mer (5'-GCAAGAGAAUUAACUGCA [dT][dT]-3') y el siRNA-Rab10 (Sigma # SASI \_Hs02\_000348924) fue un 21-mer (5'-GCAAUUGGCUUAGAAACAU [dT] [dT] -3'). En todos los casos, los experimentos se realizaron 24 horas después de la transfección. Para probar el nivel de silenciamiento de las proteínas de interés se realizó una inmunofluorescencia analizada posteriormente por microscopía confocal.

### Microscopia confocal

Las células se cultivaron como se mencionó anteriormente sobre *coverslips*, después de finalizados los diferentes tratamientos las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con paraformaldehído/Sucrosa al 4% durante 15 minutos. Luego se incubaron con solución de *quenching* por 20 minutos, se permeabilizaron durante 30 minutos con saponina al 0,5% (v / v) y se bloquearon con BSA al 2%. Finalmente se incubaron con el anticuerpo primario (diluido de 1/100 a 1/250) durante 1 hora, y se reveló con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor (1/800) durante 1 hora. Las células se montaron en portaobjetos de vidrio con Mowiol 4-88 (Merck KGaA, Alemania). Para los análisis de colocalización entre diferentes proteínas celulares se obtuvieron imágenes con el microscopio Olympus FluoView FV1200 (Centro de Micro y Nanoscopia de Cordoba, CEMINCO). Se escanearon células enteras y se obtuvieron secciones ópticas de 0,25 µm perpendiculares al eje z utilizando el objetivo PLAPON 60X Oil/1,42 NA. Las células se procesaron usando el software FluoView 4.0 (Olympus) y los coeficientes de colocalización de Manders se obtuvieron mediante el software ImageJ a través del *plugin JAPoC* (Bolte y Cordeliers, 2006). Las imágenes binarias de los pixeles que colocalizaron se obtuvieron a partir del empleo del *plugin Colocalization Highlighter*. Al menos 20 células por condición fueron analizadas.

### Microscopía electrónica

Las células MIO-M1 fueron transfectadas con el vector que codifica para GFP-GLUT4 y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en presencia o ausencia de insulina 100 nM. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS 1X

durante 2 horas a 4 °C. Después de lavar con PBS 1X solo y PBS que contenía 50 mM de glicina, las células se incubaron con gelatina al 10% 30 minutos a 37 °C y con sacarosa 2,3 M a 4 °C durante 2 horas y luego se congelaron en nitrógeno líquido. Se prepararon criosecciones ultrafinas usando un Leica Ultracut R (IHEM-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina) y se recuperaron con una mezcla de 2% de metilcelulosa y 2,3 M de sacarosa (vol / vol). Las secciones de 60 nm se marcaron con anti-LRP1 (rabbit), seguido de LA marcación con partículas de oro de 15 nm acopladas con proteína A para detectar anticuerpos primarios. Posteriormente, las células se incubaron con una anti-sortilin (rabbit), que se detectó con partículas de oro de 5 nm acopladas con proteína A. Finalmente, las muestras se incubaron con anti-GLUT4 de rabbit, que se detectó con partículas de oro de 10 nm acopladas con proteína A. Para reparar el inmunocomplejo y evitar una posible reacción cruzada, se añadió glutaraldehído al 1% al final de cada procedimiento de marcación. Las secciones se contrastaron y se incluyeron en una mezcla de metilcelulosa y acetato de uranilo, y se observaron con un microscopio electrónico Zeiss 900 (IHEM-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina). También se realizó este ensayo en células MIO-M1 sin transfectar con el vector que codifica para GFP-GLUT4, en este caso las secciones ultra finas se marcaron con el anticuerpo anti-VAMP2 (rabbit), anti-sortilin (rabbit) y anti-LRP1 (rabbit). Estos anticuerpos se detectaron con proteína A acoplada a partículas de oro de 20 nm, 15 nm y 5 nm, respectivamente. El tamaño de las vesículas positivas a GLUT4 / LRP1 / sortilin o LRP1 / sortilin / VAMP2 en células transfectadas o no con GFP-GLUT4, obtenidas por microscopía electrónica, se cuantificó usando el software Gatan Inc. Digital Micrograph 2.31.734. Se analizaron al menos 50 vesículas con triples marcas y se calculó el promedio del diámetro mayor y menor de cada vesícula.

Esta técnica fue realizada con la colaboración del Dr. Claudio Fader (IHEM-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina) y partículas de oro de diferentes tamaños conjugadas a proteína a proteína A fueron amablemente donadas por el Dr. Gareth Griffith (Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL), Heidelberg, Alemania).

### Citometría de flujo para determinar porcentaje de transfección

Células MIO-M1 cultivadas sobre placas de 6 posillos previamente sometidas a ensayos de transfección transiente de plásmidos específicos se levantaron con solución de tripsina-EDTA 10X por 1 minuto a 37 °C y se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm. Se resuspendieron en FACS *buffer* y se adquirieron en el citómetro de flujo sin fijación previa.

### Citometría de flujo para evaluar captación de lipoproteínas marcadas con Dil

Las células HL-1 se incubaron con agLDL-Dil 100 ug/ml durante 8 horas a 37 °C. Posteriormente se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron mediante *scraper* en 1 ml por posillo de *detaching buffer*. Se centrifugaron a 4 °C 5 minutos a 2500 rpm. Los pellets se lavaron con FACS *buffer* y se fijaron con 200 µl de Cytofix en frío durante 20 minutos. Posteriormente las células se lavaron, se resuspendieron en FACS *buffer* y se adquirieron en el citómetro de flujo sin fijación previa.

Para la adquisición de las células de los ensayos de citometría se utilizó el citómetro FACS Canto II-BD y para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo.

### Western blot

Se obtuvieron los extractos proteicos de células MIO-M1, HL-1 y/o HeLa usando solución de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 1%, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, 1 mM de PMSF, 10 mM de ortovanadato de sodio y coctel de inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich)). Cuarenta µg de lisado se diluyeron en *sample buffer* 5X con o sin el agregado de DTT (ditiotreitól) según la necesidad de condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente, dada por las especificaciones de los fabricantes de los anticuerpos primarios. Las muestras sin DTT se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y las muestras con DTT se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Luego las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (10% de

acrilamida/bis-acrilamida) en presencia de SDS (EGPA-SDS). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (100 V) durante al menos 120 minutos. Posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Science, Amsterdam) durante 60 minutos a voltaje constante (100 V). La unión no específica se bloqueó con *buffer* de bloqueo para *Western blot* durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 ° C con la dilución de los anticuerpos primarios. Posteriormente fueron lavados con TBS 1X-T20 e incubados con las diluciones de los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas específicas fueron reveladas mediante la utilización del equipo Odyssey CLx (LI-COR,) y se cuantificaron por análisis densitométrico usando el software ImageStudio (LI-COR).

#### Inhibición de unión de ligandos a LRP1 con GST-RAP

Para inhibir la interacción de ligandos con LRP1, células HL-1 cultivadas en medio de cultivo celular, fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con GST-RAP 400 nM en medio de incubación durante 30 minutos previo al ensayo. Paso siguiente se lavaron nuevamente con PBS 1X y se sometieron a las correspondientes incubaciones con GST-RAP 400 nM junto con las agLDL en medio de incubación.

#### Aislamiento y modificación de LDL

Se aisló LDL total mediante ultracentrifugaciones secuenciales utilizando gradientes de KBr, en el rango de densidad de 1.019-1.063 g / ml, de 6 grupos diferentes de plasma de voluntarios normocolesterolémicos. Para la cuantificación de proteínas se usó un kit Pierce (23225). La integridad de la ApoB se evaluó mediante SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10%. La agregación de LDL (agLDL) se generó mediante agitación mecánica con vórtex de las LDL en PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos para precipitar el agLDL. Finalmente, las lipoproteínas agregadas se resuspendieron en PBS 1X a una concentración de proteína de 1 mg / ml. La ultraestructura de la agLDL obtenida mediante agitación mecánica fue similar a la de LDL modificada por versican, uno de los principales proteoglicanos

de sulfato de condroitina que estructuran la íntima arterial (Llorente-Cortes y col., 2002).

### Caracterización de las lipoproteínas

La caracterización de las lipoproteínas se llevó a cabo mediante su cuantificación y análisis de la movilidad electroforética. Para la cuantificación de las lipoproteínas se realizó la determinación de la concentración proteica mediante la utilización de ácido bicinonínico (BCA), para ello las muestras diluidas se incubaron 30 minutos a 60 °C para romper la estructura lipoproteica, luego se midió la absorbancia a 562 nm. Por otro lado, la caracterización de la movilidad electroforética se realizó utilizando un gel de agarosa del 0.8% en un *buffer* Tris-glicina 1X pH=8,3 y una tinción con azul de Coomassie que permite identificar las diferentes fracciones lipoproteicas.

### Tinción con Oil Red O

El Oil Red O es un colorante que se usa para la detección de lípidos neutros. Las células HL-1 se expusieron a agLDL (100 µg / ml) durante diferentes tiempos de incubación. Después, se lavaron exhaustivamente con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados con isopropanol al 65% y a continuación se incubaron con una solución de Oil Red O (0,7g en 200 ml de isopropanol) durante 30 minutos. Se removió la solución del colorante y se lavó inmediatamente con isopropanol al 65% y luego con agua destilada. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia a 562 nm utilizando el microscopio Leica DMI8.

### Tinción de LDL con Dil

Dil (1,1\_-dioctadecil-3,3,3\_,3\_tetrametilindocarbocianina) es una dialquilcarbocianina de cadena larga lipófila que se une a las lipoproteínas y emite fluorescencia a 565 nm. Las LDL (1 mg / ml) se incubaron durante 12 horas con Dil (0.1 mM stock) en una concentración de 3 µL por cada 1 mg de lipoproteína en 500 µL de PBS 1X a 37 ° C y luego se dializaron exhaustivamente en PBS 1X durante 24 horas para eliminar el exceso Dil libre utilizando una membrana con un

filtro de 0,22 µm. Finalmente, estas LDL teñidas se agregaron mecánicamente mediante agitación mecánica como se describió anteriormente.

#### Extracción de lípidos y determinación del contenido de ésteres de colesterol, triglicéridos y colesterol libre

Las células HL-1 se expusieron a nLDL o agLDL (100 µg / ml). Después, se lavaron exhaustivamente y se lisaron en NaOH 0,1 M. Se extrajeron los lípidos y se analizó el contenido de CE, CL y TG mediante cromatografía de capa delgada. El disolvente orgánico (diclorometano/metanol [1:2]) se eliminó mediante corriente de N<sub>2</sub>, el extracto lipídico se redisolvió en diclorometano y se evaluó mediante cromatografía en capa delgada (TLC) en placas de sílice G-24. Las diferentes concentraciones de estándares (una mezcla de colesterol, colesterol palmitato y triglicéridos) se aplicaron a cada placa. La solución eluyente fue heptano / dietiléter / ácido acético (74: 21: 4, v / v / v). El revelado se realizó con una solución 5% de ácido fosfomolibdico/ 5% ácido sulfúrico en etanol y calentando 7 minutos a 100 °C. Las marcas correspondientes a ésteres de colesterol, triglicéridos y colesterol libre se cuantificaron por densitometría frente a la curva estándar utilizando un densitómetro.

Esta técnica fue realizada en colaboración con la Dra. Vicenta Llorente-Cortes (ICCC-CSIC, Barcelona, España).

#### Biotinilación de proteínas de superficie

Después de finalizados los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X frío sobre hielo para detener la reacción y se incubaron durante 2 horas a 4°C con una solución de biotina (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin [cat: 21331], Thermo Scientific) de 0,12 mg / ml en PBS 1X pH 8. Posteriormente se realizó un lavado con una solución de glicina 0,1 mM durante 30 minutos y lavado con PBS 1X tres veces para eliminar el exceso de biotina. A continuación, el LRP1 biotinilado se aisló utilizando *beads* de agarosa conjugadas con estreptavidina (Pierce™ Streptavidin Agarose [cat: 20353], Thermo Scientific), la incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente, y las proteínas se evaluaron mediante Western blot. Como control de carga proteica para la fracción de proteínas

biotiniladas se utilizó la detección de  $\beta$ -actina, ya que ha sido demostrado que se encuentra expresada a nivel de la membrana plasmática (DeNofrio, Hooek y Hetman, 1989) o la de la ATPasa ATP1A1.

#### Inmunoprecipitación de proteínas

Después de finalizados los diferentes tratamientos se obtuvieron los extractos de proteínas celulares usando *buffer* de lisis RIPA. Estos extractos proteicos se incubaron durante 2 horas a 4 °C con el anticuerpo anti-IR (rabbit), o anti-LRP1 (rabbit), o la IgG no inmune rabbit como control de IP (2  $\mu$ g / 200  $\mu$ g de proteínas totales). Luego, se incubaron durante la noche a 4 °C con *beads* de agarosa conjugadas con proteína A siguiendo el procedimiento del fabricante (sc-2001; Santa Cruz Biotechnology, CA), finalmente las proteínas se separaron e identificaron mediante Western blot.

#### Detección de proteínas de superficie celular en células enteras usando anticuerpos conjugados a fluorocromos (*In cell Western blot*)

Las células se cultivaron como se mencionó anteriormente en placas de 96 posillos (15000 células / ml). Después de ayunarlas durante 30 minutos, las células se trataron con distintos estímulos durante diferentes tiempos, se lavaron con PBS 1X frío, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (v / v), posteriormente se lavaron con glicina 0,1 mM y se bloquearon con 5% (v / v) suero de caballo durante 30 minutos en hielo. Luego se realizó la incubación con los anticuerpo primarios durante 1 hora en hielo, seguido de tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X frío antes de volver a incubar con los anticuerpos secundarios IgG IRDye® (LI-COR) (1 / 10000) durante 1 hora en hielo. Después de tres lavados con PBS 1X frío, la fluorescencia resultante se midió usando el sistema de escaneo de imagen de fluorescencia Odyssey CLx y se cuantificó mediante análisis densitométrico usando el software ImageStudio. Para algunos ensayos, las células se preincubaron durante 30 minutos con wortmanina 40  $\mu$ M o LY-294002. También se llevaron a cabo experimentos similares con células MIO-M1 transfectadas con plásmido mLRP4-GFP-HA y utilizando un anticuerpo primario anti-HA (rabbit) (1/1000).

### Ensayo de viabilidad celular

Las células se cultivaron como se indicó anteriormente en placas de 96 posillos y se trataron con o sin nLDL o agLDL (100 µg / ml). La viabilidad celular se evaluó usando el colorante metabólico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT). Brevemente, se añadió solución de MTT (5 mg / ml) al medio de cultivo (1:10) y se incubó durante 2-3 horas a 37 ° C. Después de la incubación, el medio se eliminó y el colorante precipitado se disolvió en 100 µl de DMSO. La absorbancia se leyó a 540 nm, y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con el control.

### Real Time-PCR

Los células se expusieron a los diferentes estímulos y luego se trataron con el reactivo TRIzol® (Invitrogen) para la extracción de ARN total. Un µg de ARN total se transcribió de forma inversa en un volumen total de 20 µl usando *hexaprimers* al azar y transcriptasa inversa. Los *primers* de PCR que figuran más abajo se emplearon para cuantificar los transcritos de LRP1, y β-actina. Los resultados se normalizaron a productos de RT-PCR de transcritos de β-actina. Las transcripciones se cuantificaron mediante qRT-PCR en tiempo real (ABI 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) utilizando el software Sequence Detection v1.4. Las condiciones de amplificación incluyeron un arranque en caliente a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. La especificidad se verificó por análisis de curva de fusión y electroforesis en gel de agarosa al 2% con detección por fluorescencia con SYBR® Safe DNA (Invitrogen). La expresión génica relativa se calculó de acuerdo con el método 2-Ct. Cada muestra se analizó por triplicado. No se observó amplificación en las PCR utilizando agua o muestras de ARN incubadas sin transcriptasa inversa durante la síntesis de ADNc.

Secuencias de *primers* de ratón y humano:

Humano

*lrp1 forward* 5'- AGTGCTGCCCAGACACAGCTCAAGTGTG-3'

*Irp1 reverse* 5'-CACAACTCTTGCTGTGCGACGAGCTTGGTG-3'

*β- actina forward* 5'-AAATCTGGCACCCACACCTTC-3'

*β- actina reverse* 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA-3'

Ratón

*Irp1 forward* 5'-TGGAGCAGATGGCAATCGACT-3'

*Irp1 reverse* 5'-CGAGTTGGTGGCGTAGAGATAGTT-3'

*β- actina forward* 5'-AAATCTGGCACCCACACCTTC-3'

*β- actina reverse* 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAA-3'

### Ensayo de captación de 2-NBDG

Las células HL-1 se trataron con o sin agLDL (100 µg / ml) durante 8 horas y luego se estimularon o no con insulina 100 nM durante 30 minutos junto con un 2-NBDG 80 Mµ. 2-NBDG es un análogo de glucosa fluorescente que no se metaboliza y muestra una emisión máxima de 540 nm. Después del estímulo, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con PFA al 4%, se incubaron con solución de *quenching* 20 minutos, se permeabilizaron durante 30 minutos con saponina al 0,5% (v / v), se bloquearon con BSA al 2% y se incubaron con colorante Hoechst 33258 (1 / 2000) durante 1 hora. Finalmente, las células se montaron con Mowiol 4-88. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron con un microscopio biológico de exploración láser confocal Olympus FluoView FV1200 (Olympus, Nueva York, NY).

### Tratamiento estadístico de datos

En el caso de resultados derivados de dos condiciones experimentales, la comparación estadística de las medias se llevó a cabo mediante la prueba *t-Student* para muestras independientes, mientras que en situaciones donde las condiciones experimentales fueron más de dos, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Para las cuantificaciones de

colocalización de microscopia confocal se utilizó un *plugin JAPoC* (Bolte y Cordelieres, 2006) del software ImageJ. Se analizaron al menos 20 células / condición, y los promedios de los porcentajes de vesículas que contenían ambas proteínas se calcularon usando los coeficientes de Manders y se compararon mediante la prueba de la *t-Student*. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Para Western blot e *in cell Western blot*, los datos se expresaron como media  $\pm$  SEM, y se usó el test ANOVA de una vía y el test *t-Student* para el análisis estadístico. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. El análisis estadístico fue realizado mediante la utilización del software GraphPad Prism 5.0.

# **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

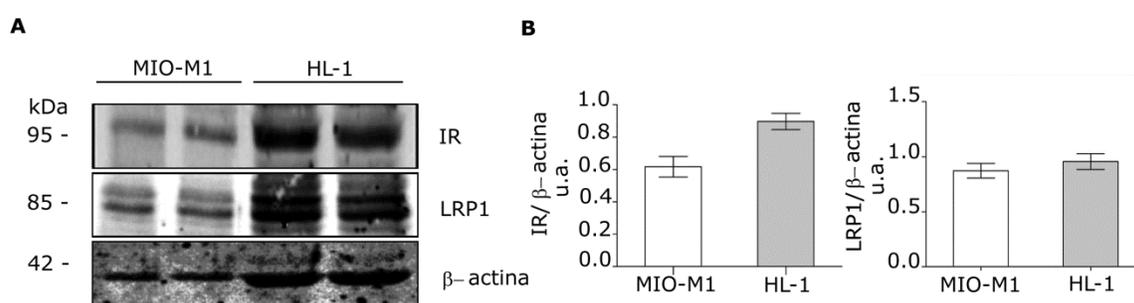
### 4.1 Caracterización del tráfico intracelular de LRP1 por acción de insulina.

#### 4.1.1 Expresión de LRP1 e IR en la línea de células gliales de Müller MIO-M1.

Para responder el objetivo específico 1 del presente trabajo de tesis se utilizó la línea de células gliales de Müller humanas espontáneamente inmortalizadas, denominadas MIO-M1, ya que en estas células se demostró la participación de LRP1 en diferentes funciones de este sistema celular en la retina, tales como la motilidad y activación celular implicada en diversos procesos fisiológicos y patológicos (Barcelona y col., 2010; Barcelona y col., 2011; Lorenc y col., 2015; Lorenc y col., 2018). Además, estas células son adecuadas para estudios de biología celular, puesto que son fácilmente transfectables, lo que era importante para la utilización de diferentes herramientas moleculares necesarias para la caracterización de estructuras vesiculares y proteínas de transporte vesicular de interés, como así también porque tiene una relación citoplasma/núcleo óptima para estudiar la distribución subcelular de LRP1 y otras proteínas a través de diferentes principios de microscopia.

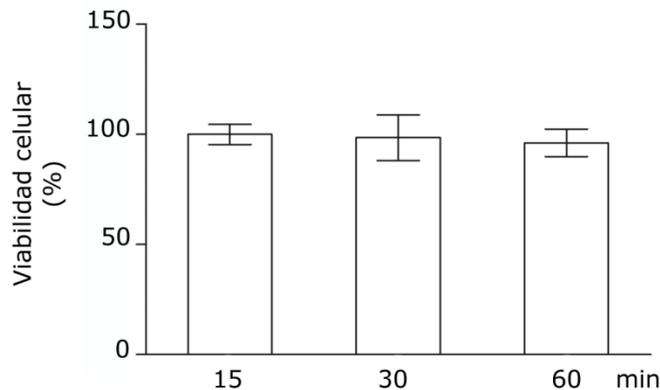
En primera instancia, mediante ensayos de *Western blot*, se procedió a evaluar el nivel de expresión de IR y LRP1 en células MIO-M1. En la Figura 9A, se muestra que estas células expresan ambos receptores de manera constitutiva, evidenciado por la detección de una banda proteica de 95 kDa para IR y del doblete proteico de 90-85 kDa para la subunidad- $\beta$  de LRP1. También se muestra un análisis comparativo de la expresión de ambos receptores en células MIO-M1 con la línea celular de cardiomiocitos HL-1, las cuales también fueron utilizadas en el presente trabajo de tesis para estudiar aspectos funcionales de LRP1 sobre la respuesta a la insulina. En la Figura 9B, se puede observar que el IR está expresado aproximadamente en un 30% más en células HL-1 que en células MIO-M1, mientras que la cantidad de LRP1 es similar en ambas líneas celulares, en

relación a la expresión proteica de actina. Esto podría tener implicancias funcionales en relación a la respuesta de insulina así como en la capacidad de regular la homeostasis de la glucosa extracelular, aspectos que serán analizados y discutidos más adelante en el transcurso del presente trabajo de tesis. Teniendo en cuenta la expresión constitutiva de IR y LRP1, sumado a la ventaja de su naturaleza no tumoral y a su capacidad para conservar en cultivo *in vitro* los aspectos distintivos del tejido al que pertenecen, hizo que las células MIO-M1 fueran un modelo experimental propicio para el estudio del efecto de insulina sobre el tráfico intracelular de LRP1.



**Figura 9. Análisis de la expresión de IR y LRP1 en células MIO-M1 y HL-1.** **A)** Ensayo de *Western blot* para la inmunodetección de la subunidades  $\beta$  de IR (95 kDa) y LRP1 (90-85kDa) en lisados celulares de MIO-M1 y HL-1. Como control de carga proteica se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión relativa de IR y LRP1 respecto a  $\beta$ -actina. Las barras expresan la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) de las bandas proteicas de IR $\beta$  y LRP1 $\beta$  (85 y 90 kDa) relativas a la banda de  $\beta$ -actina para los dos tipos celulares analizados. Los valores relativos densitométricos fueron realizados por duplicado en análisis de *Western blot* (WB) correspondientes a tres experimentos independientes.

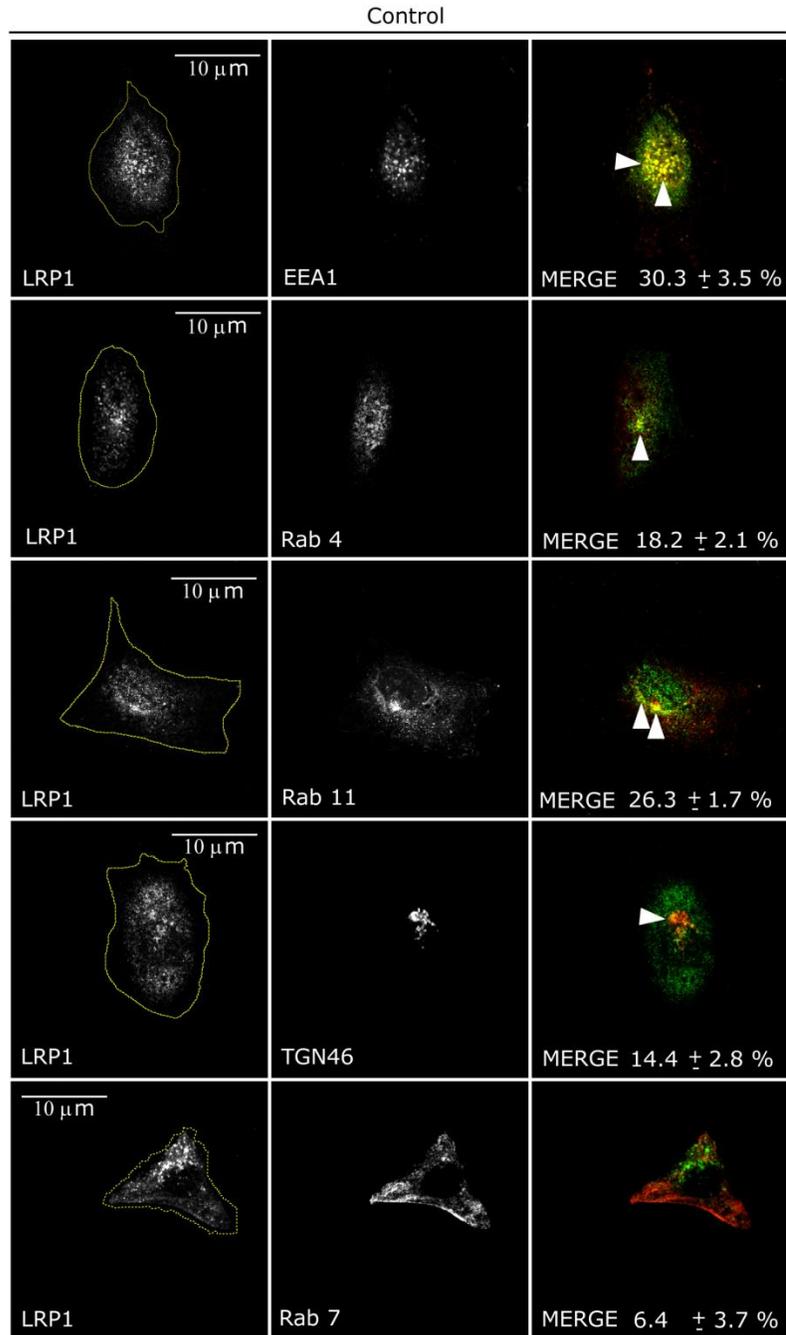
Finalmente se procedió a corroborar que el tratamiento con insulina no afectara la viabilidad de las células durante los tiempos empleados. Para ello, las células MIO-M1 fueron tratadas con insulina 100 nM y luego se realizó un ensayo con MTT. En la Figura 10, se muestra que el tratamiento con insulina no afectó de manera significativa la viabilidad celular.



**Figura 10. Ensayo de viabilidad celular.** La gráfica de barras representa la Media  $\pm$  SEM de los porcentajes de viabilidad celular. Las células MIO-M1 fueron estimuladas con insulina 100 nM durante 15, 30 y 60 minutos. La viabilidad celular se evaluó usando el colorante metabólico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT) (5 mg / ml) agregado al medio de cultivo (1:10) durante 2-3 horas a 37 °C. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

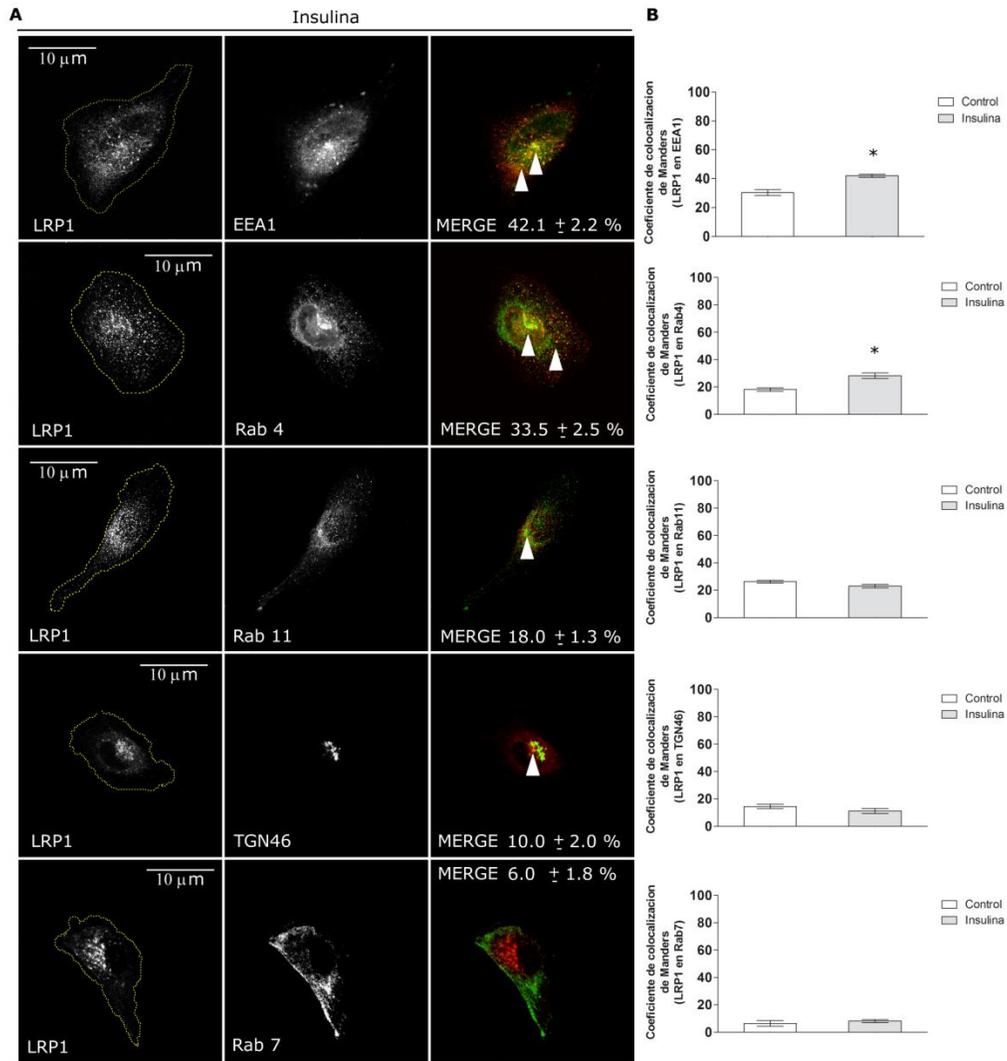
#### 4.1.2 Distribución subcelular del LRP1 en células MIO-M1.

LRP1 es un receptor que presenta un patrón de distribución intracelular en estructuras vesiculares de localización perinuclear, que se reproduce prácticamente en todos los sistemas celulares donde se expresa (Herz y col., 1990). No obstante, hasta el momento sólo se han realizado estudios parciales sobre la distribución de LRP1 en diferentes compartimentos subcelulares (Dr. Jaldín Fincati R. Tesis de Doctorado FCQ-UNC. 2014). Por otro lado, tampoco se conoce cómo la distribución subcelular de LRP1 puede ser modificada ante diferentes estímulos. Por este motivo, se decidió caracterizar la localización subcelular de LRP1 en células MIO-M1 en ausencia y presencia de insulina. Para ello se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta analizados por microscopia confocal para evaluar la colocalización de LRP1 con marcadores moleculares de los diferentes compartimentos subcelulares, entre ellos endosomas tempranos [EEA1+], compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4+] y lento [Rab11+], y compartimento del *trans*-Golgi [TGN46+]. La Figura 11 y 12 B, muestran que en ausencia de insulina LRP1 se encuentra distribuido en  $\approx 30$  % en endosomas tempranos, en  $\approx 18$  % en compartimentos de reciclado endocítico rápido, en  $\approx 26$  % en compartimentos de reciclado endocítico lento, en  $\approx 14$  % en compartimentos *trans*-Golgi y en endosomas tardíos en  $\approx 6$  %.



**Figura 11. Análisis de colocalización de LRP1 con diferentes marcadores de compartimentos intracelulares en células MIO-M1.** Inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal en células en condiciones basales para el análisis de colocalización entre LRP1 (verde) y: endosomas tempranos [EEA1+], compartimentos de reciclado rápido [Rab4+], compartimentos de reciclado lento [Rab11+], compartimentos de *trans*-Golgi [TGN46+] y endosomas tardíos [Rab7+] (todos en rojo). La tercer columna (MERGE) muestra las regiones de colocalización entre las marcas indicadas con las flechas de puntas blanca y su respectivo análisis cuantitativo informado como la Media ± DE de los coeficientes de colocalización de Manders. La línea de puntos amarilla enmarca el contorno celular. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 μm.

Por otra parte, luego del estímulo con insulina 100 nM durante 30 minutos se encontró un aumento significativo de la colocalización entre LRP1 y EEA1 en un  $\approx 42$  %, lo que sería indicativo de que el estímulo con insulina favorece la endocitosis de este receptor. También se observó un incremento significativo en la colocalización de LRP1 y Rab4 en un  $\approx 33$  %, lo que indicaría que insulina aumenta también el reciclado endocítico de este receptor a través del *loop* corto o reciclado rápido hacia la membrana plasmática. Por el contrario, no se encontraron cambios significativos en los niveles de colocalización de LRP1 con Rab11, Rab7 ni con TGN46 luego del estímulo con insulina como se observa en la Figura 12, lo cual sugiere que este estímulo no promovería el reciclado endocítico por *loop* largo o reciclado lento, ni su procesamiento a nivel del Golgi, así como tampoco induciría a que LRP1 ingrese a una vía de degradación dependiente de endosomas tardíos.

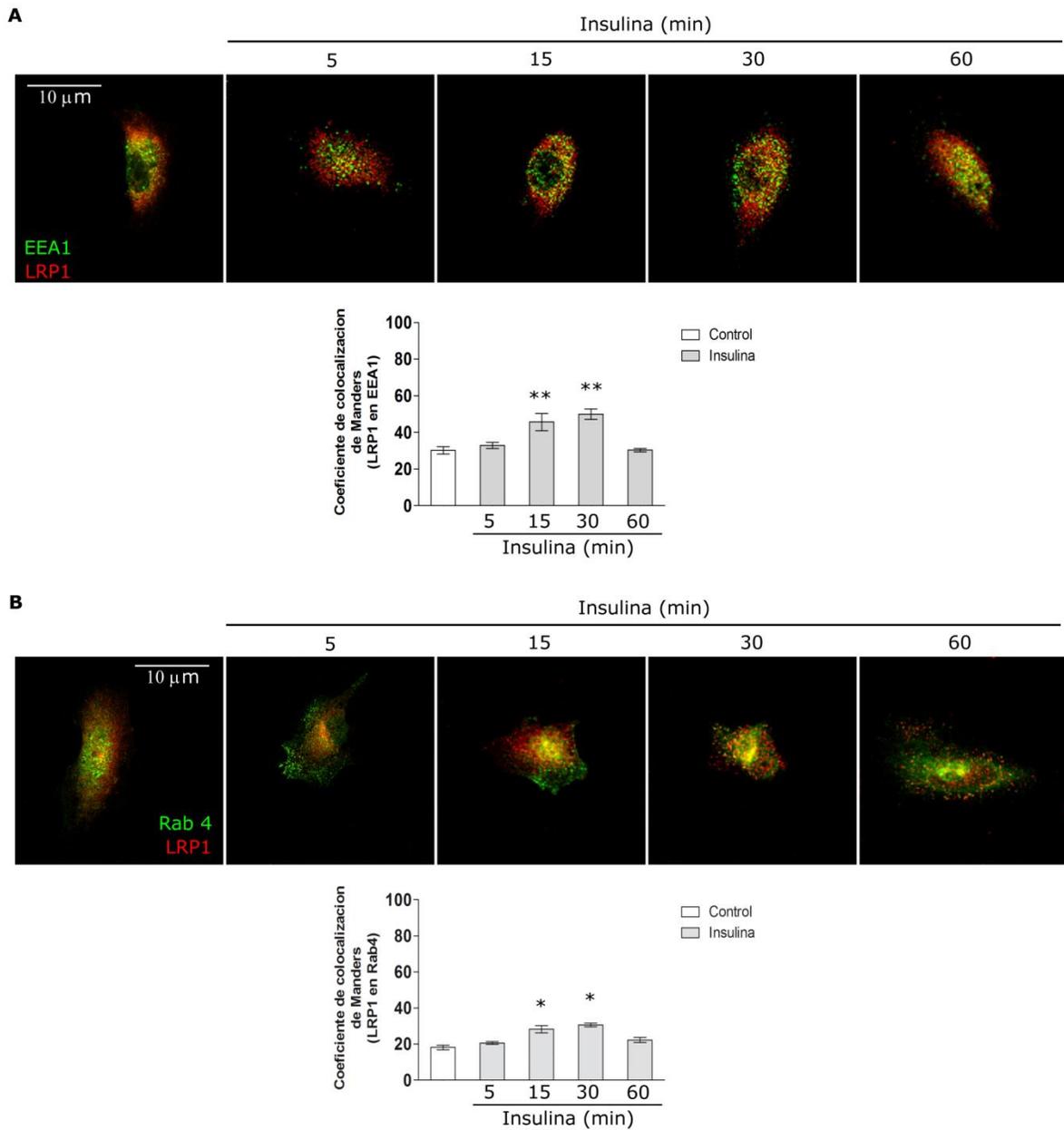


**Figura 12. Análisis de colocación de LRP1 con diferentes marcadores de compartimentos intracelulares en células MIO-M1 estimuladas con insulina. A)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal en células estimuladas con insulina 100 nM durante 30 minutos para el análisis de colocación entre LRP1 (verde) y: endosomas tempranos [EEA1+], compartimentos de reciclado corto [Rab4+], compartimentos de reciclado largo [Rab11+], compartimentos de *trans*-Golgi [TGN46+] y endosomas tardíos [Rab7+] (todos en rojo). El MERGE muestra las regiones de colocación entre las marcas indicadas con las flechas de puntas blanca y su respectivo análisis cuantitativo informado como la Media  $\pm$  DE de los coeficientes de colocación de Manders. La línea de puntos amarilla enmarca el contorno celular. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **B)** Análisis comparativo de la colocación de LRP1 y marcadores de compartimentos intracelulares en condiciones basal y con insulina. Las gráficas de barras representan la Media  $\pm$  SEM de los coeficientes de colocación de Manders en ausencia y presencia de insulina, obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t*-Student para muestras independientes, considerando las condiciones de ausencia (Figura 11) y en presencia de insulina (Figura 12). (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Debido al incremento de colocalización observado entre LRP1 y marcadores de endosomas tempranos [EEA1+] y compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4+] luego del estímulo con insulina, resultó de interés caracterizar la cinética de dicha colocalización. Para ello se llevaron a cabo ensayos de estímulo con insulina en células MIO-M1 durante diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos) seguidos de inmunofluorescencia indirecta para el análisis de LRP1, EEA1 y Rab 4.

En la Figura 13, se muestra que la proporción de endosomas tempranos y compartimentos de reciclado endocítico rápido que contenían LRP1 incrementó en forma progresiva en función del tiempo de estímulo con insulina, encontrándose el máximo nivel de colocalización de LRP1/EEA1 y de LRP1/Rab4 entre los 15-30 minutos de estímulo con insulina.

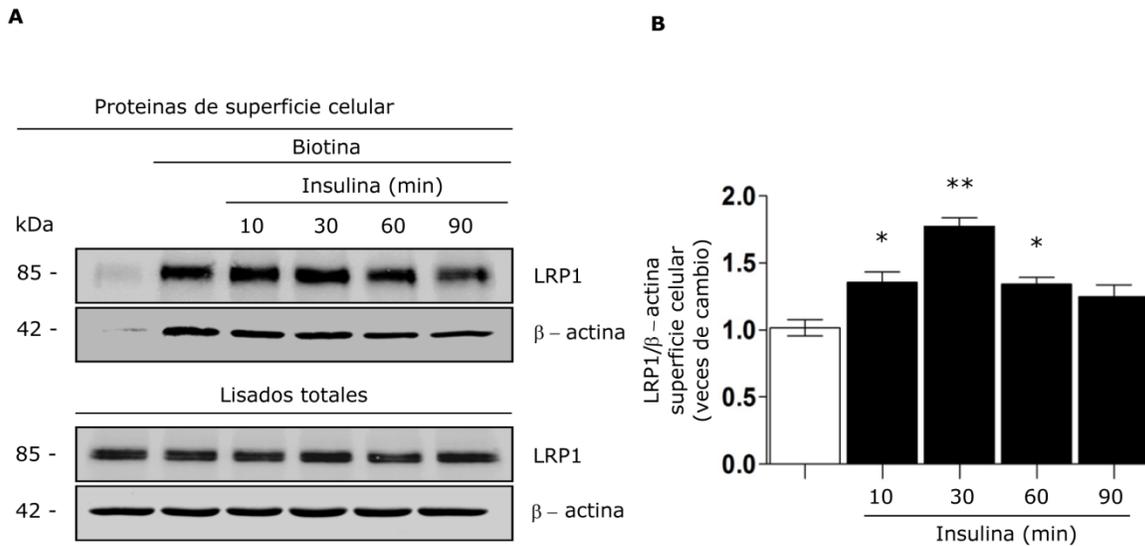
Estos resultados serían indicativos que el estímulo con insulina, induciría la endocitosis de LRP1, conjuntamente con un incremento en el reciclado endocítico rápido mediado por Rab4 hacia membrana plasmática, lo que estaría relacionado con la necesidad de mantener los niveles de LRP1 en la superficie celular en células MIO-M1 estimuladas con insulina.



**Figura 13. Análisis de colocolización de LRP1 con EEA1 y Rab4 en función del tiempo de estímulo con insulina.** Ensayo de estímulo continuo con insulina en células MIO-M1, seguido de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. La figura muestra la distribución subcelular de LRP1 (rojo) y de EEA1 (verde) **(A)**, y LRP1 (rojo) y Rab4 (verde) **(B)** en función del tiempo de estímulo con insulina 100 nM a los tiempos indicados. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. Las gráficas de barras representan la Media  $\pm$  SEM de los coeficientes de colocolización de Manders (proporci3n de vesículas que contenían LRP1 y eran EEA1 positivas **(A)** o Rab4 positivas **(B)** en función del tiempo de estímulo con insulina). La comparaci3n estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

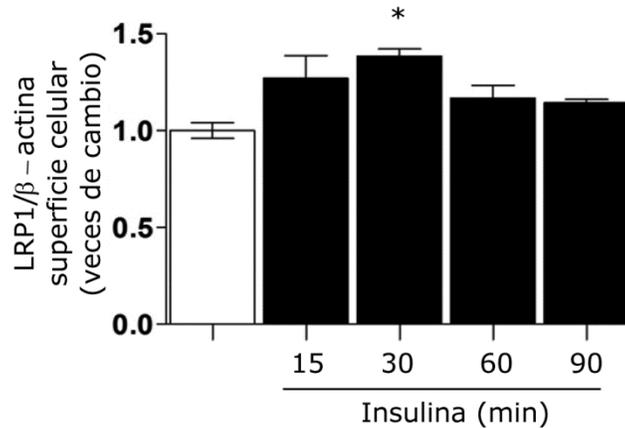
### **4.1.3 Distribución del LRP1 en membrana plasmática de células MIO-M1.**

Como fue mencionado en la introducción del presente trabajo de tesis, la mayor proporción de LRP1 se encuentra a nivel intracelular, mientras que ~10-20% del total se distribuye a nivel de la membrana plasmática en la mayoría de los tipos celulares estudiados (Moestrup y col., 1990; Ferrer y col., 2014; Barcelona y col., 2013). Sin embargo, ha sido demostrado que estímulos con insulina, incrementan los niveles de expresión de LRP1 en la membrana plasmática de adipocitos y hepatocitos, aunque los mecanismos moleculares y celulares que median dicho incremento aún se desconocen (Descamps y col., 1993; Ko y col., 2001; Laatsch y col., 2009). Debido a que por microscopia confocal no se pudo apreciar la localización de LRP1 en la superficie celular, quizás por la baja expresión de este receptor en la superficie de la célula, se procedió a evaluar la acción de insulina sobre los niveles de LRP1 en la membrana plasmática mediante técnicas bioquímicas con mayor poder de detección. Para esto se realizó un ensayo de biotilación de proteínas de superficie celular, seguida de la precipitación del complejo proteína/biotina por medio del uso de perlas o *beads* conjugados con estreptavidina y posterior ensayo de *Western blot* para el análisis de LRP1 y otras proteínas de membrana de superficie celular usadas como controles, siguiendo lo especificado en el capítulo Materiales y Métodos. De este modo, se determinaron los niveles de LRP1 en la superficie celular de células MIO-M1 en presencia de insulina durante 10, 30, 60 y 90 minutos de estímulo. Se observó un incremento significativo de los niveles de LRP1 en la membrana plasmática, a los tiempos de 10, 30 y 60 minutos de estímulo con insulina como se muestra en la Figura 14. Estos resultados coinciden con lo previamente demostrado en adipocitos y hepatocitos (Descamps y col., 1993; Ko y col., 2001; Laatsch y col., 2009).



**Figura 14. Análisis de los niveles de expresión de LRP1 en membrana plasmática de células MIO-M1 estimulas con insulina. A)** Ensayo de biotilación de proteínas de superficie celular y Western blot para LRP1 biotilado precipitado mediante la incubación con *beads*-estreptavidina a partir de extractos proteicos de células estimuladas con insulina 100 nM a los tiempos indicados. En la primera calle, se muestra el control negativo de precipitación utilizando extractos proteicos de células no biotiladas. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1 en los lisados totales donde se ofreció el 20% de la carga proteica destinada a la incubación con *beads*. En ambas condiciones se utilizó  $\beta$ -actina (biotilada y total) como control de carga proteica. Para más detalles ver Materiales y métodos. **B)** El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a  $\beta$ -actina) de las bandas correspondientes a LRP1 de membrana plasmática para los diferentes tiempos de estímulo con insulina, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). Tres experimentos independientes fueron realizados en triplicado. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de *in cell Western blot* para la detección de proteínas de superficie en células MIO-M1 sin permeabilizar como se muestra en la Figura 15. Para ello, las células fueron estimuladas con insulina 100 nM por diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos), seguido de la inmunodetección de LRP1 expresado a nivel de la membrana plasmática en células sin permeabilizar a 4°C. Posteriormente, el inmunocomplejo primario fue revelado a través del uso de un anticuerpo secundario conjugado a 680CW y el análisis de la fluorescencia resultante usando el sistema de escaneo de imagen de fluorescencia Odyssey CLx. A través de este ensayo corroboramos nuestros resultados que demuestran que insulina efectivamente incrementa de manera significativa los niveles de LRP1 en la superficie celular en células MIO-M1, alcanzando su nivel máximo de expresión a los 30 minutos de estímulo.

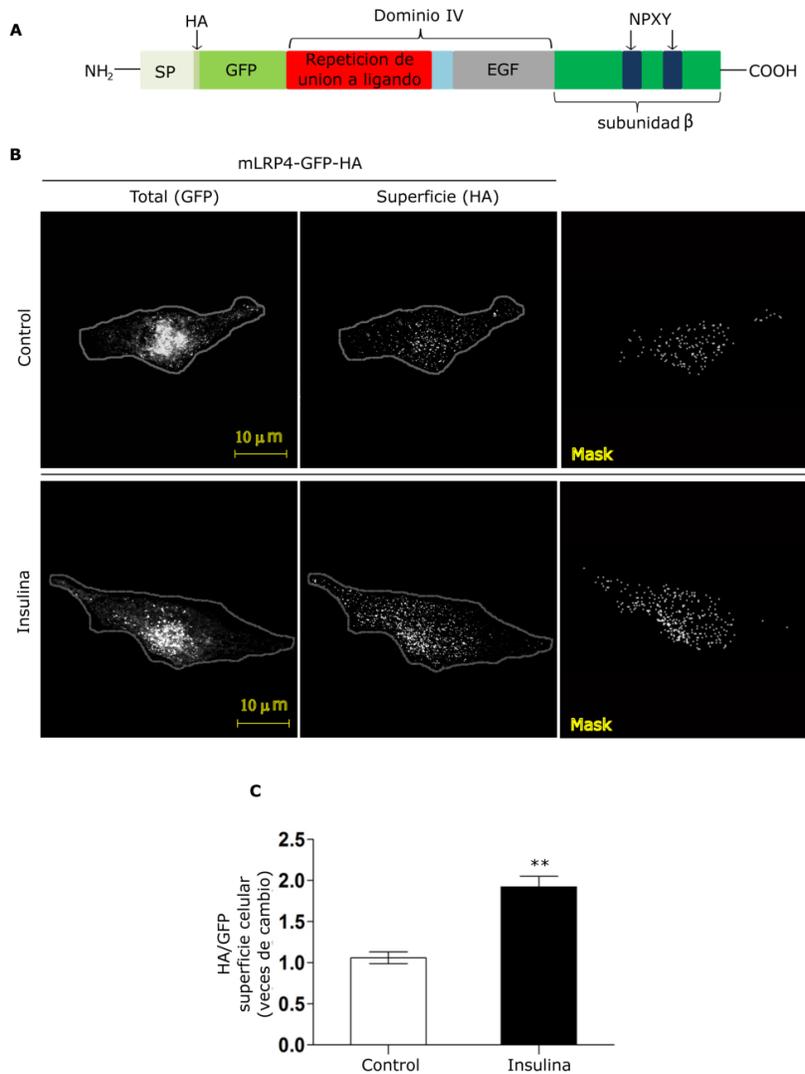


**Figura 15. Análisis de la expresión de LRP1 en la superficie celular en células MIO-M1 estimuladas con insulina.** *In cell Western blot* para el análisis del LRP1 constitutivo en células MIO-M1 sin permeabilizar, estimuladas con insulina 100 nM durante diferentes tiempos. El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la emisión de fluorescencia de detección de LRP1 (anticuerpo secundario conjugado a 680CW) relativas a la detección de  $\beta$ -actina (anticuerpo secundario conjugado a 800CW) y expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los detalles del experimento están indicados en la sección de Materiales y Métodos.

#### 4.1.4 Movilidad de LRP1 hacia la membrana plasmática de células MIO-M1.

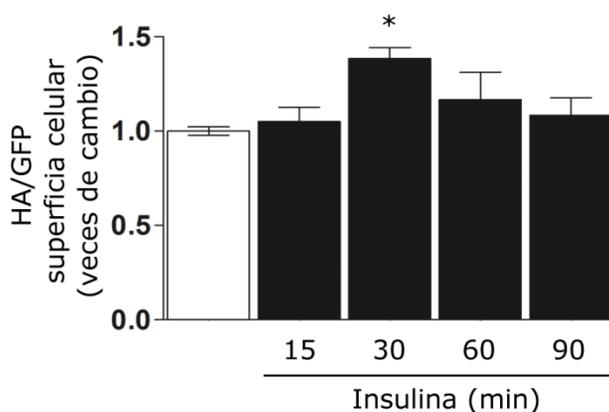
Luego de demostrar que insulina induce el incremento de la expresión de LRP1 en la membrana plasmática de células MIO-M1, se procedió a evaluar si esto se asociaba con un aumento en la movilidad de vesículas intracelulares que almacenan el receptor. Para ello, las células MIO-M1 fueron transientemente transfectadas con un vector de expresión que reproduce una porción de LRP1, denominado mLRP4-GFP-HA. Como se muestra en la Figura 16 A, esta versión reducida de LRP1, codifica para la cadena  $\beta$  completa y el dominio IV de unión a ligandos de la subunidad  $\alpha$  del LRP1, y se encuentra fusionado a GFP y Hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal. Este constructo posee las mismas propiedades endocíticas que el LRP1 de secuencia completa y se expresa en la membrana plasmática y demás compartimentos intracelulares luego de sus síntesis (Obermoeller-McCormick y col., 2001; Fuentealba y col., 2010). En la Figura 16 B, se muestran imágenes representativas de microscopia confocal

donde se observa que el mLRP4-GFP-HA se localizó en vesículas en la región perinuclear, similar al patrón de distribución que se observa para LRP1 constitutivo en este tipo de células. Para evaluar los niveles de mLRP4-GFP-HA en la superficie celular por microscopia confocal, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-HA en células sin permeabilizar luego de una ensayo de estímulo con insulina 100nM durante 30 minutos. En la Figura 16C, se puede observar que insulina incrementó la expresión del tag de HA en membrana plasmática en células MIO-M1 luego de 30 minutos de estímulo en comparación con células no estimuladas.



**Figura 16. Análisis del tráfico intracelular de mLRP4-GFP-HA hacia la membrana plasmática en células MIO-M1 estimuladas con insulina.** **A)** Esquema representativo del vector de expresión que codifica para mLRP4-GFP-HA. SP: péptido señal, HA: *tag* de Hemaglutinina; GFP: green fluorescence protein y NPXY; motivo [Asn, Pro, residuo X y Tyr]. **B)** Microscopía confocal de células transfectadas transientemente con el vector de expresión que codifica para mLRP4-GFP-HA en células estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. La detección de mLRP4-GFP-HA se realizó a través del anticuerpo monoclonal anti-HA incubado en células sin permeabilizar a 4 °C y luego revelado con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa flúor 647. En la primer columna se observa la distribución de GFP (expresión total del mini-receptor) y en la segunda la del *tag* de HA (expresión en superficie del mini-receptor). El Mask representa las imágenes binarias de colocalización entre GFP y el *tag* de HA. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **C)** La gráfica de barra representa la Media  $\pm$  SEM de los niveles de expresión del *tag* de HA del mLRP4-GFP-HA en la superficie celular de células MIO-M1 estimuladas con insulina 100 nM durante 30 minutos con respecto a células sin estimular (barra blanca). La cuantificación se realizó teniendo en cuenta la intensidad de fluorescencia del *tag* de HA normalizado según la intensidad de fluorescencia de GFP, y esto relativo al área celular. Se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron 20 células por experimento. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de *in cell Western blot* en células MIO-M1 transientemente transfectadas con el vector de expresión que codificaba para mLRP4-GFP-HA como se muestra en la Figura 17. Para ello, se realizaron ensayos de estimulación con insulina por diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos), seguidos de la inmunodetección del tag de HA en células sin permeabilizar a 4°C y análisis de la fluorescencia resultante usando el sistema de escaneo de imagen de fluorescencia Odyssey CLx. De esta manera, corroboramos que al igual que con el receptor constitutivo, la insulina sería capaz de incrementar de manera significativa los niveles de mLRP4-GFP-HA en la superficie celular en células MIO-M1 luego de 30 minutos de estímulo.

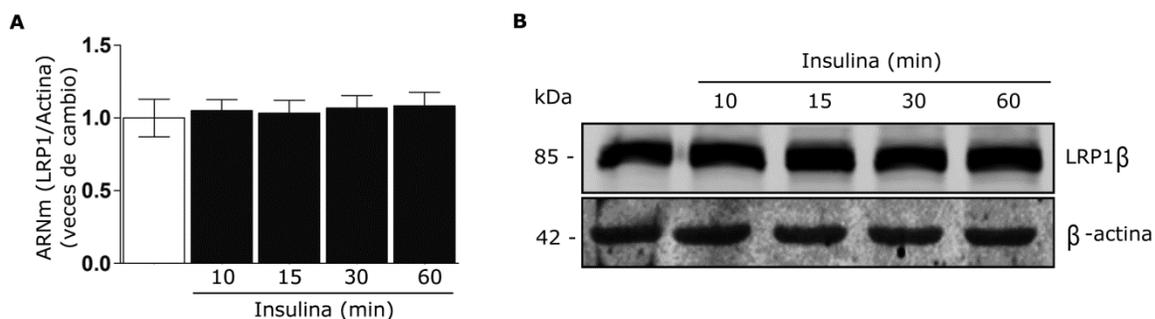


**Figura 17. Análisis de la expresión de mLRP4-GFP-HA en la membrana plasmática de células MIO-M1 estimuladas con insulina.** Inmunodetección de HA en células MIO-M1 transientemente transfectadas con un vector de expresión que codificaba para mLRP4-GFP-HA estimuladas con insulina 100 nM durante diferentes tiempos. La gráfica de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la emisión de fluorescencia de detección de HA (anticuerpo secundario conjugado a 680CW), relativas a la detección de GFP y expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). Tres experimentos independientes fueron realizados en triplicado. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los detalles del experimento están indicados en la sección de Materiales y Métodos.

Estos resultados indicarían que insulina podría inducir el tráfico intracelular de LRP1 desde compartimientos endosomales hacia la membrana plasmática, lo cual se traduce en un aumento de la expresión de LRP1 en la superficie celular en células MIO-M1.

#### 4.1.5 Evaluación de la expresión de LRP1 por acción de insulina en células MIO-M1.

Previamente demostramos que ante el estímulo con insulina se produce un incremento de la localización de LRP1 en endosomas tempranos, lo que podría suponer un aumento de la endocitosis de este receptor. Junto a estos hallazgos, también encontramos un incremento significativo de la localización de LRP1 en compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4+], lo que podría dar idea de que insulina induce un aumento del reciclado de LRP1 hacia la membrana plasmática. No obstante, como finalmente se evidenció un incremento significativo de la expresión de LRP1 a nivel de membrana plasmática luego del estímulo con insulina, procedimos a evaluar si este incremento también involucraba la inducción de la síntesis de este receptor. Para ello, se evaluó la expresión génica de *Lrp1* a través de un ensayo de RT-PCR cuantitativa, así como los niveles proteicos de LRP1 mediante ensayos de *Western blot*, en células MIO-M1 estimuladas con insulina a diferentes tiempos. La Figura 18 muestra que tanto los niveles de ARN mensajero (ARNm) como de proteína de LRP1 no se modificaron luego del estímulo con insulina al menos a los tiempos evaluados.

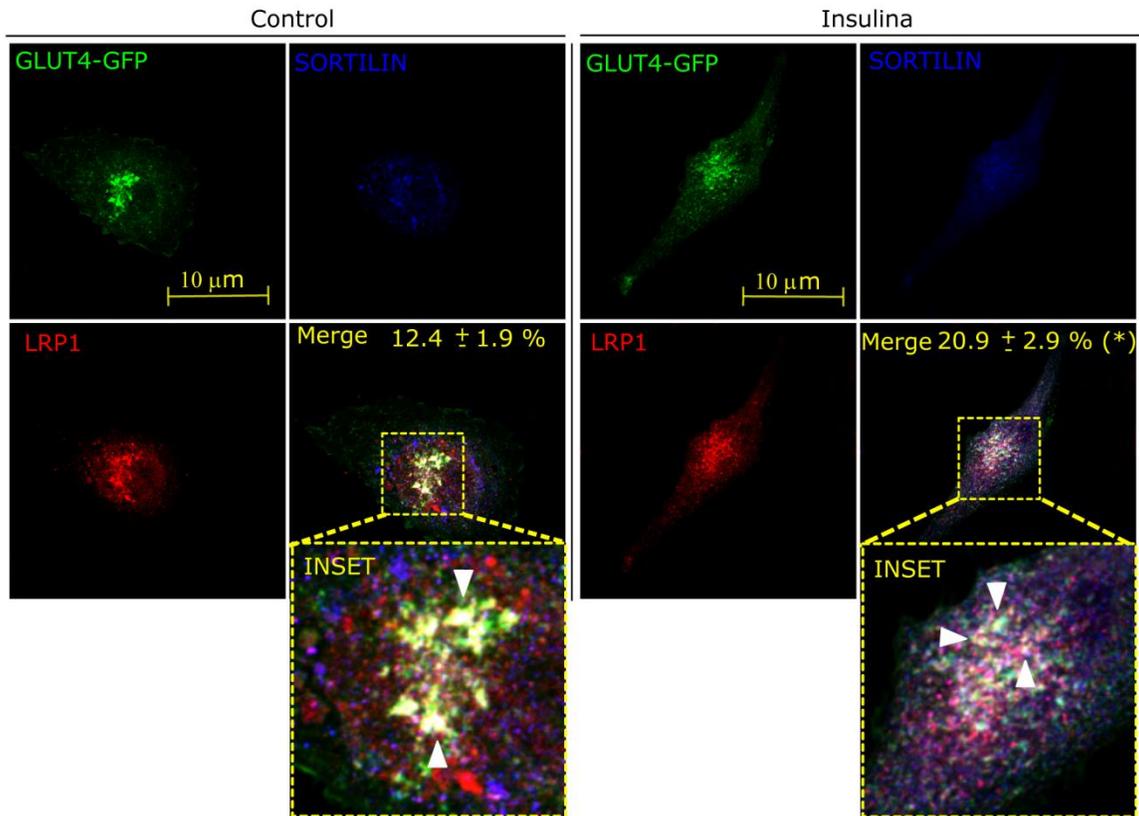


**Figura 18. Análisis del nivel de expresión de LRP1 en células MIO-M1 estimuladas con insulina.** **A)** Ensayo de RT-PCR cuantitativa para LRP1. El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la cuantificación los niveles de ARNm obtenidos por RT-PCR, luego de un ensayo de estímulo continuo con insulina 100 nM durante diferentes tiempos en células MIO-M1. Como control de carga se utilizaron los productos de RT-PCR de transcritos de Actina. **B)** Ensayo de *Western blot* para la inmunodetección de la subunidad  $\beta$  de LRP1 en las líneas celulares MIO-M1 estimuladas con insulina 100 nM a diferentes tiempos. Se utilizó como control de carga proteica la inmunodetección de  $\beta$ -actina. Se realizaron tres experimentos independientes.

Estos resultados sugerirían que el aumento de la expresión de LRP1 a nivel de la superficie celular no sería producto de un aumento en la síntesis de este receptor.

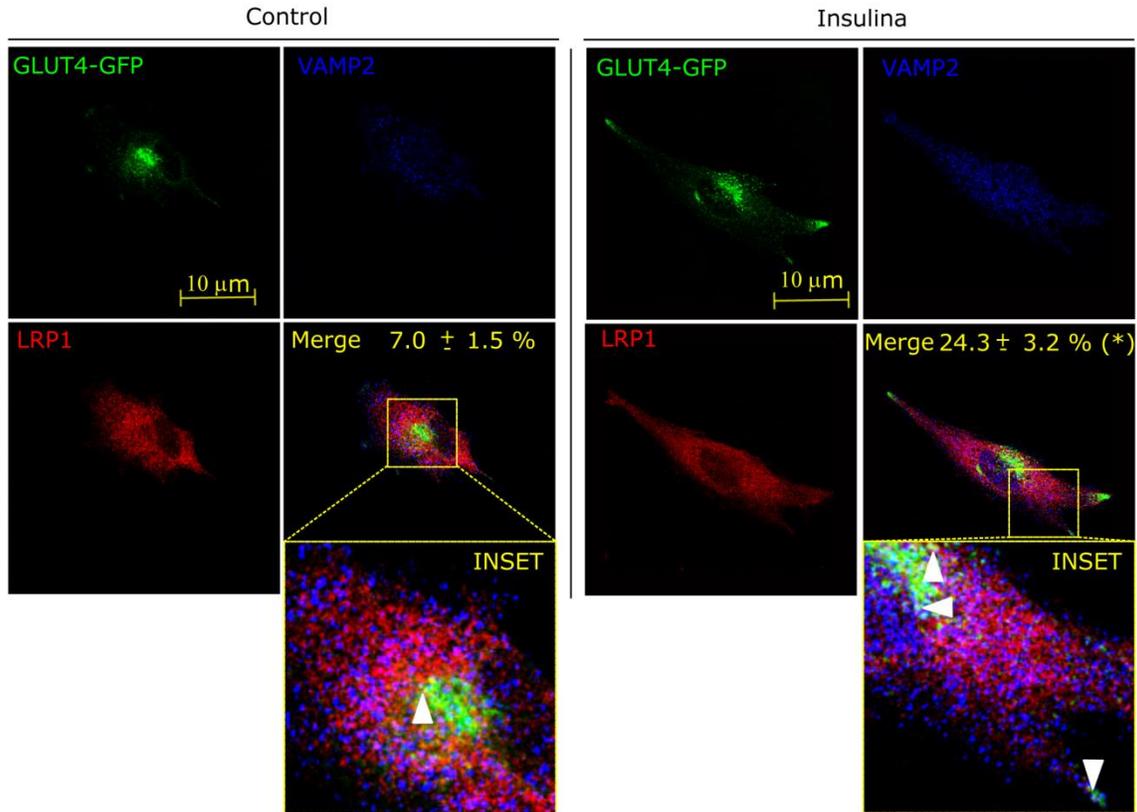
#### **4.1.6 Caracterización de vesículas intracelulares de almacenamiento de LRP1 en células MIO-M1.**

Si bien es posible que LRP1 sea transportado a la superficie celular a través de diferentes rutas, en base a los resultados obtenidos, este receptor se movilizaría a la membrana plasmática desde compartimentos endosomales que almacenan este receptor movilizados por acción de insulina. Una parte de estos reservorios podrían ser los compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4+], donde encontramos que LRP1 incrementa su localización luego del estímulo con insulina, y otra parte podría provenir del aporte generado desde estructuras vesiculares que sean sensibles a insulina. Esto ha sido demostrado en adipocitos y células musculares, donde LRP1 forma parte de vesículas denominadas GSVs (del inglés *GLUT4 storage vesicles*) que también almacenan otras proteínas como sortilin y VAMP2 además de GLUT4, y donde LRP1 es uno de las proteínas constitutivas mayoritarias (Bogan y col., 2010). Ante el estímulo con insulina estas vesículas son rápidamente transportadas hacia la membrana plasmática con la cual se fusionan e incrementan la expresión de GLUT4 para la captación de glucosa extracelular. En este sentido, fue de nuestro interés evaluar si células MIO-M1 poseían este tipo de vesículas o de naturaleza similar, ya que ésta línea celular no expresa GLUT4 (datos propios de nuestro laboratorio no publicados). Para evaluar esta posibilidad se realizaron ensayos de microscopia confocal en células MIO-M1 transfectadas de manera transiente con un vector de expresión que codifica para GLUT4-GFP, utilizado como una proteína característica de estas vesículas GSV, donde se evaluó por inmunofluorescencia la distribución intracelular de LRP1, así como de otras proteínas de GSV como sortilin o VAMP2. Como se observa en la Figura 19, encontramos un porcentaje de estructuras de  $\approx 12\%$  que fueron positivas para GLUT4-GFP, LRP1 y sortilin, y de localización perinuclear. Ante el estímulo con insulina, el porcentaje de colocalización entre estas marcas incremento de manera significativa.



**Figura 19. Análisis de colocalización de LRP1 con sortilin en células MIO-M1 estimuladas con insulina.** Microscopia confocal de células MIO-M1 transfectadas de manera transiente con un vector que codifica para GLUT4-GFP (verde) estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos e inmunomarcadas para la detección de LRP1 (rojo) y sortilin (azul). El Merge representa la colocalización entre las tres marcas y su respectivo análisis cuantitativo está informado como la Media  $\pm$  DE de los coeficientes de colocalización de Manders. El INSET representa la ampliación de la región enmarcada en las líneas de puntos. Las puntas de flecha blancas indican los sectores de triple colocalización. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la distribución de LRP1, GLUT4-GFP y VAMP2, tal como se puede ver en la Figura 20.

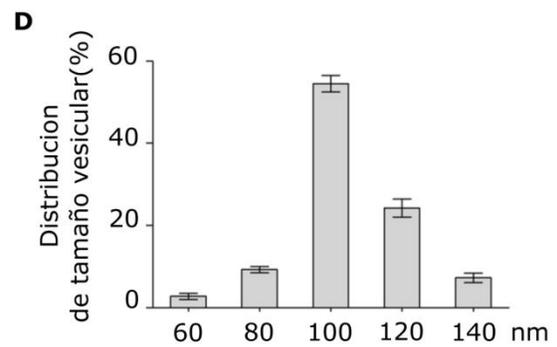
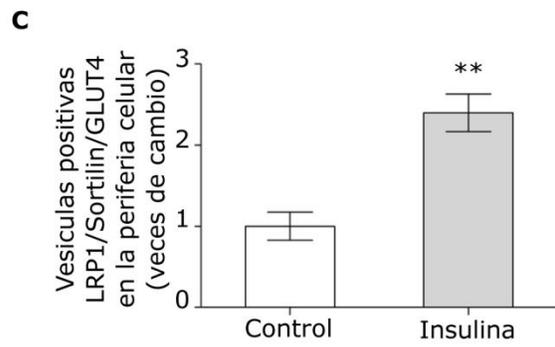
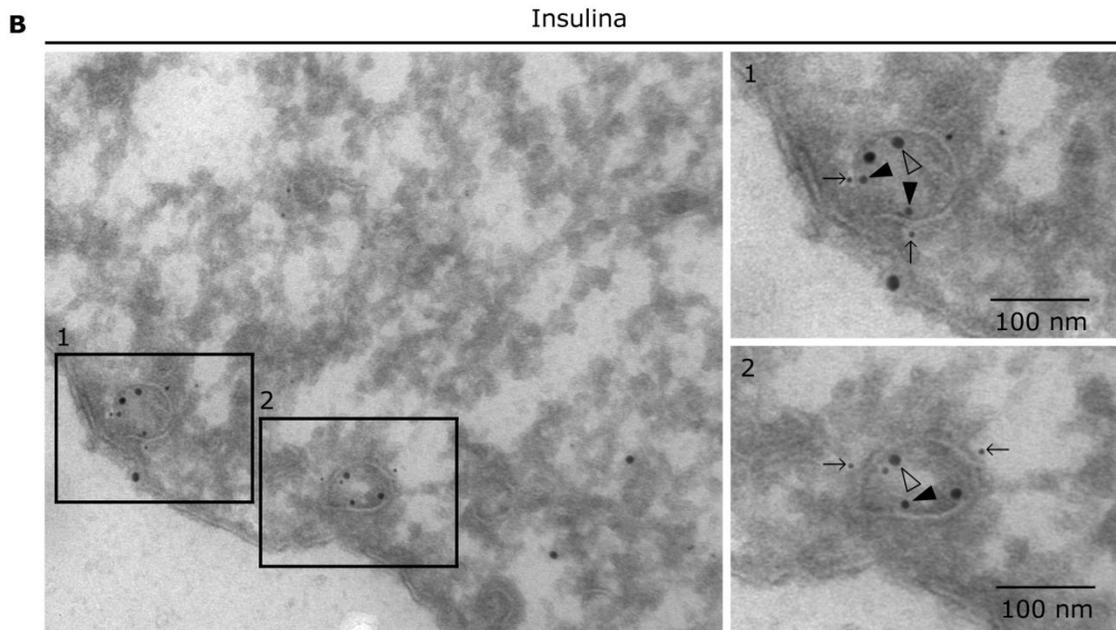
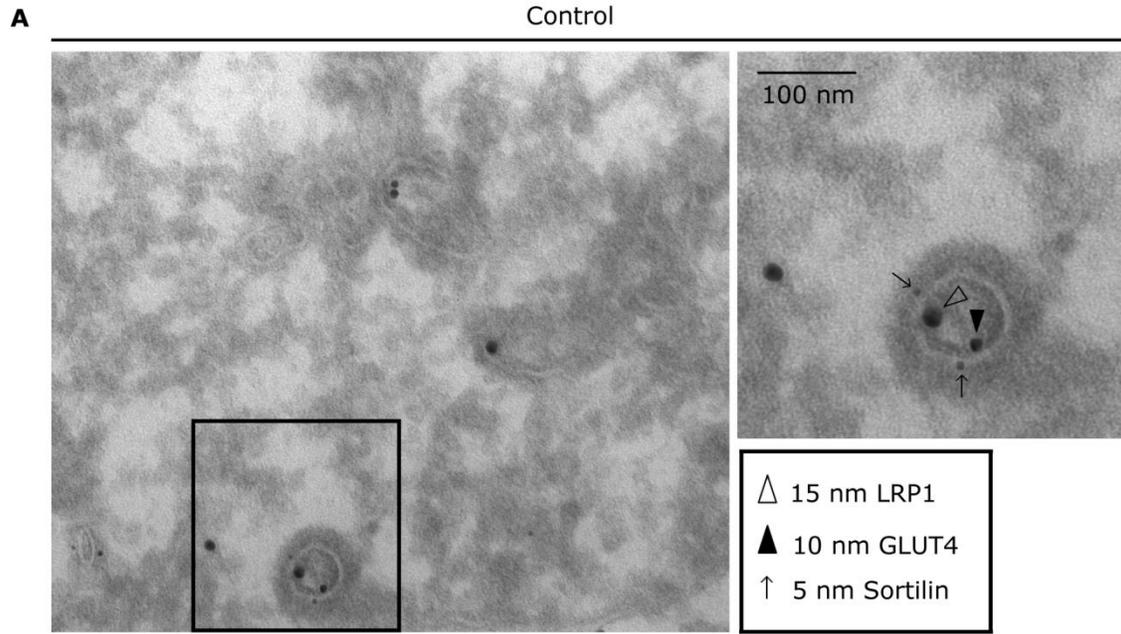


**Figura 20. Análisis de colocalización de LRP1 con VAMP2 en células MIO-M1 estimuladas con insulina.** Microscopia confocal de células MIO-M1 transfectadas de manera transiente con un vector que codifica para GLUT4-GFP (verde) estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos e inmunomarcadas para la detección de LRP1 (rojo) y VAMP2 (azul). El Merge representa la colocalización entre las tres marcas y su respectivo análisis cuantitativo está informado como la Media  $\pm$  DE de los coeficientes de colocalización de Manders. El INSET representa la ampliación de la región enmarcada en las líneas de puntos. Las puntas de flecha blancas indican los sectores de triple colocalización. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

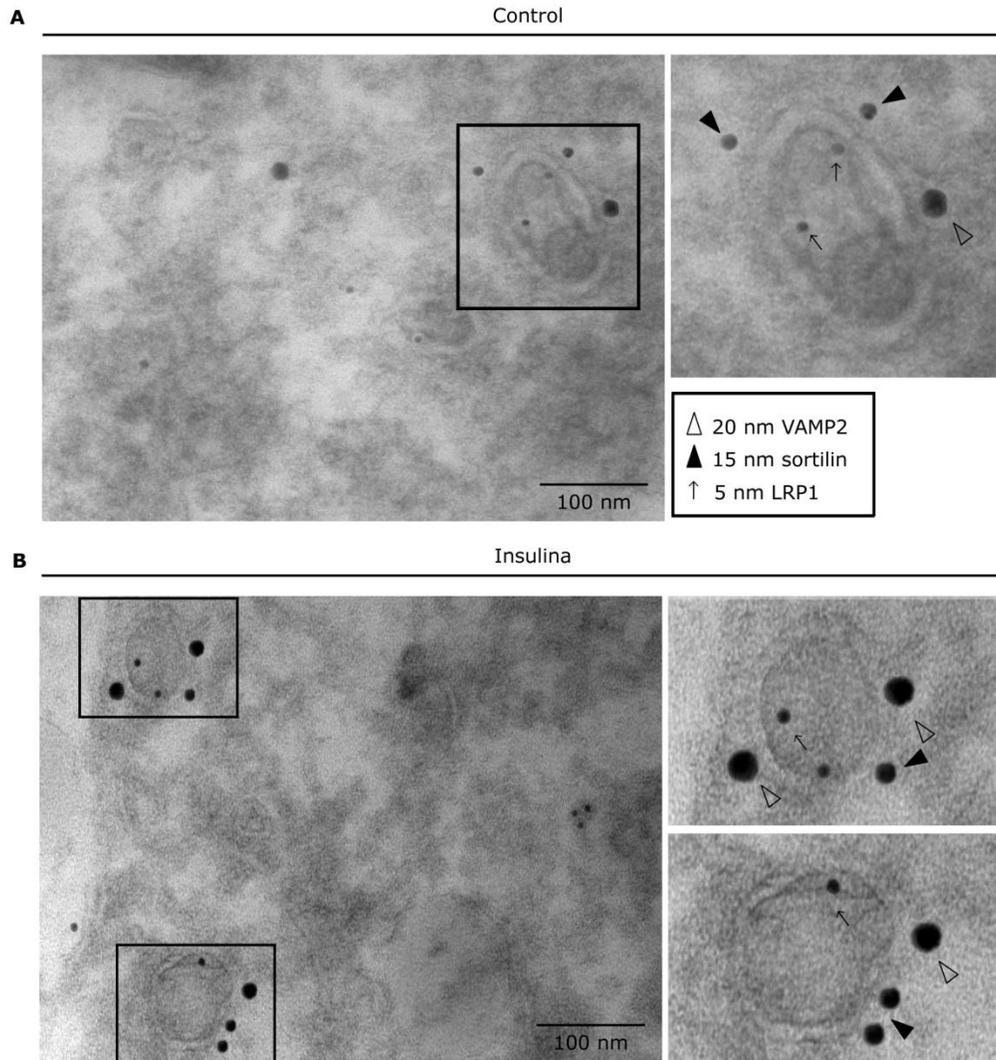
A fin de corroborar estos resultados y analizar la ultraestructura de estos compartimentos que almacenan LRP1, realizamos microscopia electrónica de transmisión (MET) en células MIO-M1 transientemente transfectadas con el vector de expresión que codifica para GLUT4-GFP. Como se muestra en la Figura 21, encontramos que una proporción importante de LRP1 se localizó en las mismas estructuras que GLUT4 y sortilin, estas vesículas presentaron una cubierta electrodensa compatible con clatrina y un tamaño aproximado de 100 nm. Bajo el estímulo con insulina, estas vesículas se redistribuyeron hacia zonas cercanas a la membrana plasmática, tal como se representa en la Figura 21.

Con el fin de descartar que la formación de estas vesículas fuera consecuencia de la expresión transiente de GLUT4, se realizaron análisis de MET para la detección de LRP1 en vesículas positivas para sortilin y VAMP2 con características similares a las visualizadas anteriormente, en células sin transfectar con el vector que codifica para GLUT4-GFP. Como se observa en la Figura 22, una parte importante del LRP1 se localizó en vesículas positivas para sortilin y VAMP2 en estas células. Luego del estímulo con insulina, estas vesículas presentaron una redistribución hacia zonas cercanas a la membrana plasmática.

Todos estos hallazgos indicarían que LRP1 se podría almacenar en vesículas intracelulares constitutivas en células MIO-M1, cuya distribución subcelular se modifica en respuesta a la insulina. Estas estructuras vesiculares, a las cuales denominamos LSVs (del inglés *LRP1 storage vesicles*), tendrían características estructurales similares a las GSVs previamente caracterizadas en adipocitos y células musculares, en lo que respecta a su tamaño y por la presencia de sortilin y VAMP2. A partir de estas vesículas se podría explicar desde donde se origina el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática luego del estímulo con insulina en las células MIO-M1.



**Figura 21. Microscopía electrónica de transmisión para evaluar las vesículas de almacenamiento de LRP1 en células MIO-M1. A y B)** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de células transfectadas de manera transiente con un vector de expresión que codifica para GLUT4-GFP estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. Los cortes ultra finos fueron inmunomarcados con anticuerpos anti-sortilin, anti-LRP1 y anti-GLUT4. La detección de estos anticuerpos primarios se realizó utilizando Proteína A acoplada a partículas de oro de diferentes tamaños, siguiendo lo detallado en la sección de Materiales y Métodos. Las flechas corresponden a partículas de oro de 5 nm que detectan sortilin, las puntas de flechas negras corresponden a partículas de oro de 10 nm que detectan GLUT4 y las puntas de flechas blancas corresponden a partículas de oro de 15 nm que detectan LRP1. Las regiones enmarcadas representan las magnificaciones 4X de las imágenes. La barra de escala corresponde a 100 nm. **C)** Cuantificación del número de vesículas triple positivas para LRP1, sortilin y GLUT4 en la periferia celular por célula expresado como la Media  $\pm$  SEM. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). **D)** Gráfico de la distribución de tamaños vesiculares cuantificados como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos.

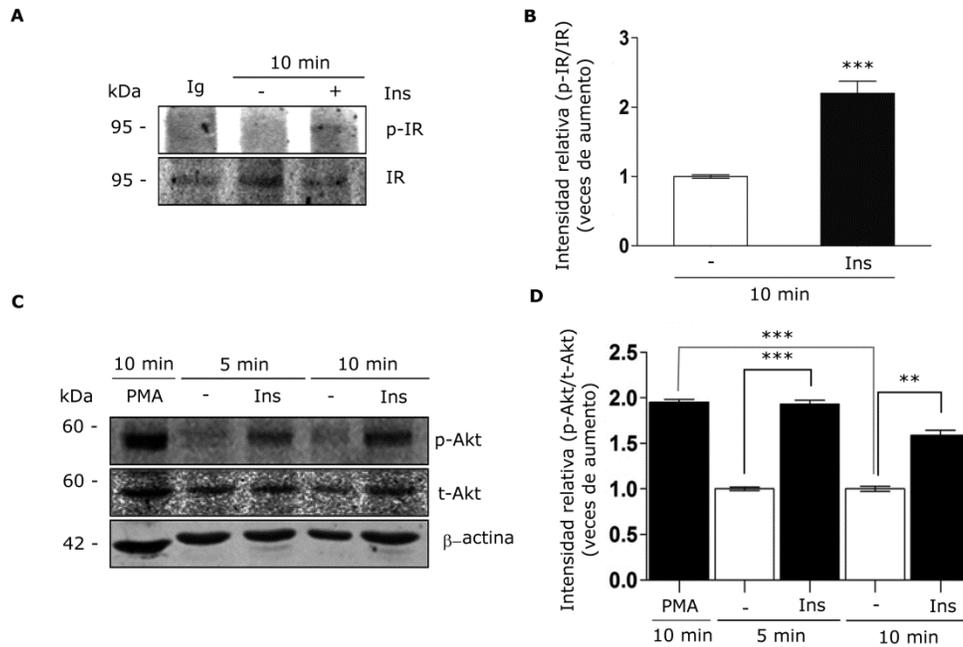


**Figura 22. Microscopía electrónica de transmisión para evaluar las vesículas de almacenamiento de LRP1 en células MIO-M1. A y B)** Microscopía electrónica de transmisión (MET) de células estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. Los cortes ultra finos fueron inmunomarcados con anticuerpos anti-sortilin, anti-LRP1 y anti-VAMP2. La detección de estos anticuerpos primarios se realizó utilizando Proteína A acoplada a partículas de oro de diferentes tamaños. Las flechas corresponden a partículas de oro de 5 nm que detectan LRP1, las puntas de flechas negras corresponden a partículas de oro de 15 nm que detectan sortilin y las puntas de flechas blancas corresponden a partículas de oro de 20 nm que detectan VAMP2. Las regiones enmarcadas representan las magnificaciones 4X de las imágenes. La barra de escala corresponde a 100 nm.

#### **4.1.7 Evaluación de la vía de señalización de insulina en el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática en células MIO-M1.**

Como se mencionó previamente en la Introducción de la presente tesis, en varios trabajos se ha demostrado que insulina es capaz de incrementar los niveles de

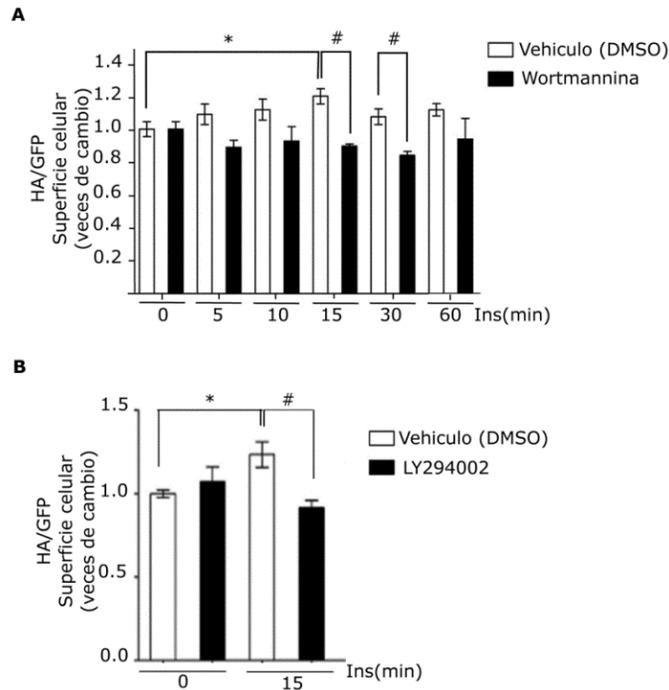
expresión de LRP1 en la membrana plasmática de diversos tipos celulares como adipocitos, células musculares y hepatocitos, aunque el mecanismo de este tráfico no ha sido aún suficientemente caracterizado (Bogan y col., 2010; Ding y col., 2016; Laatsch y col., 2009). También ha sido ampliamente demostrado que esta hormona es capaz de activar diferentes vías de señalización intracelular, luego de su interacción con su receptor específico IR (Leto y Saltiel, 2012). No obstante, de todas ellas la mejor caracterizada, principalmente asociada con la homeostasis de la glucosa, es la mediada por la vía PKB cuyo principales mediadores son PI<sub>3</sub>K y Akt (Leto y Saltiel, 2012; Jaldin-Fincat y col., 2017). Con el propósito de evaluar si el estímulo con insulina era capaz de activar esta vía de señalización en las células MIO-M1, se realizaron ensayos de estímulo continuo con insulina 100 nM durante diferentes tiempos y luego por un análisis de inmunoprecipitación y *Western blot* se evaluaron los niveles de fosforilación del IR y Akt. Como se muestra en la Figura 23 A y B, el estímulo de 10 minutos con insulina incrementó de manera significativa los niveles de fosforilación del IR (p-IR). Del mismo modo, a través de un análisis a diferentes tiempos de estímulo, se encontró que insulina produjo un incremento significativo de los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) a los 5 y 10 minutos de estímulo con insulina, como se observa en la Figura 23 C y D.



**Figura 23. Evaluación del nivel de fosforilación de IR y Akt por acción de insulina en células MIO-M1.** **A)** Ensayo de inmunoprecipitación para IR seguido de *Western blot* para el análisis del IR fosforilado (p-IR) y el IR total. Las células MIO-M1 fueron estimuladas o no con insulina 100 nM durante 10 minutos. La primera calle (Ig) corresponde al control de isotipo de inmunoglobulina. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica relativa de las bandas obtenidas mediante el ensayo de *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de p-IR/IR. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ). Se realizaron tres experimentos independientes. **C)** Ensayo de *Western blot* para el análisis de los niveles de Akt fosforilado (p-Akt) y Akt total (t-Akt) en células MIO-M1 estimuladas con insulina 100 nM durante 5 y 10 minutos. La primera calle corresponde al control de 10 minutos con PMA (1  $\mu$ M). Se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina como control de carga proteica. **D)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica relativa de las bandas obtenidas mediante el ensayo de *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de p-Akt/t-Akt. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través del test *Anova* de una vía. (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) y (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ). Se realizaron tres experimentos independientes.

Posteriormente, fue de interés demostrar si LRP1 se moviliza a membrana plasmática por activación de la vía de señalización de PKB inducida por insulina. Para ello, las células MIO-M1 fueron transfectadas de manera transiente con el vector de expresión que codifica para mLRP4-GFP-HA, luego las células fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia de Wortmanina o LY-294002, ambos inhibidores de PI<sub>3</sub>K, y finalmente estimuladas con insulina 100 nM a diferentes tiempos. Mediante ensayos de *in cell Western blot* encontramos que el efecto de insulina sobre la expresión de LRP1 a nivel de la membrana plasmática

fue significativamente bloqueado por Wortmanina e LY-294002, como se observa en la Figura 24.

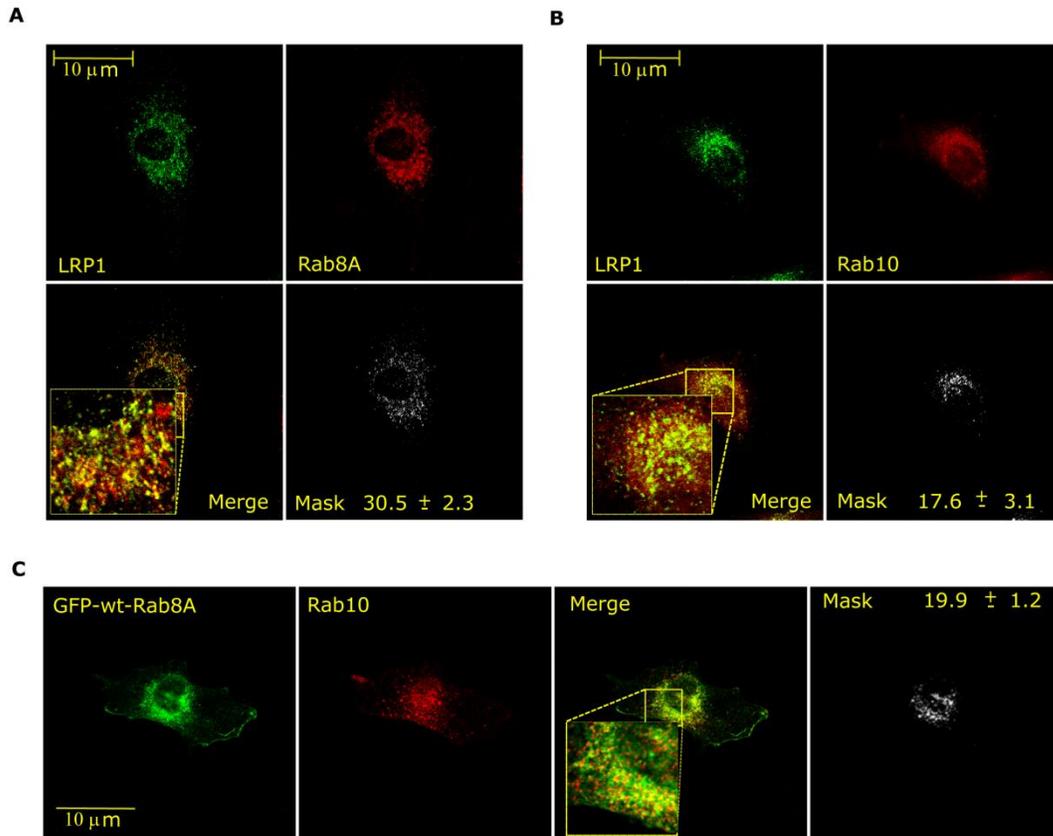


**Figura 24. Análisis del efecto de la vía de señalización PKB inducida por insulina sobre el tráfico de mLRP4-GFP-HA hacia la membrana plasmática de células MIO-M1. A)** Ensayo de *in cell Western blot* a través de la inmunodetección de HA en células MIO-M1 transientemente transfectadas con un vector de expresión que codifica para mLRP4-GFP-HA. Las células fueron preincubadas con Wortmanina (40 mM) por 30 minutos (barra negra) y estimuladas con insulina 100 nM por 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Los niveles de HA en la superficie celular se analizaron en células sin permeabilizar a 4 °C, utilizando un anticuerpo anti-HA y revelado con un anticuerpo secundario conjugado con 680CW. La gráfica de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la detección del tag de HA en membrana plasmática, relativa a la intensidad de fluorescencia de GFP, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la condición de estímulo con insulina respecto a sin estimular. (#) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la condición sin tratar y tratada con Wortmanina en células estimuladas con insulina. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. **B)** Ensayo de *in cell Western blot* a través de la inmunodetección de HA en células MIO-M1 transientemente transfectadas con un vector de expresión que codifica para mLRP4-GFP-HA. Las células fueron preincubadas con LY294002 (40 mM) por 30 minutos (barra negra) y estimuladas con insulina 100 nM por 15 minutos. Los niveles de HA en la superficie celular se analizaron en células sin permeabilizar a 4 °C, utilizando un anticuerpo anti-HA y revelado con un anticuerpo secundario conjugado con 680CW. El gráfico representa la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la detección del tag de HA en membrana plasmática, relativas a la intensidad de fluorescencia de GFP, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la condición de estímulo con insulina respecto a sin estimular. (#) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la condición sin tratar y tratada con LY294002 en células estimuladas con insulina. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Estos resultados indican que insulina induciría la movilización de LRP1 a la membrana plasmática mediante la activación del eje de señalización IR/PI<sub>3</sub>K/Akt.

#### **4.1.8 Participación de proteínas de transporte vesicular en el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática por acción de insulina en células MIO-M1.**

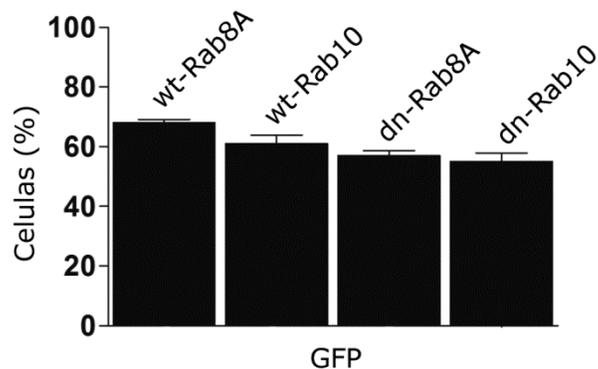
En estudios previos del grupo de investigación se demostró que la GTPasa Rab11 no está involucrada en el retorno de LRP1 a la superficie celular en células MIO-M1 (Barcelona y col. 2013), lo que sugiere la posibilidad de que otras vías de reciclado, independientes de Rab11, participen en el tráfico intracelular de LRP1 hacia la membrana plasmática. Actualmente se sabe que varias GTPasas están involucradas en el tráfico vesicular inducido por insulina mediante la activación del eje IR/PI<sub>3</sub>K/Akt (Leto y Saltiel, 2012). De esta manera, tanto Rab8A como Rab10 son claves durante la movilización de las vesículas GSVs a la membrana plasmática a través de una vía exocítica regulada por insulina en células musculares y adipocitos (Sun y col., 2010; Miinea y col., 2005; Sano y col., 2007; Chen y col., 2010). Por lo tanto, en esta instancia, resulta de interés evaluar si las GTPasas Rab8A y Rab10 participaban en la regulación del transporte de LRP1 dependiente de insulina hacia la membrana plasmática en células MIO-M1. Lo primero que procedimos a analizar fue la distribución subcelular de Rab8A y Rab10 para evidenciar si colocalizaban en las mismas estructuras con LRP1. La Figura 25 A y B muestra que en una condición basal, el LRP1 se localizó en vesículas positivas para Rab8A en un ≈30 % y Rab10 en un ≈17 % con un patrón de distribución vesicular. Además encontramos que células transfectadas con el vector de expresión que codifica para Rab8A-GFP, esta GTPasa mostró una significativa colocalización con Rab10 en estructuras vesiculares distribuidas de manera perinuclear (Figura 25 C). Estos patrones de distribución subcelular de las GTPasas entre sí y con respecto a LRP1 no sufrieron modificaciones significativas en células tratadas con insulina, por lo que estos resultados no fueron mostrados.



**Figura 25. Análisis de colocalización de LRP1 con las GTPasas Rab8A y Rab10 en células MIO-M1.** Microscopía confocal de células MIO-M1 inmunomarcadas para la detección de LRP1 (verde) y Rab8A (Panel A; rojo) o Rab10 (Panel B, rojo). El Merge representa la colocalización entre las marcas, donde también se muestran recuadros que corresponden a ampliaciones 4X. El Mask representa las imágenes binarias en donde se muestran en color blanco los pixeles de colocalización entre las marcas y su respectivo análisis cuantitativo en el que se representa la Media  $\pm$  DE de los coeficientes de colocalización de Manders. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. **C)** Microscopía confocal de células MIO-M1 transientemente transfectadas con un vector de expresión que codifica para Rab8A-GFP en su versión salvaje (verde) e inmunomarcadas para la detección de Rab10 (rojo). El Merge representa la colocalización entre las marcas, donde también se muestran recuadros que corresponden a ampliaciones 4X. El Mask representa las imágenes binarias en donde se muestran en color blanco los pixeles de colocalización entre las marcas y su respectivo análisis cuantitativo está informado como las Media  $\pm$  DE de los coeficientes de colocalización de Manders. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

Posteriormente procedimos a evaluar si estas GTPasas participaban en la movilización de LRP1 hacia la membrana plasmática por acción de insulina. Para ello las células fueron transfectadas de manera transiente con las versiones

salvajes [wt-Rab8A y wt-Rab10] y dominantes negativas (funcionalmente inactivas) [dn-Rab8AT22N y dn-Rab10T23N] de las GTPasas Rab8A y Rab10 fusionadas a GFP. Mediante citometría de flujo se corroboró que el porcentaje de transfección para cada uno de estos plásmidos fue mayor al 50% como se observa en la Figura 26.

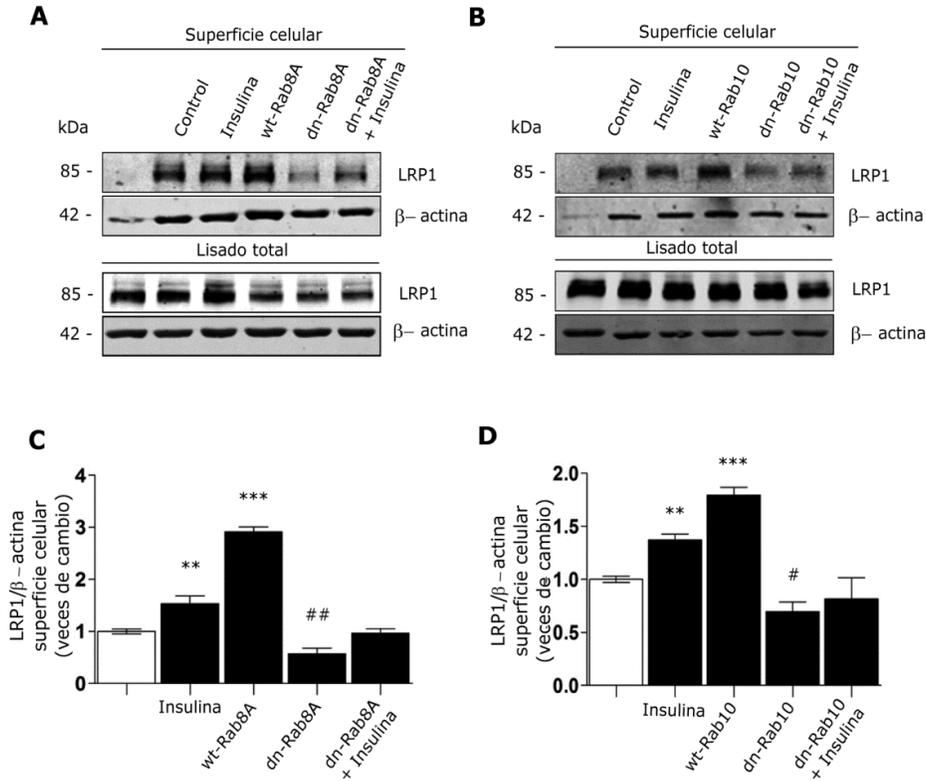


**Figura 26. Porcentaje de células que expresan la proteína blanco a partir de la transfección con vectores de expresión en células MIO-M1.** Niveles de expresión de proteínas GFP analizados por citometría de flujo de células MIO-M1 transientemente transfectadas con vectores que codifican para wt-Rab8A-GFP, wt-Rab10-GFP, dn-Rab8A-GFP y dn-Rab10-GFP. La gráfica de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia media (IFM) expresadas como porcentaje (%) de células que expresan GFP, considerando el descuento de la autofluorescencia. Tres experimentos independientes fueron realizados en triplicado.

En estas condiciones, las células fueron estimuladas con insulina 100 nM durante 30 minutos y posteriormente se realizó un ensayo de biotilación de proteínas de superficie para analizar la expresión de LRP1 en la membrana plasmática. Como se observa en la Figura 27 A y C, en las células transfectadas con wt-Rab8A se encontró un incremento significativo de la expresión de LRP1 a nivel de la membrana plasmática en comparación con las células control. Mientras que, en las células transfectadas con la dn-Rab8A y sin estímulo con insulina se afectó de manera significativa la expresión de LRP1 en la membrana plasmática respecto al control sin transfección, sugiriendo que existe un tráfico constitutivo de LRP1 hacia la superficie celular que podría estar regulado por esta GTPasa. Bajo el estímulo con insulina, células transfectadas con la dn-Rab8A mostraron un incremento de LRP1 en la membrana plasmática aunque dicho nivel fue significativamente menor que la condición sin transfección estimulada con insulina. Por otra parte, en las células transfectadas con wt-Rab10 se encontró un incremento significativo de la

expresión de LRP1 a nivel de la membrana plasmática en comparación con las células control sin transfección. No obstante, cuando se analizó la condición de transfección con la dn-Rab10, encontramos que tanto en la condición con y sin estímulo se vio afectado el transporte de LRP1 hacia la membrana plasmática en comparación con la condición control de células sin transfección, como se observa en la Figura 27 B y D.

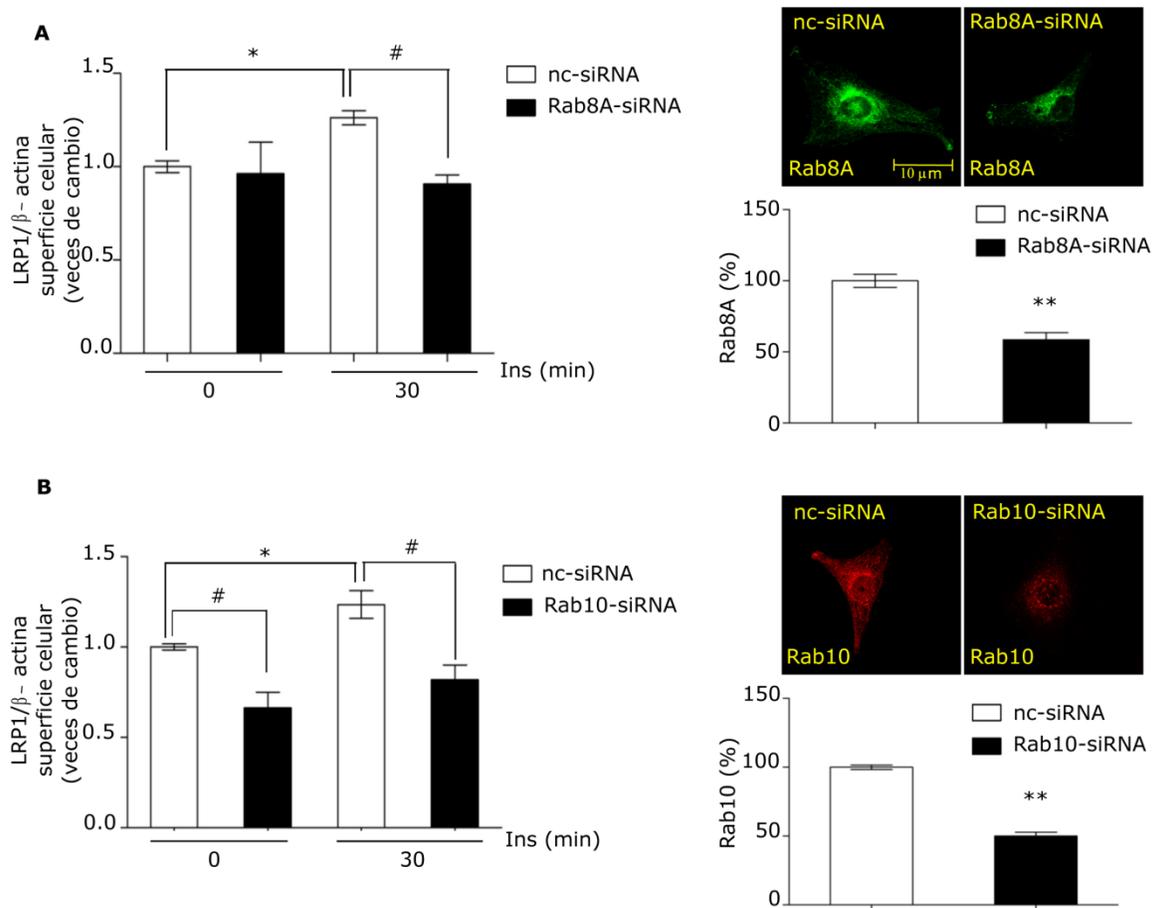
Estos resultados demuestran que las GTPasas Rab8A y Rab10 estarían involucradas en el mantenimiento de niveles estables de LRP1 en la superficie celular, así como en la exocitosis regulada por insulina de este receptor en células MIO-M1.



**Figura 27. Análisis del efecto de Rab8A y Rab10 sobre los niveles de expresión de LRP1 en la membrana plasmática de células MIO-M1 estimulas con insulina.** Ensayo de biotilación de proteínas de superficie en células transientemente transfectadas con vectores de expresión que codifican para wt-Rab8A y dn-Rab8A (A) o wt-Rab10 y dn-Rab10 (B), estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. En ambos experimentos el LRP1 superficial biotilado fue aislado mediante incubación con *beads*-estreptavidina y luego analizado por *Western blot* para la detección de la subunidad  $\beta$  de LRP1. La primera calle representa el control negativo de precipitación (eluato de extracto proteico de células no biotiladas). En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1 en los lisados totales donde se ofreció el 20% de la carga proteica destinada a la incubación con los *beads*. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga proteica. C y D) Los gráficos de barras que representan la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a  $\beta$ -actina) de las bandas correspondientes a LRP1 de membrana plasmática para los diferentes tiempos de estímulo con insulina, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (#) Indica disminución significativas ( $p < 0,05$ ) vs. control, (##) indica disminución significativas ( $p < 0,01$ ) vs. control, (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) vs. control y (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

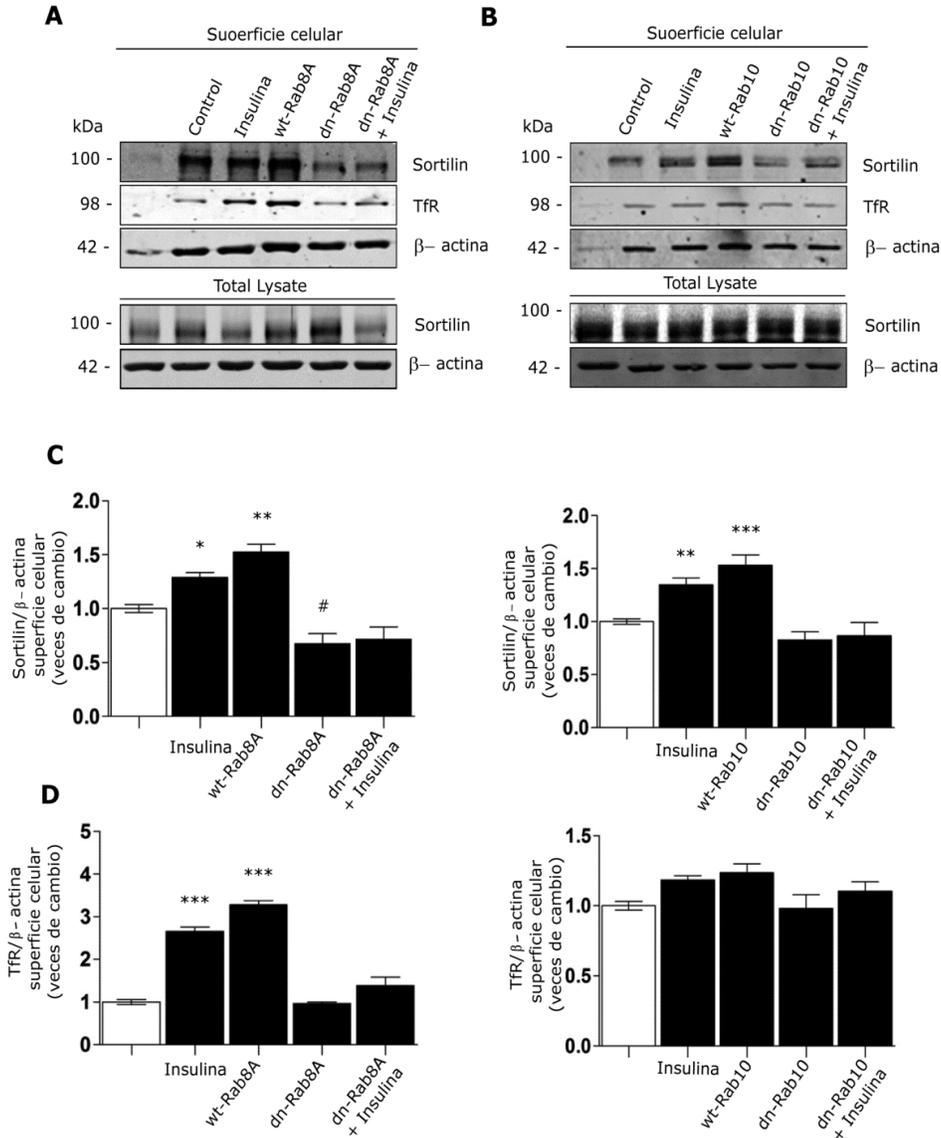
Con el objetivo de corroborar estos resultados y descartar los posibles efectos adversos que conduzcan a interpretaciones erróneas producto de la expresión ectópica de proteínas, se procedió a realizar un silenciamiento de Rab8A o Rab10 utilizando siRNA específicos de estas GTPasas (siRNA-Rab8A y siRNA-Rab10), tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. De este modo, en

células tratadas con siRNA-Rab8A y siRNA-Rab10, así como con siRNA de secuencia control no específica (nc-siRNA), se procedió a evaluar la expresión de LRP1 en la membrana plasmática mediante un ensayo de *in cell Western blot* en células sin permeabilizar a 4 °C. Como se puede ver en la Figura 28 A la disminución del 50% de expresión de Rab8A, producto del tratamiento con siRNA-Rab8A afectó de manera significativa el tráfico de LRP1, en células estimuladas con insulina respecto a la situación control con nc-siRNA. En el mismo sentido, cuando la expresión constitutiva de Rab10 se redujo al 50% por efecto del tratamiento con siRNA-Rab10 se observó una disminución de la expresión de LRP1 en la superficie celular en condiciones sin y con estímulo con insulina respecto a las condiciones controles de células tratadas con nc-siRNA, como se puede observar en la Figura 28 B.



**Figura 28. Análisis del efecto del silenciamiento de Rab8A y Rab10 sobre la expresión de LRP1 en membrana plasmática de células MIO-M1 estimuladas con insulina.** *In cell Western blot* en células silenciadas utilizando siRNA control negativo (nc-siRNA), Rab8A (**A**) y Rab10 (**B**), estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. Los niveles de LRP1 en la superficie celular fueron analizados en células sin permeabilizar a 4 °C utilizando un anticuerpo anti-LRP1 o un anticuerpo anti- $\beta$  actina y revelados con anticuerpos secundarios conjugados a 680CW y 800CW, respectivamente. Los gráficos de barras representan la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la detección de LRP1 en membrana plasmática, relativas a la intensidad de fluorescencia de  $\beta$ -actina, expresadas como veces de cambio respecto al control nc-siRNA sin estímulo. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (#) y (\*) Indican diferencias significativas de disminución o incremento respectivamente ( $p < 0,05$ ) vs. nc-siRNA. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. En la parte derecha de ambos paneles se muestran los INSETS correspondientes a imágenes de microscopía confocal de células MIO-M1 silenciadas para Rab8A y Rab10 donde se realizó una inmunodetección de estas GTPasas. El gráfico de barras representa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia para Rab8A (A) y Rab10 (B) por área celular. Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  SEM del % de expresión de cada GTPasa. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) vs. nc-siRNA. Se realizaron tres experimentos independientes.

También encontramos que sortilin, otra de las proteínas constituyentes de las LSVs, mostró un patrón de expresión similar en la membrana plasmática a la de LRP1 observado mediante ensayos de biotilación de proteínas de superficie, mientras que el TfR, un receptor de reciclado endocítico dependiente de Rab11, no mostró ningún cambio sustancial en su nivel en superficie celular en células transfectadas dn-Rab8A o dn-Rab10, como se observa en la Figura 29, lo que constituye un control interesante para corroborar la especificidad de este transporte exocítico regulado por insulina.



**Figura 29. Análisis del efecto de formas inactivas de Rab8A y Rab10 sobre la expresión de sortilin y del receptor de transferrina (TfR) en la membrana plasmática de células MIO-M1 estimuladas con insulina.** Ensayo de biotilación de proteínas de superficie en células transientemente transfectadas con vectores de expresión que codifican para wt-Rab8A y dn-Rab8A (A) o wt-Rab10 y dn-Rab10 (B), estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. En ambos experimentos tanto sortilin como TfR superficiales biotilados fueron aislados mediante incubación con *beads*-estreptavidina y luego analizado por *Western blot* para la detección de estas proteínas. La primera calle, es el control negativo de precipitación (eluito de extracto proteico de células no biotiladas). En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de sortilin y TfR en los lisados totales donde se ofreció el 20% de la carga proteica destinada a la incubación con *beads*. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga proteica. C y D) Las gráficas de barras representan la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a  $\beta$ -actina) de las bandas correspondientes a sortilin (C) y TfR (D) de membrana plasmática, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (#) Indica disminución significativas ( $p < 0,05$ ) vs. control, (\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) vs. control, (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) vs. control y (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes.

#### 4.1.9 Principales conclusiones de la sección 4.1

Los resultados detallados en esta sección permitieron caracterizar el tráfico intracelular de LRP1 inducido por insulina en células MIO-M1, a partir de los cuales se concluyó que: i) En ausencia de insulina la mayor proporción de LRP1 se distribuyó en vesículas endocíticas del tipo endosomas tempranos [EEA1+] y compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4+]. Una proporción menor del receptor se localizó en compartimentos de reciclado endocítico lento [Rab11+], en compartimentos de *trans*-Golgi [TGN46+] y menor aún fue la localización de LRP1 en endosomas tardíos [Rab7+]. ii) En presencia de insulina se encontraron cambios significativos en la distribución subcelular de LRP1 principalmente en endosomas tempranos [EEA1+] y en el compartimento de reciclado rápido [Rab4+]. El resto de los marcadores endosomales evaluados no evidenciaron cambios significativos luego del estímulo con insulina. iii) A nivel de la membrana plasmática, encontramos que insulina promovió el tráfico de LRP1 hacia la superficie celular. iv) Mediante MET se pudo identificar pequeñas vesículas intracelulares de  $\approx 100$  nm, que almacenan LRP1 junto con otras proteínas características de estas estructuras como sortilin, VAMP2 y GLUT4 cuando este transportador fue ectópicamente expresado. v) Este tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática fue mediado por la activación de la vía de señalización intracelular dependiente del eje IR/PI<sub>3</sub>K/Akt y vi) esta vía de señalización intracelular inducida por insulina promovió el tráfico de LRP1 a la superficie celular a través de diferentes vías posibles de reciclado y/o exocitosis, entre ellas, la vía de reciclado rápido [Rab4+] y la vía exocítica mediada por las GTPasas Rab8A y Rab10.

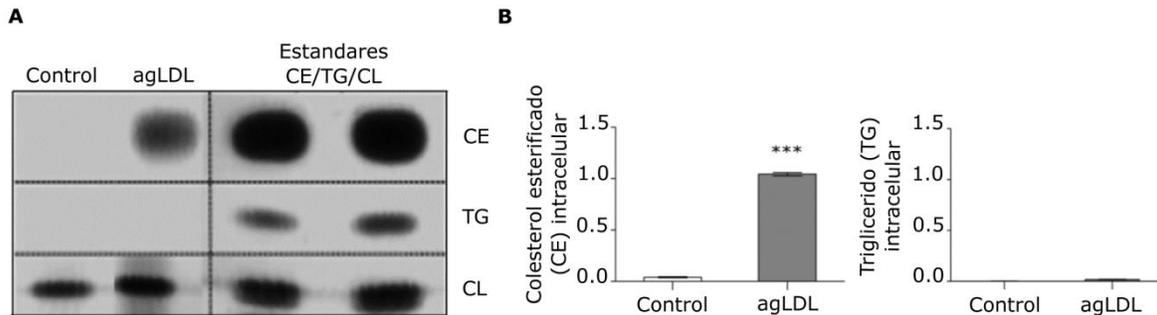
## **4.2 Evaluación de la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a la insulina.**

Para responder el objetivo específico 2 del presente trabajo de tesis se utilizó la línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1, ya que estas células son sensibles a la insulina en términos de expresar su receptor específico IR (Figura 9) y GLUT4 como mediadores moleculares claves para controlar la homeostasis de la glucosa y poseen toda la maquinaria necesaria para evaluar el tráfico intracelular de LRP1, así como también el efecto de ligandos de LRP1 como agLDL sobre la respuesta a la hormona en cardiomiocitos.

### **4.2.1 Captación de colesterol esterificado desde agLDL en la línea de celular HL-1.**

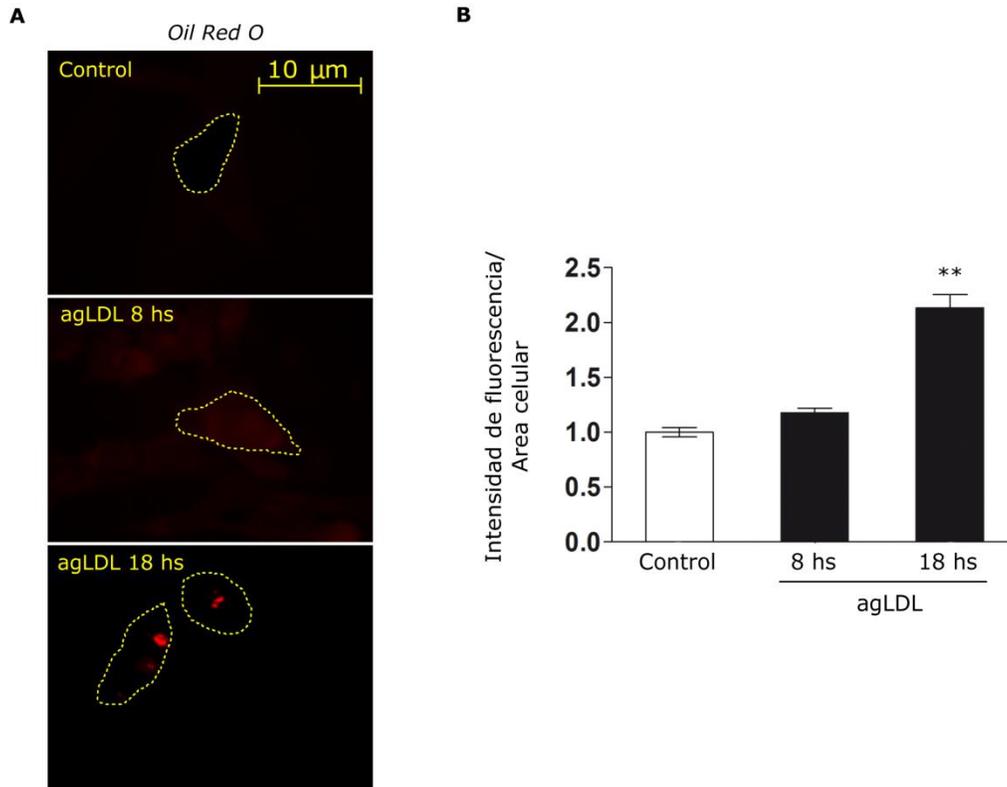
Como se mencionó en la Introducción del presente trabajo de tesis, ha sido demostrado que las lipoproteínas modificadas son responsables de generar la formación de gotas lipídicas o *lipid droplets* (LD) en el interior de diversos tipos celulares luego de aproximadamente 15 horas de estímulo (Walther y Farese, 2012; Walther y col., 2017; Xu y col., 2017). Esta formación de LD en células diferentes a las del tejido adiposo como en hepatocitos y células musculares está asociada con la alteración en la respuesta a insulina en esos tejidos, aunque el mecanismo molecular involucrado en este proceso es aún desconocido (Boren y col., 2013). Si bien los adipocitos son células que forman LD para la reserva de lípidos neutros, la generación excesiva de estos produce alteraciones de la respuesta a la insulina en estas células, principalmente atribuida al efecto estérico de estos LD en el citoplasma celular (Kim y col., 2015). Sin embargo, poco se conoce hasta el momento si estímulos a tiempos cortos con lipoproteínas modificadas, donde no se evidencia formación de LD, pueden producir alteraciones en la respuesta intracelular a la insulina. Por lo que, en primera instancia se procedió a evaluar el contenido intracelular de lípidos esterificados acumulados producto de la incubación con agLDL en las células HL-1. Para ello, las células fueron incubadas con agLDL en una concentración 100 µg/ml durante

un tiempo corto de 8 horas. Posteriormente, se analizó el contenido de colesterol esterificado (CE) y triglicéridos (TG) intracelular mediante extracción lipídica y cromatografía en capa delgada. Como se muestra en la Figura 30, las agLDL indujeron exclusivamente la acumulación intracelular de CE en células HL-1, no así la de TG, lo que concuerda con el contenido lipídico estructural de estas lipoproteínas.



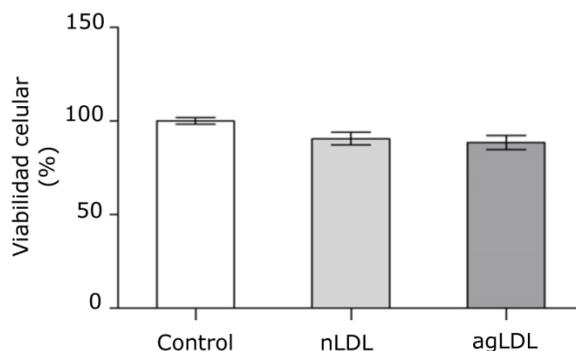
**Figura 30. Caracterización del contenido lipídico intracelular en células HL-1 incubadas en presencia de agLDL.** **A)** Ensayo de cromatografía en capa delgada de extractos lipídicos provenientes de células HL-1 incubadas con agLDL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 8 horas, donde se muestran las bandas correspondientes a colesterol esterificado (CE), triglicéridos (TG) y colesterol libre (CL). En el panel derecho se muestran las bandas de CE/TG/CL de los estándares analizados por duplicado. **B)** El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas de las bandas correspondientes a CE y TG relativo al contenido de CL para cada condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes.

Luego se procedió a evaluar si esta acumulación de CE inducida por la incubación con agLDL durante 8 horas se asociaba con una evidente formación de LD en las células HL-1. Para ello, las células fueron tratadas con agLDL 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 8 y 18 horas y posteriormente se realizó una tinción con *Oil Red O* para la detección de gotas de lípidos por microscopia de epifluorescencia. En la Figura 31, se puede observar que no se produjo formación significativa de LD luego de 8 horas de tratamiento con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  agLDL a diferencia de lo que ocurre luego de la incubación con las agLDL durante 18 horas en las células HL-1, como ha sido demostrado en VSMCs (Costales y col., 2015). Tiempos prolongados de incubación escapan al objetivo central de este trabajo de tesis, por lo cual los experimentos siguientes fueron realizados a 8 horas de incubación con agLDL.



**Figura 31. Análisis de la formación de LD en células HL-1. A)** Ensayo de microscopía óptica para la detección de gotas lipídica en células HL-1 tratadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 y 18 horas, posteriormente teñidas con *Oil Red O*. La línea amarilla de puntos enmarca el contorno celular. La barra de escala corresponde a 10 µm. **B)** El gráfico representa la Media ± SEM de intensidad de fluorescencia de *Oil Red O* por área celular relativo a la situación control. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía, (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes y se analizaron 20 células por condición en cada experimento.

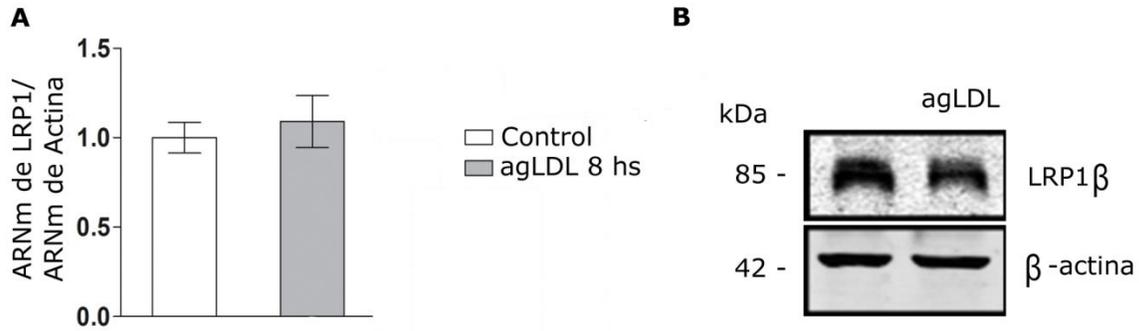
Finalmente se procedió a corroborar que el tratamiento con las agLDL no afectaba la viabilidad de las células durante los tiempos empleados. Para ello, las células HL-1 fueron tratadas con nLDL o agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y se realizó un ensayo con MTT. En la Figura 32, se muestra que el tratamiento con las lipoproteínas agLDL no afectó de manera significativa la viabilidad celular.



**Figura 32. Ensayo de viabilidad celular de células HL-1 tratadas con agLDL.** Las células HL-1 fueron incubadas con nLDL o agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas. La viabilidad celular se evaluó usando el colorante metabólico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro (MTT) (5 mg / ml) agregado al medio de cultivo (1:10) durante 2-3 horas a 37 ° C. La gráfica de barras representa la Media  $\pm$  SEM de los porcentajes de viabilidad celular respecto al experimento control. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. Se realizaron tres experimentos independientes.

#### 4.2.2 Evaluación de la expresión de LRP1 por acción de agLDL en células HL-1.

Como se mencionó en la introducción del presente trabajo de tesis, se ha demostrado que la presencia de agLDL prolonga el tiempo de vida media de LRP1 en VSMCs producto de inhibir el proceso de degradación proteasomal, lo que favorece la captación y acumulación intracelular de ésteres de colesterol a partir de lipoproteínas modificadas en este tipo celular (Cal y col., 2013). Por lo tanto, en esta instancia se procedió a evaluar si el tratamiento por 8 horas con las agLDL producía modificaciones en los niveles de expresión de LRP1. Para ello, se evaluó la expresión génica de *Irp1* a través de un ensayo de RT-PCR cuantitativa y los niveles proteicos de LRP1 $\beta$  mediante *Western blot*, en células HL-1 tratadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas. La Figura 33, muestra que los niveles de ARN mensajero (ARNm) y de proteína de LRP1 no se modificaron de manera significativa luego del tratamiento de 8 horas con las lipoproteínas modificadas.



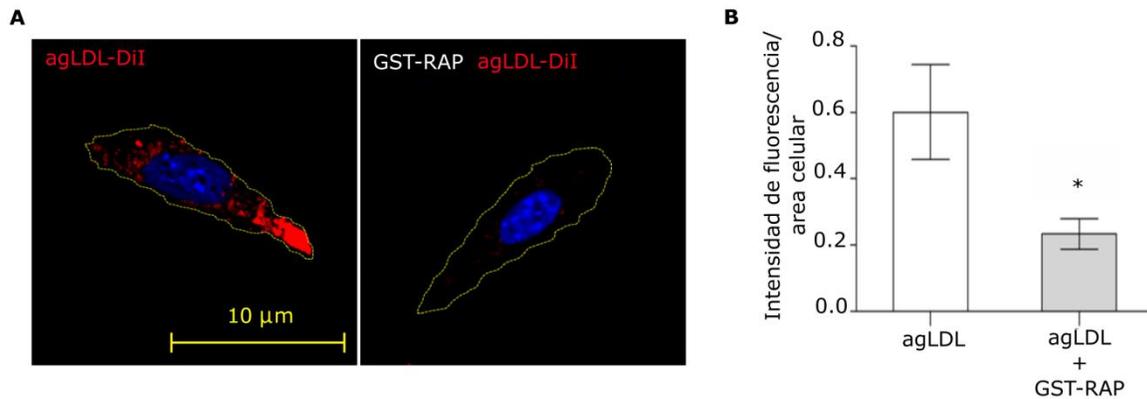
**Figura 33. Análisis del nivel de expresión de LRP1 en células HL-1 tratadas con agLDL. A)** Ensayo de RT-PCR cuantitativa para evaluar la expresión de ARNm para LRP1. El gráfico de barra representa la Media  $\pm$  SEM de la cuantificación de los niveles de ARNm obtenidos por RT-PCR, luego de la incubación con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas en células HL-1. Como controles de carga se utilizaron los productos de RT-PCR de transcritos de Actina. **B)** Ensayo de *Western blot* para la inmunodetección de la subunidad  $\beta$  de LRP1 en células HL-1 incubadas con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas. Como control de carga proteica se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina. Se realizaron tres experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que las agLDL no modifican la expresión de ARN mensajero ni de proteína para LRP1 al tiempo de incubación evaluado.

#### 4.2.3 Participación de LRP1 en la captación de agLDL en células HL-1.

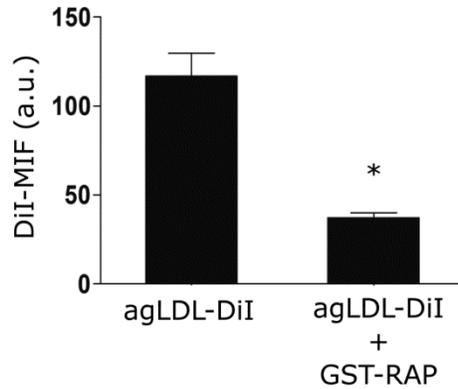
Como se ha mencionado previamente, diversos trabajos han demostrado que LRP1 es uno de los receptores involucrados en la incorporación de colesterol esterificado a partir de la captación de las agLDL en VSMCs y otras tipos celulares (Costales y col., 2015; Swarnakar y col., 2001). Con el objetivo de corroborar si LRP1 es el receptor responsable de mediar la unión y endocitosis de agLDL en las células HL-1, se realizó un ensayo de bloqueo de la unión ligando/receptor evaluado por microscopia confocal. Para ello, las células HL-1 fueron preincubadas con la proteína chaperona GST-RAP, que impide la unión de todos los ligando con LRP1, en una concentración de 400 nM durante 30 minutos previos al tratamiento con las lipoproteínas. Luego las células fueron incubadas con agLDL 100  $\mu$ g/ml marcadas con la carbocianina lipofílica Dil, durante 8 horas junto con GST-RAP 400 nM en el medio de cultivo celular. Como se observa en la

Figura 34, la presencia de GST-RAP bloqueó la captación de las agLDL de manera significativa en estas células.



**Figura 34. Análisis de la captación de agLDL en células HL-1. A)** Microscopía confocal de células HL-1 preincubadas o no con GST-RAP 400 nM y tratadas con agLDL-Dil 100 µg/ml durante 8 horas. En rojo se observa la fluorescencia de agLDL-Dil y la línea de puntos amarilla representa el contorno celular. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst. La barra de escala corresponde a 10 µm. **B)** El gráfico de barras representa la Media ± SEM de la intensidad de fluorescencia de Dil por área celular. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Tres experimentos independientes fueron realizados y se analizaron 20 células por experimento.

Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de citometría de flujo en células HL-1 tratadas de la misma manera como se mencionó anteriormente. Como se muestra en la Figura 35, la incubación con GST-RAP redujo de manera significativa la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Dil en estas células.



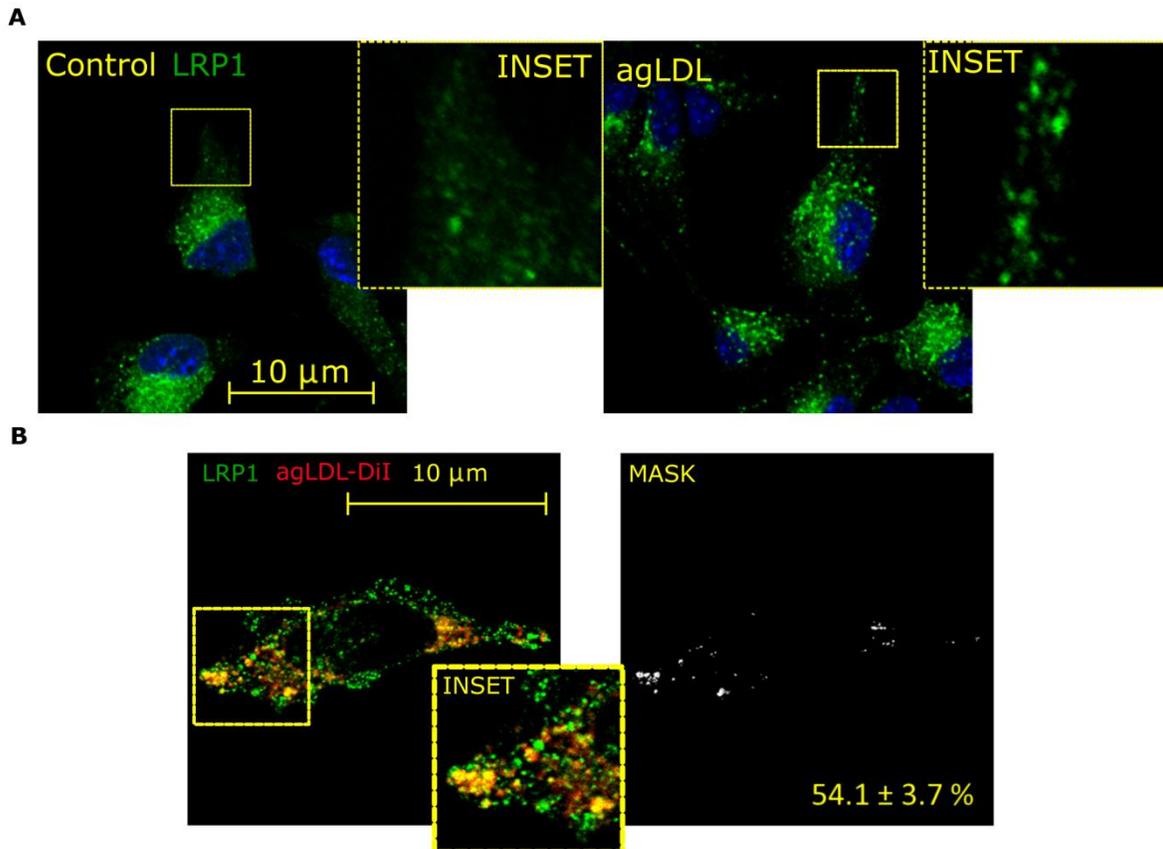
**Figura 35. Análisis de citometría de flujo para determinar la captación de agLDL en células HL-1.** Citometría de flujo de células HL-1 preincubadas o no con GST-RAP 400 nM y tratadas con agLDL-DiI 100 µg/ml durante 8 horas. El gráfico de barras representa la Media ± SEM de la intensidad de fluorescencia media (IFM) correspondientes a DiI en unidades arbitrarias (a.u.), donde ha sido descontada la autofluorescencia. La comparación estadística de las IFM se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Esta evidencia indicaría que la internalización de las agLDL ocurre mayoritariamente a través de la unión a LRP1 en células HL-1.

#### 4.2.4 Efecto de las agLDL en la distribución subcelular de LRP1 en células HL-1.

A partir de los resultados previamente mostrados en el ítem 4.1, demostramos que LRP1 presenta una distribución subcelular en diferentes estructuras vesiculares y compartimentos incluidos, endosomas tempranos, compartimento de reciclado endocítico, compartimentos de *trans*-Golgi, membrana plasmática y vesículas de almacenamiento del receptor denominadas LSVs. Mientras que una proporción muy baja de LRP1 fue localizada en compartimentos de degradación y lisosomas. En esta instancia, fue de interés evaluar la distribución intracelular de LRP1 luego del tratamiento con las agLDL, como así también la localización de estas lipoproteínas modificadas luego de su internalización en las células HL-1. Para ello, las células fueron incubadas con agLDL-DiI 100 µg/ml durante 8 horas, posteriormente fueron inmunomarcadas para la detección de LRP1 y diferentes marcadores de compartimentos intracelulares, y analizadas mediante microscopía confocal. En la Figura 36 A, se muestra que el tratamiento con agLDL modificó la

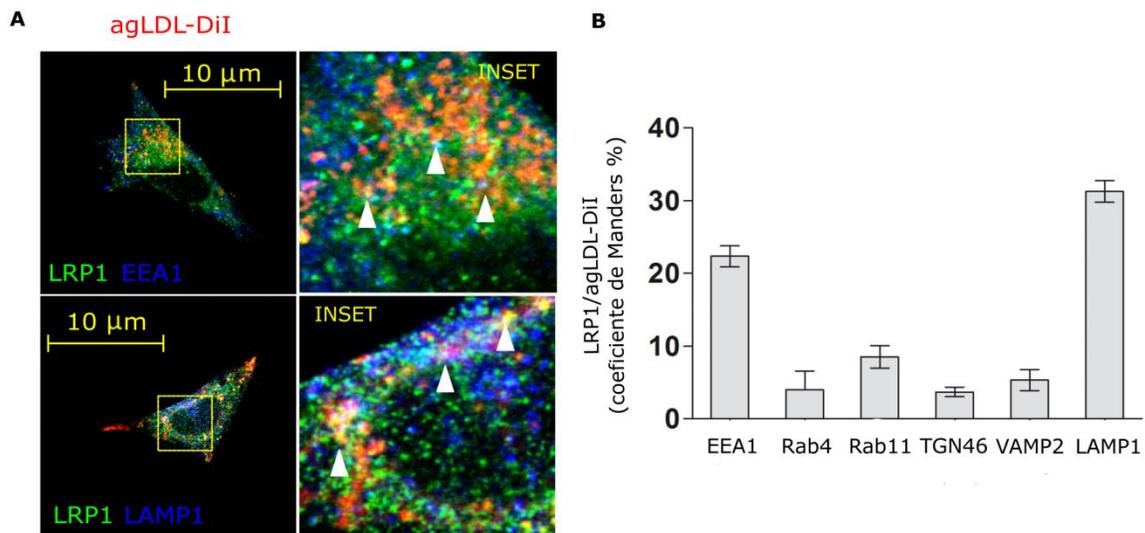
distribución perinuclear típica de LRP1 observada en células sin tratamiento. Además, se encontró que las agLDL-Dil colocalizaron en las mismas estructuras vesiculares junto con LRP1 en una proporción aproximada del 50 % como se puede observar en la Figura 36 B.



**Figura 36. Distribución intracelular de LRP1 en células HL-1 tratadas con agLDL. A)** Microscopía confocal de células HL-1 incubadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas. En verde se observa la distribución subcelular de LRP1. Los INSET representan la ampliación de las regiones enmarcadas en las líneas de puntos color amarilla. Los núcleos celulares fueron marcados con Hoechst. **B)** Microscopía confocal de células HL-1 incubadas o no con agLDL-Dil 100 µg/ml durante 8 horas. En verde se observa la distribución subcelular de LRP1 y el rojo la de agLDL-Dil. El INSET representa la ampliación de la región enmarcada en las líneas de puntos. El MASK representa la imagen binaria en donde se muestra en color blanco los pixeles de colocalización entre las marcas y su respectivo análisis cuantitativo está informado como las Media ± DE de los coeficientes de colocalización de Manders. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 µm.

Posteriormente se analizó la localización de LRP1 y agLDL-Dil en diferentes compartimentos intracelulares. En la Figura 37, se muestra que aproximadamente el ≈20 % de la colocalización ocurría en endosomas tempranos [EEA1+], lo que

era de esperar puesto que la interacción entre las lipoproteínas y LRP1 desencadenan un evento de endocitosis del complejo ligando-receptor. Mientras que, no se encontró colocación importante en compartimentos de reciclado endocítico lento [Rab11+], rápido [Rab4+], en el compartimento de *trans*-Golgi [TGN46+] ni en LSVs. Un hallazgo interesante fue que el tratamiento con las agLDL produjo una redistribución de LRP1 hacia compartimentos de degradación de tipo endosomas tardíos/lisosomas [LAMP1+] en un  $\approx 30\%$  donde, como previamente demostramos, no es habitual encontrar este receptor.

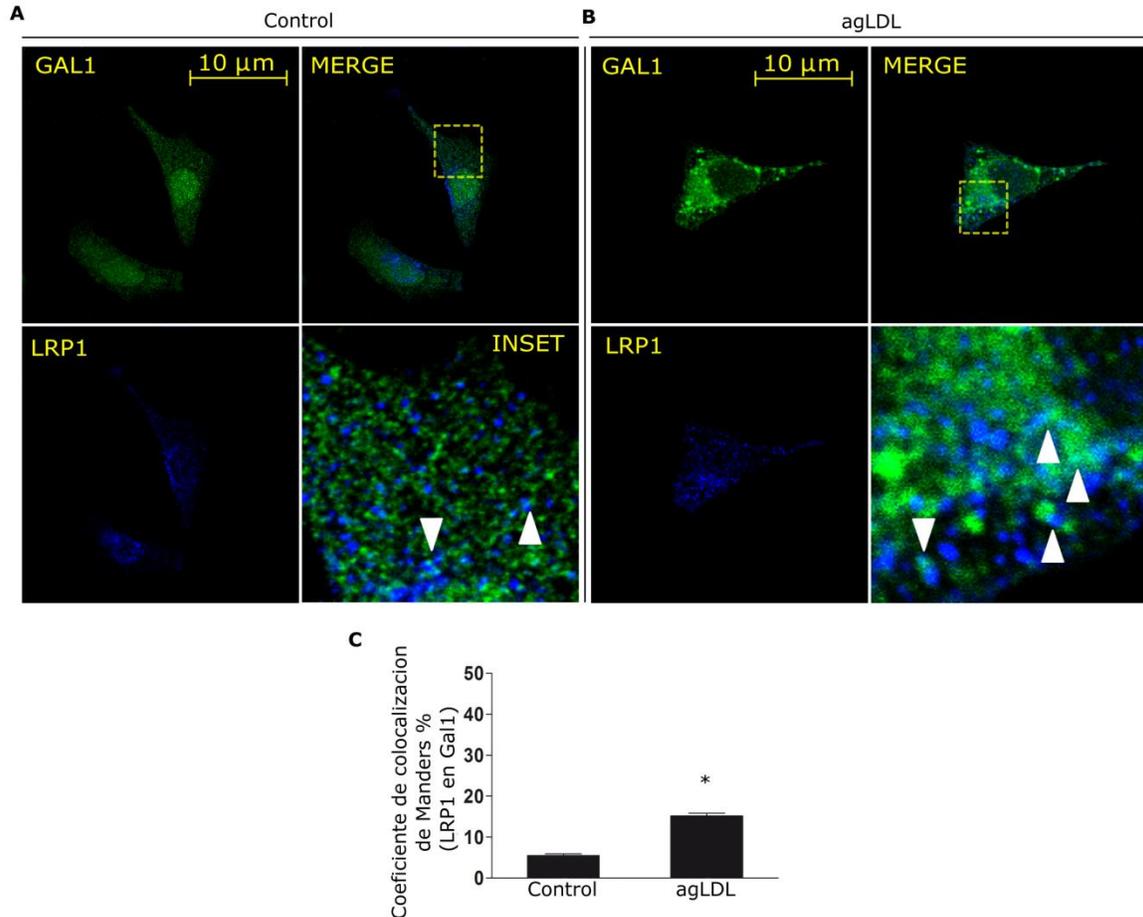


**Figura 37. Colocalización de LRP1 y agLDL-Dil con diferentes marcadores de compartimentos intracelulares en células HL-1.** **A)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal en células HL-1 incubadas con agLDL-Dil 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas para el análisis de colocación entre LRP1 y: endosomas tempranos [EEA1+] (primera fila) y compartimentos de degradación del tipo endosoma tardío/lisosomal [LAMP1+] (segunda fila). El INSET representa la ampliación de las regiones enmarcadas en las líneas de puntos amarilla. Las puntas de flecha blancas indican los sectores de triple colocación. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . **B)** El gráfico de barras representa a la Media  $\pm$  SEM de los coeficientes de colocación de Manders de la triple colocación, obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición.

Esta evidencia sugiere que el tratamiento con las agLDL incrementa la localización de las mismas junto con LRP1 en endosomas tempranos y compartimentos de degradación del tipo endosoma tardío/lisosoma, donde en este último caso no es habitual encontrar a LRP1.

#### **4.2.5 Efecto de las agLDL en la funcionalidad lisosomal en células HL-1.**

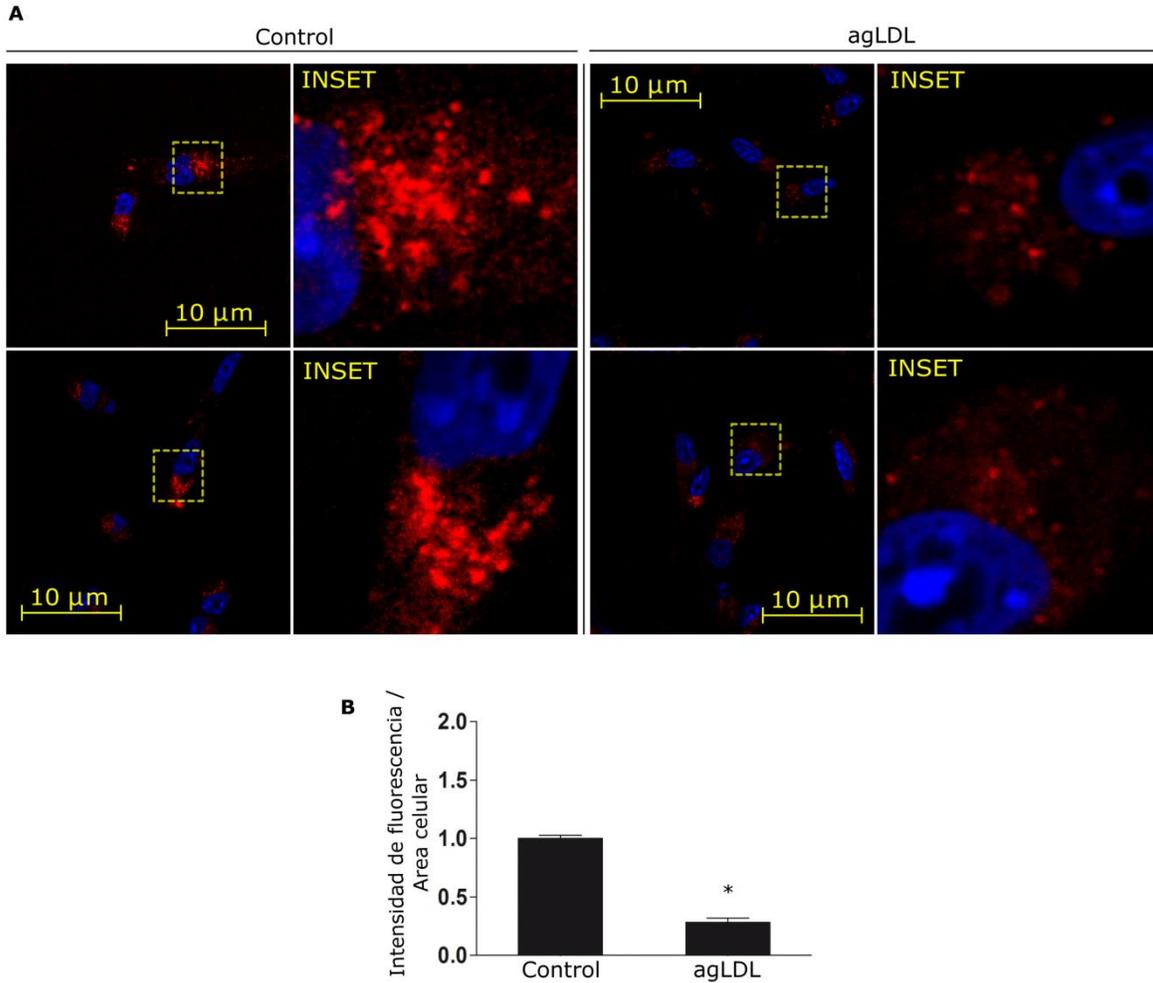
Como se mencionó previamente en los resultados del ítem 4.2.2, el tratamiento con las agLDL durante 8 horas no afectó de manera significativa los niveles de ARNm ni de proteína de LRP1 en las células HL-1. Por otro lado, otros grupos de trabajo han demostrado que estas lipoproteínas modificadas incrementan la expresión de LRP1 como así también su estabilidad a tiempos más prolongados de tratamiento, mayores a 18 horas en VSMCs (Cal y col., 2013). Dado que una importante proporción de LRP1 se localizó en compartimentos de degradación del tipo endosoma tardío/lisosoma luego del tratamiento con agLDL, y que al mismo tiempo las lipoproteínas no modificaron los niveles de este receptor, resultó de interés evaluar la funcionalidad de la vía de degradación lisosomal de estas células luego del tratamiento con las agLDL. Una causa importante de disfuncionalidad lisosomal es la alteración de la permeabilidad de la membrana de dicha organela, una de las formas de estudiar este proceso es mediante un ensayo de microscopía confocal para evaluar el patrón de distribución de galectina 1 (Gal1), ya que la misma es capaz de ingresar a los lisosomas cuando la permeabilidad de los mismos está alterada y reconocer a los  $\beta$ -galactosidos presentes en el lado interno de la membrana lisosomal, mostrando un patrón de distribución en estructuras vesiculares (Aits y col., 2015). De esta manera, las células HL-1 fueron incubadas con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas y posteriormente fueron inmunomarcadas para la detección de Gal1 y LRP1. En la Figura 38, se observan las imágenes de microscopía confocal donde se encontró que en condiciones basales Gal1 presentó un patrón de distribución homogéneo en citoplasma y núcleo en estructuras pequeñas, con una escasa colocalización con LRP1 del  $\approx$ 5%. Luego de la incubación con agLDL, la distribución subcelular de Gal1 se modificó de manera evidente observándose en estructuras vesiculares de mayor tamaño distribuidas en el citoplasma celular, que además contenían LRP1.



**Figura 38. Análisis de la permeabilidad lisosomal a partir de la distribución subcelular de Gal1 en células HL-1 tratadas con agLDL.** **A)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal en células HL-1 incubadas o no con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas para el análisis de colocalización entre LRP1 y Gal1. El *merge* representa la colocalización entre las marcas, donde también se muestran recuadros que corresponden a ampliaciones 4X (INSET). Las puntas de flecha blancas indican los sectores de colocalización. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . **B)** El gráfico de barra representa la Media  $\pm$  SEM de los coeficientes de colocalización de Manders (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran positivas para Gal1), obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados fueron corroborados utilizando DQ<sup>TM</sup> BSA *red*, un sustrato fluorogénico de las proteasas lisosomales. La DQ<sup>TM</sup> BSA *red* no genera señal fluorescente mientras se mantiene su integridad, en los lisosomas es escindida proteolíticamente y se liberan péptidos fluorescentes (618 nm de longitud de onda (color rojo)), que permiten identificar estas organelas. Si el lisosoma es disfuncional y presenta un aumento de la permeabilidad de su membrana estas proteasas son liberadas al citoplasma y por lo tanto la eficiencia para escindir la

DQ<sup>TM</sup> BSA *red* se verá reducida. En base a esto, las células HL-1 fueron incubadas con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas, en presencia de DQ<sup>TM</sup> BSA *red*. La Figura 39, muestra las imágenes de microscopia confocal donde se puede observar que en la condición basal la DQ<sup>TM</sup> BSA *red* se distribuyó en estructuras vesiculares compatibles con lisosomas (Bissig y Gruenberg, 2013; Scott y col., 2014). Mientras que en las células tratadas con las agLDL este patrón de distribución subcelular se vio alterado, observándose una disminución de la intensidad de fluorescencia de la DQ<sup>TM</sup> BSA *red*.



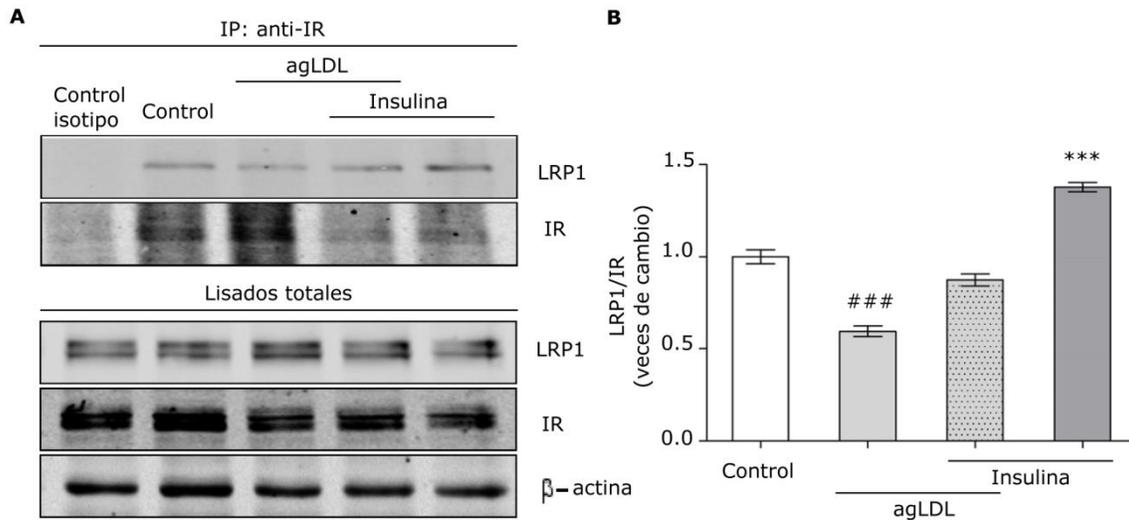
**Figura 39. Análisis de la funcionalidad proteolítica lisosomal a partir de la distribución subcelular de DQ<sup>TM</sup> BSA red en células HL-1 tratadas con agLDL. A)** Microscopía confocal de células HL-1 incubadas o no con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  y DQ<sup>TM</sup> BSA red durante 8 horas. En rojo se observa la fluorescencia de DQ<sup>TM</sup> BSA red. Cada condición es mostrada por duplicado. El INSET representa las ampliaciones de las zonas marcadas con el recuadro en línea de puntos amarillos. La barra de escala corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. **B)** El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia de DQ<sup>TM</sup> BSA red por área celular relativo al control. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *t-Student* para muestras independientes. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Tres experimentos independientes fueron realizados por triplicado y se analizaron 20 células por experimento.

Esta evidencia sugeriría que luego de su internalización las agLDL son transportadas junto con LRP1 hacia los lisosomas. Estas organelas presentaron una aumentada permeabilidad de su membrana lo que sería la causa de la disfunción lisosomal. Esto podría explicar por qué no se observa pérdida de

expresión proteica de LRP1, siendo que este receptor aumenta su localización en estos compartimentos luego del tratamiento con las agLDL.

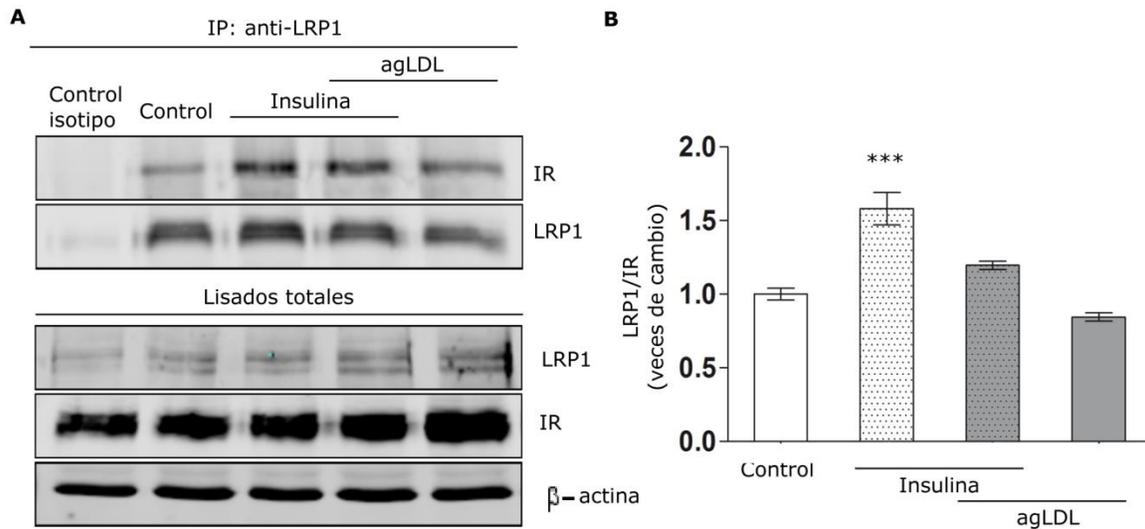
#### **4.2.6 Efecto de las agLDL en la asociación molecular entre LRP1 e IR en células HL-1.**

En base a los resultados previamente mostrados, surgió el interés de estudiar si la incubación con agLDL afectaba la funcionalidad de LRP1 en esta línea celular. En este sentido, en cerebro e hígado ha sido propuesta la asociación molecular entre IR y LRP1, que sería clave para permitir la fosforilación de IR por acción de insulina (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016). Por lo tanto, en esta instancia nos enfocamos en investigar el efecto de las agLDL sobre la asociación entre LRP1 e IR. Para ello las células HL-1 fueron incubadas con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y luego estimuladas con insulina 100 nM por 30 minutos. Posteriormente, se realizó una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IR, seguido de ensayos de *Western blot* para la detección de LRP1. En la Figura 40, se muestra que en condiciones basales existe una asociación molecular entre LRP1 e IR, la cual se vió incrementada bajo el estímulo con insulina. Por el contrario, el tratamiento con las agLDL redujo significativamente esta asociación, la cual fue débilmente reestablecida por la presencia de insulina aunque sin alcanzar el valor de asociación obtenido en las células sin tratar con agLDL.



**Figura 40. Ensayo de inmunoprecipitación de IR para evaluar la asociación molecular con LRP1 en células HL-1 tratadas con agLDL.** **A)** Ensayo de inmunoprecipitación para IR seguido de *Western blot* para el análisis de la subunidad  $\beta$  del LRP1 e IR total. Las células HL-1 fueron incubadas o no con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas y luego estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos. La primera calle corresponde al control de isotipo de inmunoglobulina. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1, IR y  $\beta$ -actina en los lisados celulares totales. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de la detección de LRP1 respecto a IR, como veces de cambio respecto al control (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*\*) y (###) indica incremento y disminución significativas respectivamente ( $p < 0,0001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes.

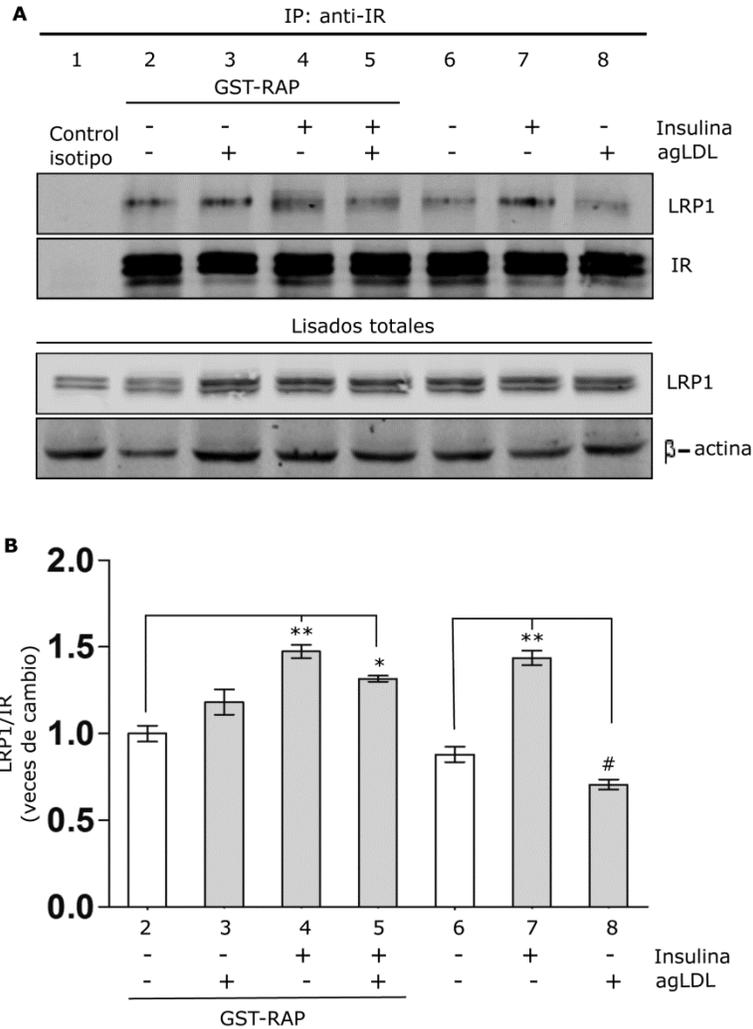
Estos resultados fueron corroborados realizando el mismo ensayo, en las mismas condiciones, pero con la inmunoprecipitación de LRP1 empleando un anticuerpo monoclonal específico anti-subunidad  $\beta$  del LRP1, seguido de ensayos de *Western blot* para la detección de IR. Como se observa en la Figura 41, se obtuvieron resultados similares a los demostrados previamente, donde el estímulo con insulina incrementó significativamente la asociación molecular entre LRP1 e IR, mientras que la presencia de agLDL afectó dicha asociación de ambos receptores bajo el estímulo con insulina.



**Figura 41. Ensayo de inmunoprecipitación de LRP1 para evaluar la asociación molecular con IR en células HL-1 tratadas con agLDL.** **A)** Ensayo de inmunoprecipitación para LRP1 seguido de *Western blot* para el análisis de IR y la subunidad  $\beta$  del LRP1. Las células HL-1 fueron incubadas o no con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y luego estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos. La primera calle corresponde a al control de isotipo de inmunoglobulina. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1, IR y  $\beta$ -actina en los lisados celulares totales. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de la detección de IR respecto a LRP1, como veces de cambio respecto al control (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) respecto al control. Se realizaron tres experimentos independientes.

Por último, para evaluar si el efecto inhibitorio de las agLDL sobre la asociación molecular entre IR y LRP1 estaba mediado por la interacción de las lipoproteínas con LRP1, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación en células HL-1 preincubadas con la proteína chaperona RAP, que como se demostró en el ítem 4.2.3, bloquea la interacción entre las agLDL y LRP1 impidiendo el ingreso de las lipoproteínas al interior celular. Para ello, las células fueron preincubadas con GST-RAP en una concentración de 400 nM durante 30 minutos previos al tratamiento con las lipoproteínas modificadas. Luego fueron incubadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas junto con GST-RAP 400 nM en medio de cultivo celular. Posteriormente, se realizó una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IR, seguido de ensayos de *Western blot* para la detección de LRP1. En la Figura 42, se muestra que GST-RAP inhibió el efecto de las agLDL sobre la asociación molecular entre LRP1 e IR (calle 3) respecto a la situación sin

GST-RAP (calle 8). A su vez, la presencia de esta proteína chaperona también restituyó la respuesta a insulina incrementando la asociación entre LRP1 e IR en presencia de agLDL (calle 5) comparado con las condiciones de estímulo con insulina (calles 4 y 7) y con los resultados mostrados en la Figura 41. Por último, un hallazgo importante que arrojan estos resultados es que la asociación entre LRP1 e IR involucraría la subunidad  $\beta$  transmembrana o intracelular de LRP1, puesto que no vimos alteración significativa de dicha asociación cuando las células fueron incubadas con GST-RAP, que une y bloquea todos los dominios de la subunidad  $\alpha$  de este receptor (calles 2 y 6).



**Figura 42. Efecto de GST-RAP sobre la acción de agLDL en la asociación molecular entre LRP1 e IR en células HL-1. A)** Ensayo de inmunoprecipitación para IR seguido de *Western blot* para el análisis de la subunidad  $\beta$  del LRP1 e IR. Las células fueron preincubadas o no con GST-RAP 400 nM durante 30 minutos previos al ensayo. Luego fueron incubadas o no con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas junto con GST-RAP 400 nM en medio de cultivo celular y posteriormente fueron estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos. La calle 1 corresponde al control de isotipo de inmunoglobulina. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1 y  $\beta$ -actina en los lisados celulares totales. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de la detección de LRP1 respecto a IR, informado como veces de cambio respecto al correspondiente control (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ), (\*) y (#) indican diferencias significativas de incremento o disminución respectivamente ( $p < 0,05$ ) vs. los controles con o sin GST-RAP. Se realizaron tres experimentos independientes.

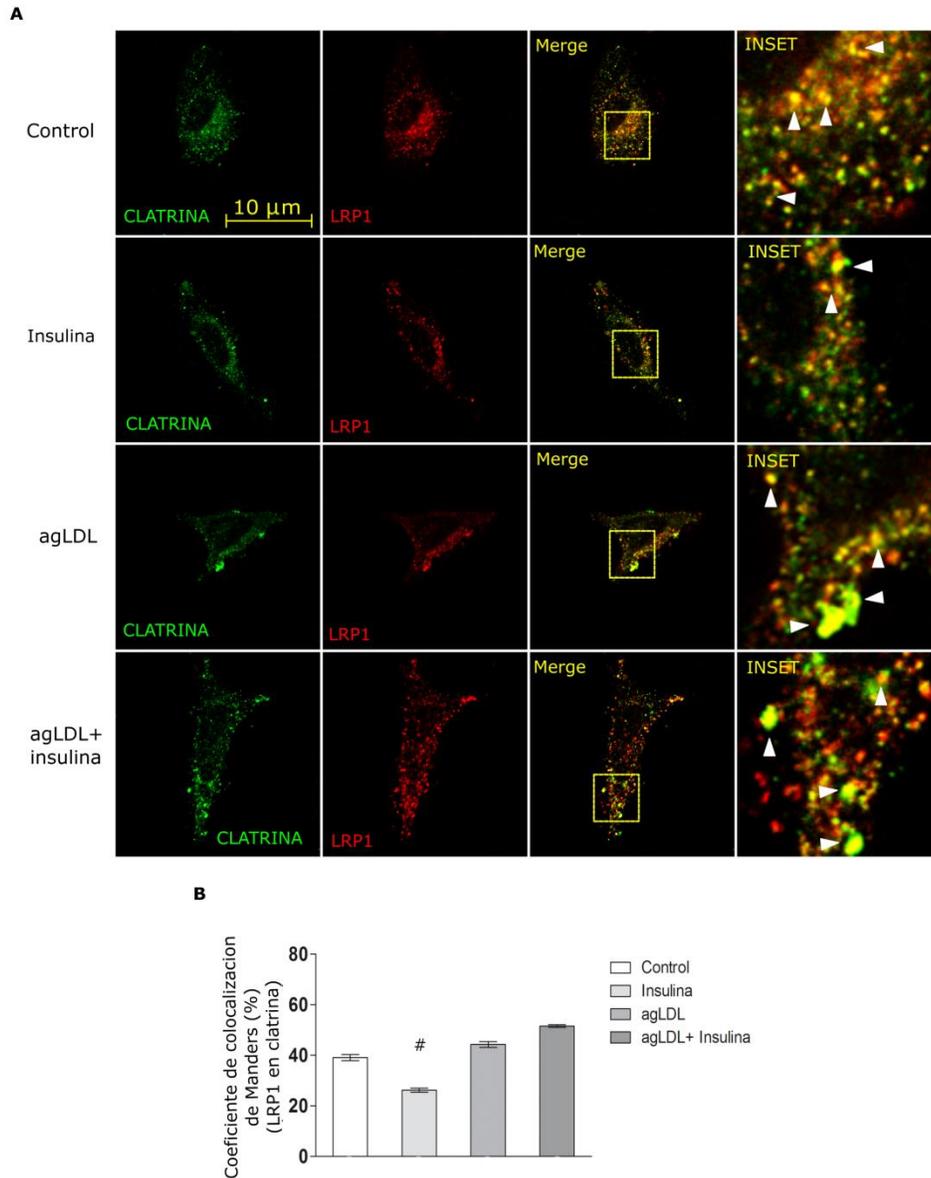
Estos resultados sugieren que en la línea celular HL-1 existe una asociación molecular entre LRP1 e IR, como ha sido descrito en otros tipo celulares. Esta

asociación con IR involucraría la participación de la subunidad  $\beta$  de LRP1 y se ve incrementada por acción de insulina, mientras que dicho efecto se ve alterado por el tratamiento con las agLDL.

#### **4.2.7 Efecto de las agLDL en la distribución de LRP1 e IR en dominios de membranas enriquecidas en clatrina o caveolina en células HL-1.**

Tal como se mencionó en la Introducción del presente trabajo de tesis, en gran parte de los sistemas celulares estudiados, el LRP1 se localiza principalmente en dominios de membranas ricos en clatrina e internaliza a la mayoría de sus ligandos mediante endocitosis mediada por esta vía (May y col., 2005; Lillis y col., 2008). Por su parte, ha sido descrito que el IR se ubica en dominios de la membrana plasmática ricos en colesterol o de tipo *lipid rafts/caveolae*, y es desde allí donde se activa la cascada de señalización corriente abajo de IR por acción de insulina (Delint-Ramirez y col., 2015). Existe evidencia que, bajo ciertas condiciones como el estímulo con insulina, el LRP1 se localiza de manera transitoria en regiones de tipo *lipid rafts/caveolae* (Zhang y col., 2004). Este evento favorecería la asociación molecular entre LRP1 e IR y por ende la activación de la cascada de señalización de insulina. Teniendo en cuenta que en células HL-1 se desconoce en qué regiones de membrana plasmática se ubica LRP1, como así también si la insulina o las agLDL afectan esa localización, resultó de interés el estudio de la distribución de LRP1 en regiones celulares ricas en clatrina y caveolina en condiciones de ausencia y presencia tanto de insulina como de agLDL. Para ello, las células fueron incubadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y luego estimuladas con insulina 100 nM por 30 minutos. Posteriormente, se realizó una inmunodetección de LRP1 y clatrina o caveolina para su análisis por microscopia confocal. En la Figura 43, se muestra la distribución intracelular de LRP1 y clatrina, donde en una situación basal o control, el LRP1 se localizó en regiones positivas para clatrina en un  $\approx 40\%$ , que además de corresponder a dominios de la membrana plasmática podrían tratarse de otros compartimentos

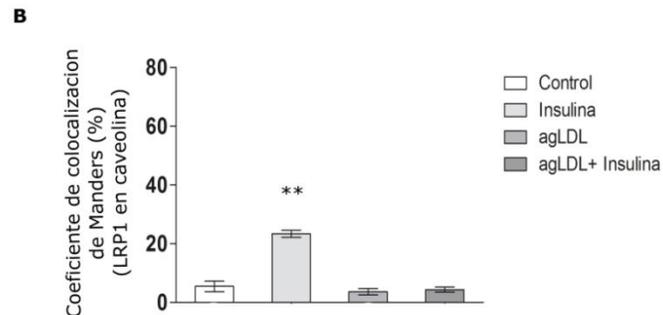
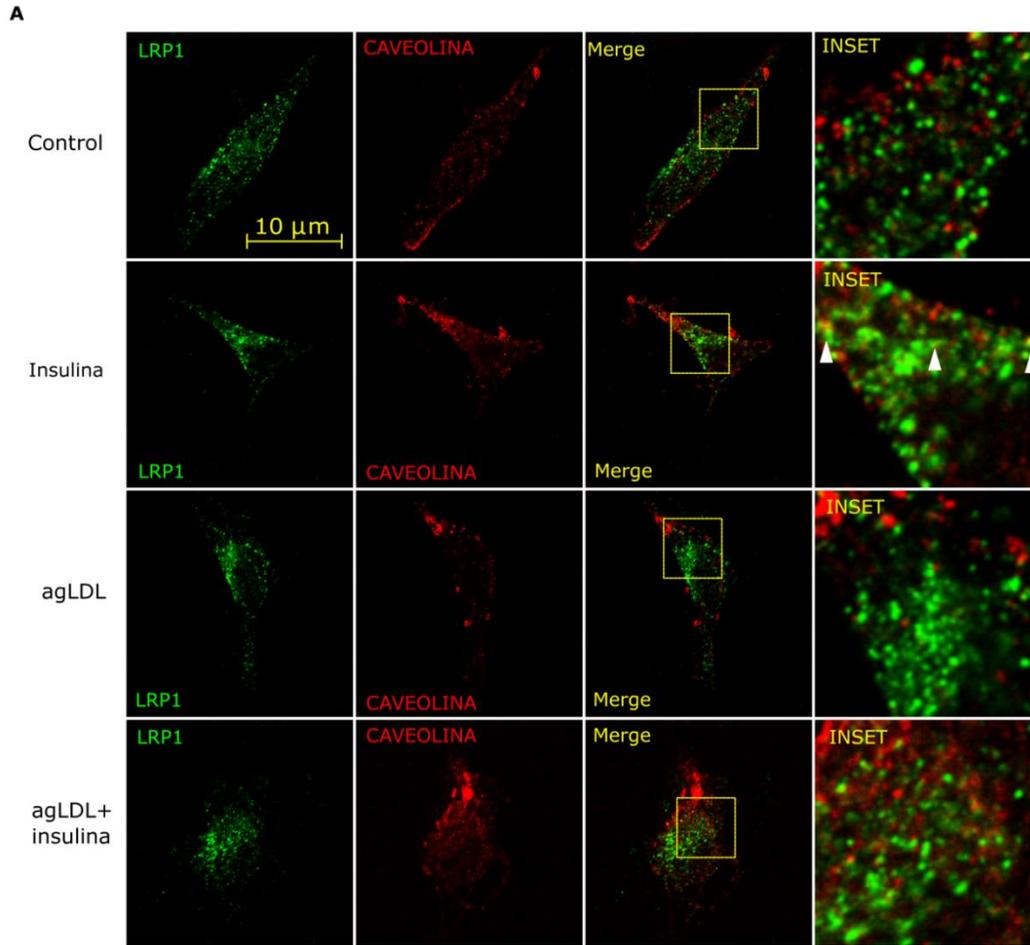
como el *trans*-Golgi o endosomas tempranos. Luego del estímulo con insulina la colocalización entre ambas marcas se redujo de manera significativa a un  $\approx 26$  %. Por otra lado, frente a la situación de tratamientos con las agLDL se vió que la localización de LRP1 en regiones ricas en clatrina fue de un  $\approx 44$  %, lo que no fue sustancialmente modificado por acción de insulina donde se encontró un porcentaje de colocalización del  $\approx 51$  %.



**Figura 43. Colocalización de LRP1 y clatrina en células HL-1 tratadas con agLDL e insulina.**

**A)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal en células HL-1 incubadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos para el análisis de colocalización entre LRP1 (rojo) y clatrina (verde). El *Merge* representa la imagen de colocalización entre ambas marcas. El *INSET* representa la ampliación de la región enmarcada en las líneas de puntos. Las puntas de flecha blancas indican los sectores de colocalización. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 µm. **B)** El gráfico de barras representa la Media ± SEM de los coeficientes de colocalización de Manders (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran positivas para clatrina), obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía, (<sup>#</sup>) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) vs. control.

Posteriormente se procedió a realizar el mismo análisis pero sobre la distribución de LRP1 en regiones celulares ricas en caveolina. En la Figura 44, se puede observar la distribución intracelular de LRP1 y caveolina, donde en una condición basal o control, el LRP1 se localizó de manera escasa en regiones positivas para caveolina en un  $\approx 5\%$ , a diferencia de lo encontrado para clatrina. No obstante, luego del estímulo con insulina la colocalización entre ambas proteínas incrementó de manera significativa a un  $\approx 23\%$ . Bajo el tratamiento con las agLDL no se vieron diferencias significativas respecto al control ( $\approx 3\%$ ). Para la condición de tratamiento con las agLDL y estímulo con insulina se encontró un porcentaje de colocalización del  $\approx 4\%$ , lo que representó una disminución de la presencia de LRP1 en regiones ricas en caveolina respecto a la condición de estímulo con insulina.

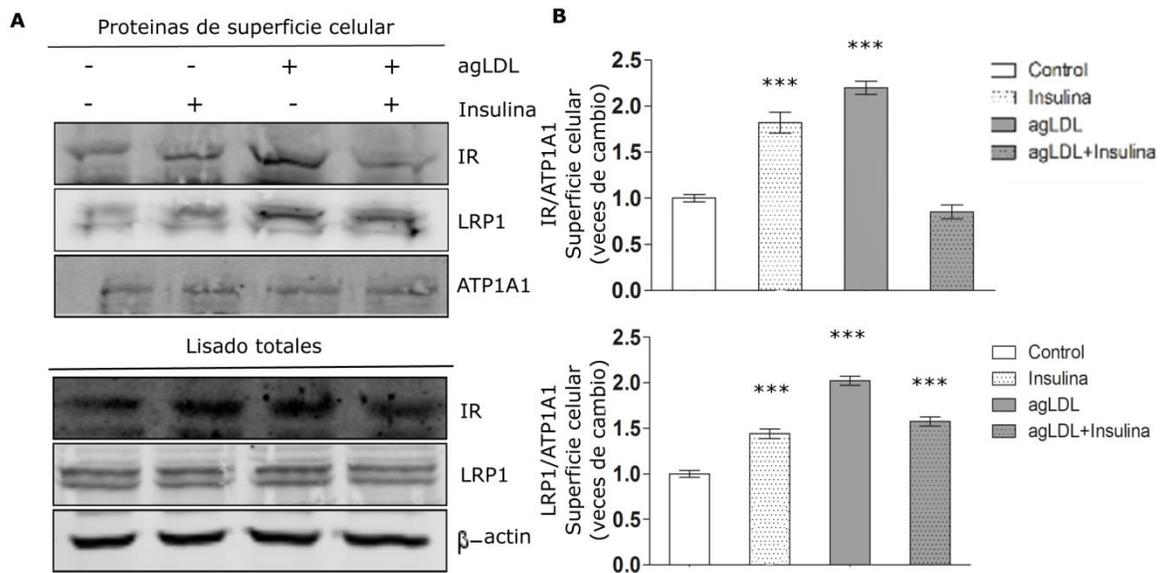


**Figura 44. Colocalización de LRP1 y caveolina en células HL-1 tratadas con agLDL e insulina. A)** Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal en células HL-1 incubadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos para el análisis de colocalización entre LRP1 (verde) y caveolina (rojo). El *Merge* representa la imagen de colocalización entre ambas marcas. El *INSET* representa la ampliación de la región enmarcada en las líneas de puntos. Las puntas de flecha blancas indican los sectores de colocalización. Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 µm. **B)** El gráfico de barras representa la Media ± SEM de los coeficientes de colocalización de Manders (proporción de vesículas que contenían LRP1 y eran positivas para caveolina), obtenidos a partir de las cuantificaciones realizadas en al menos 20 células por condición. La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía, (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) vs. control.

Esta evidencia sugeriría que tras el estímulo con insulina LRP1 se localiza en regiones celulares ricas en caveolina. Mientras que, el tratamiento con las agLDL incrementaría la localización del receptor en regiones ricas en clatrina, lo que no fue revertido por acción de la hormona. Estos resultados podría explicar el efecto de las agLDL sobre la asociación entre LRP1 e IR al redistribuir a LRP1 hacia dominios ricos en clatrina y no hacia *lipid rafts/caveolae* como si lo hace insulina, afectando de esta manera las posibilidades de interacción con el IR.

#### **4.2.8 Efecto de las agLDL en la expresión de LRP1 e IR en la membrana plasmática en células HL-1.**

Dado que en resultados previos del ítem 4.1.3 demostramos que insulina es capaz de promover la movilización de LRP1 hacia la membrana plasmática por activación de la vía de señalización intracelular inducida por insulina, surgió el interés de evaluar si el tratamiento con las agLDL afectaba la expresión de LRP1 e IR en la superficie celular en células HL-1. Para ello, se realizó un ensayo de biotilación de proteínas de superficie seguida de la precipitación de proteínas biotiladas y análisis por *Western blot*, en células tratadas con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM durante 30 minutos. En la Figura 45, se muestra que tanto la insulina como las agLDL incrementaron de manera significativa la expresión de IR en la membrana plasmática respecto al control, sin embargo el estímulo con insulina en células tratadas con agLDL produjo un efecto opuesto disminuyendo la expresión de IR en la superficie celular. Cuando se analizó la expresión de LRP1 en la membrana plasmática se encontró que tanto con insulina, agLDL como también en la condición de estímulo con insulina en células tratadas con agLDL, se produjo incremento de la expresión de LRP1 en la superficie celular de manera significativa respecto al control.



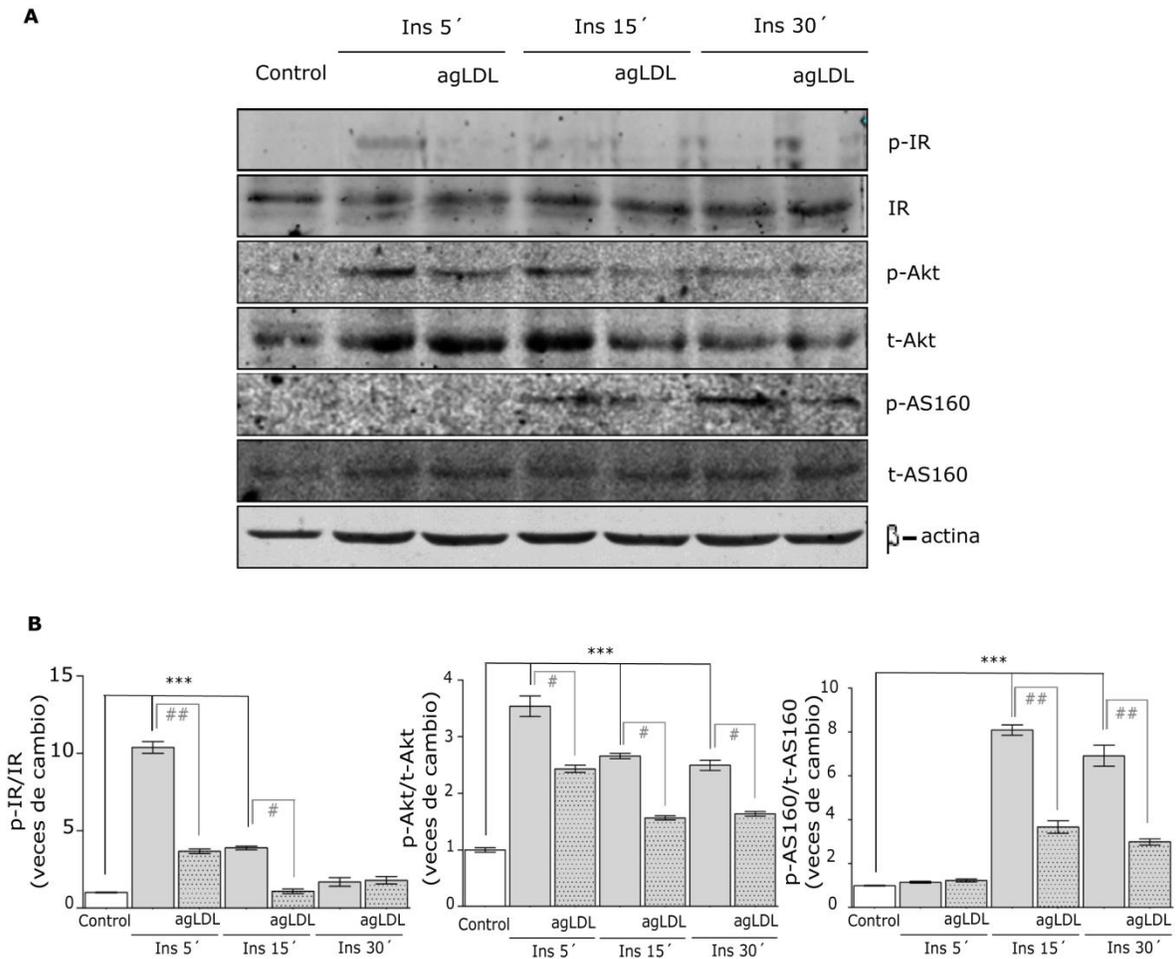
**Figura 45. Análisis de la expresión de LRP1 e IR en la membrana plasmática de células HL-1 tratadas con agLDL e insulina. A)** Ensayo de biotilación de proteínas de superficie para la detección de LRP1 e IR. Ambas proteínas de superficie celular biotiladas, provenientes de extractos proteicos luego de un ensayo de incubación con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas y posterior estimulación con insulina 100 nM durante 30 minutos, fueron precipitadas mediante incubación con *beads*-estreptavidina. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de LRP1 e IR en los lisados totales donde se ofreció el 20% de la carga proteica destinada a la incubación con *beads*. Se utilizaron ATP1A1 y  $\beta$ -actina como controles de carga proteica. **B)** Los gráficos de barras representan la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a ATP1A1) de las bandas correspondientes a LRP1 e IR de superficie celular para las diferentes condiciones, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). Se realizaron tres experimentos independientes.

Esta evidencia indica que la insulina y las agLDL aumentan la expresión de LRP1 e IR en la superficie celular. Sin embargo, en la condición de células tratadas con agLDL y estimuladas con insulina se ven efectos opuestos para estos receptores, encontrándose un incremento en la expresión de LRP1 y una disminución en la expresión de IR en la superficie celular.

#### 4.2.9 Efecto de las agLDL en la cascada de señalización intracelular inducida por insulina en células HL-1.

En base a los resultados previamente mostrados, resultó de interés evaluar si las agLDL al afectar la asociación molecular entre LRP1 e IR podían tener consecuencias en la señalización intracelular inducida por insulina en las células

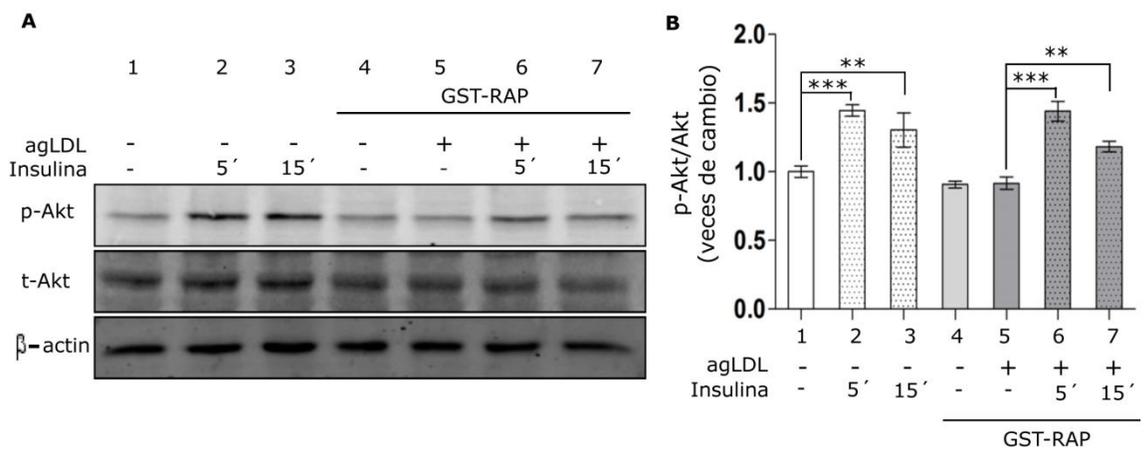
HL-1. Para ello, las células fueron tratadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y estimuladas con insulina 100 nM durante 5 a 30 minutos. La activación de la cascada de señalización intracelular inducida por insulina fue evaluada mediante un ensayo de *Western blot* para la detección de la fosforilación de IR (p-IR) y de otros intermediarios involucrados en esta vía como ser Akt (p-Akt) y AS160 (p-AS160). De esta manera, en la Figura 46, se puede observar que el tratamiento con las agLDL redujo de manera significativa la fosforilación de IR a tiempos cortos de estímulo con insulina de 5 minutos, a partir del cual también se vio afectada corriente abajo la fosforilación de Akt y AS160 inducida por insulina.



**Figura 46. Evaluación del nivel de fosforilación de IR, Akt y AS160 inducida por insulina en células HL-1 tratadas con agLDL.** **A)** Ensayo de *Western blot* para el análisis de los niveles de fosforilación de IR (p-IR), Akt (p-Akt) y AS160 (p-AS160) y de sus correspondientes niveles proteicos totales en células HL-1 tratadas o no con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM durante 5 a 30 minutos. Se utilizó la inmunodetección de  $\beta$ -actina como control de carga proteica. **B)** Los gráficos de barras representan la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media  $\pm$  SEM de la intensidad relativa de p-IR/IR, p-Akt/t-Akt o p-AS160/t-AS160, informado como veces de cambio respecto a al condición control (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través del test *Anova* de una vía. (#) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y (##) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre las condiciones indicadas. (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs. control. Se realizaron tres experimentos independientes.

Posteriormente evaluamos si el efecto de las agLDL sobre la señalización intracelular inducida por insulina podía ser revertido mediante la incubación con GST-RAP. Para ello, se realizaron experimentos similares a los anteriormente mostrados, donde las células fueron preincubadas con GST-RAP en una concentración de 400 nM durante 30 minutos previos al tratamiento con las lipoproteínas modificadas. Luego, las células fueron incubadas con agLDL 100

µg/ml durante 8 horas junto con GST-RAP 400 nM en medio de cultivo celular y estimuladas con insulina 100 nM durante 5 y 15 minutos. A través de ensayos de *Western blot* se evaluó la activación de la cascada de señalización intracelular mediante el análisis de la fosforilación de Akt. En la Figura 47, se muestra que la incubación con GST-RAP (calle 4) no afectó la fosforilación de Akt respecto al control sin estímulo (calle 1). Por otro lado, la presencia de la proteína chaperona permitió restablecer la respuesta a la insulina, observada como un incremento significativo de la fosforilación de Akt a los tiempos de 5 y 10 minutos (calles 6 y 7), en comparación a lo demostrado anteriormente bajo el tratamiento con las agLDL como se mostró en la Figura 46.

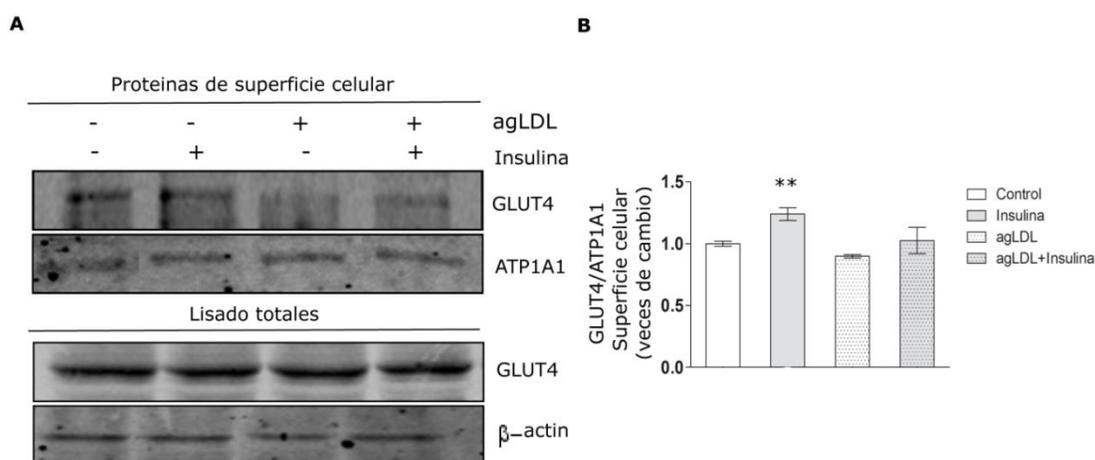


**Figura 47. Evaluación del nivel de fosforilación de Akt inducida por insulina en células HL-1 tratadas con GST-RAP y agLDL.** **A)** Ensayo de *Western blot* para el análisis de los niveles de fosforilación de Akt (p-Akt) y Akt total (t-Akt) en células HL-1 preincubadas o no con GST-RAP 400 nM durante 30 minutos, tratadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM durante 5 y 15 minutos. Se utilizó la inmunodetección de β-actina como control de carga proteica. **B)** El gráfico de barras representa la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas en el *Western blot*. Los valores se expresaron como la Media ± SEM de la intensidad relativa de p-Akt/t-Akt, informados como veces de cambio respecto a los correspondientes controles (calles 1 y 5). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través del test *Anova* de una vía. (\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) y (\*\*\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs. los controles indicados. Se realizaron tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que las agLDL tiene un efecto inhibitorio en la activación de la señalización intracelular inducida por insulina en las células HL-1, lo que podría estar relacionado con la pérdida de asociación molecular con IR que presenta LRP1 luego de su interacción con las agLDL.

#### 4.2.10 Efecto de las agLDL en la expresión de GLUT4 en la membrana plasmática en células HL-1.

Como se mencionó en la Introducción del presente trabajo de tesis, la cascada de señalización intracelular inducida por insulina finalmente lleva a la movilización de GLUT4 hacia la membrana plasmática, incrementando la expresión de este transportador en la superficie celular lo que favorece la captación de glucosa (Leto y Saltiel, 2012). Por lo tanto, resultó de interés evaluar el efecto de las agLDL en la expresión de GLUT4 a nivel de la superficie celular mediante un ensayo de biotilación de proteínas de superficie seguido de un análisis por *Western blot*. De esta manera, las células HL-1 fueron tratadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y estimuladas con insulina 100 nM durante 30 minutos. En la Figura 48, se puede observar que el estímulo con insulina incrementó de manera significativa la expresión de GLUT4 en la membrana plasmática, mientras que este efecto fue bloqueado por el tratamiento con las agLDL.

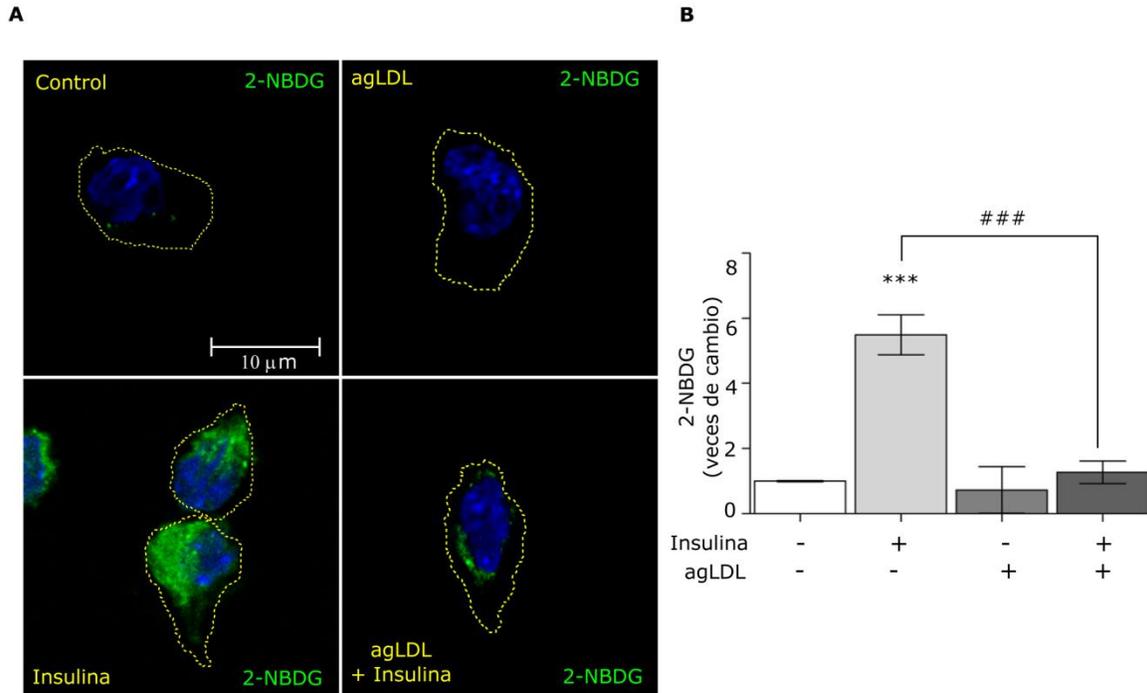


**Figura 48. Análisis de los niveles de expresión de GLUT4 en membrana plasmática en células HL-1 tratadas con agLDL e insulina.** **A)** Ensayo de biotilación de proteínas de superficie para la detección de GLUT4 biotilado, proveniente de extractos proteicos luego de un ensayo de incubación con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y posterior estimulación con insulina 100 nM durante 30 minutos, y posteriormente precipitado mediante incubación con *beads*-estreptavidina. En el panel inferior del *Western blot* se muestra la detección de GLUT4 en los lisados celulares totales donde se ofreció el 20% de la carga proteica destinada a la incubación con los *beads*. Se utilizaron ATP1A1 y  $\beta$ -actina como controles de carga proteica. **B)** El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de las densidades ópticas (D.O.) relativas (respecto a ATP1A1) de las bandas correspondientes a GLUT4 en la superficie celular para las diferentes condiciones, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). Se realizaron tres experimentos independientes.

Estos resultados permiten corroborar el efecto de insulina sobre la expresión de GLUT4 en la superficie celular, y demuestran a su vez que las agLDL afectan la exocitosis de este transportador hacia la membrana plasmática probablemente debido a la alteración en la señalización intracelular inducida por insulina que generan, según lo demostrado en el ítem 4.2.9.

#### **4.2.11 Efecto de las agLDL sobre la captación de glucosa en células HL-1.**

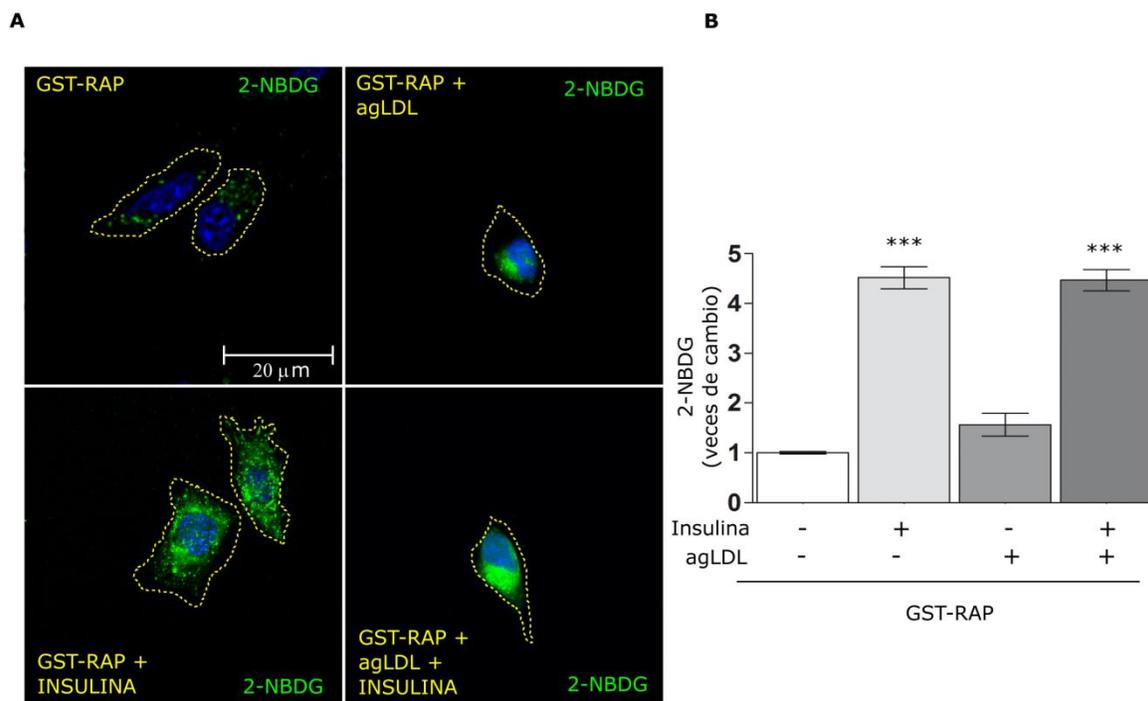
Considerando que las agLDL afectan el tráfico de GLUT4 inducida por insulina hacia la membrana plasmática, en esta etapa se procedió a evaluar el efecto de las agLDL sobre la captación de glucosa en células HL-1. Para ello, las células fueron tratadas con agLDL 100  $\mu\text{g/ml}$  durante 8 horas y estimuladas con insulina 100 nM por 30 minutos. Además conjuntamente con el estímulo de insulina, se agregó 2-NBDG (80 $\mu\text{M}$ ), un análogo fluorescente de la glucosa, durante 30 minutos. La Figura 49, muestra que el estímulo con insulina incrementó de manera significativa la captación de 2-NBDG, mientras que el tratamiento con las agLDL no produjo cambios importantes respecto a la situación control. No obstante, en la condiciones de células tratadas con las agLDL se encontró una disminución significativa de la captación de 2-NBDG en respuesta a insulina.



**Figura 49. Ensayo de captación de 2-NBDG en células HL-1 tratadas con agLDL e insulina.** **A)** Microscopía confocal de células HL-1 incubadas o no con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas y estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos, conjuntamente con 2-NBDG 80µM (verde). Las imágenes son representativas de al menos 15 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 10 µm. **B)** El gráfico de barras representa la Media ± SEM de la intensidad de fluorescencia de 2-NBDG por área celular, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs control y (###) Indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs insulina. Se realizaron tres experimentos independientes.

Finalmente, se evaluó si el efecto inhibitorio de las agLDL sobre la captación de glucosa inducida por insulina en estas células podía ser revertido mediante la incubación con GST-RAP. Para ello, se realizaron experimentos de microscopía confocal similares a los anteriormente mostrados, donde las células fueron preincubadas con GST-RAP 400 nM durante 30 minutos previos al tratamiento con las lipoproteínas modificadas. Luego, las células fueron incubadas con agLDL 100 µg/ml durante 8 horas junto con GST-RAP 400 nM en el medio de cultivo celular, y estimuladas con insulina 100 nM durante 30 minutos en presencia de 2-NBDG 80µM. En la Figura 50, se muestra que la incubación con GST-RAP permitió recuperar la respuesta a la insulina, observada como un incremento significativo de la captación de 2-NBDG, que había sido afectada por el tratamiento con las

agLDL, como se encontró en los resultados anteriormente mostrados en la Figura 49.



**Figura 50. Ensayo de captación de 2-NBDG en células HL-1 preincubadas con GST-RAP. A)** Microscopía confocal de células HL-1 preincubadas con GST-RAP 400 nM y tratadas o no con agLDL 100  $\mu$ g/ml durante 8 horas. Luego las células fueron estimuladas o no con insulina 100 nM por 30 minutos, conjuntamente con 2-NBDG 80 $\mu$ M (verde). Las imágenes son representativas de al menos 20 células por condición, provenientes de tres experimentos independientes. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m. **B)** El gráfico de barras representa la Media  $\pm$  SEM de la intensidad de fluorescencia de 2-NBDG por área celular, expresadas como veces de cambio respecto al control sin estímulo (barra blanca). La comparación estadística de las medias se llevó a cabo a través de la prueba *Anova* de una vía. (\*\*\*) Indica diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) vs control. Se realizaron tres experimentos independientes.

Esta evidencia sugiere que la internalización de las agLDL mediante LRP1 es capaz de afectar la captación de glucosa en células HL-1.

#### **4.2.12 Principales conclusiones de la sección 4.2**

Los resultados detallados en esta sección permitieron demostrar la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a insulina, y como este evento es afectado por las agLDL en células HL-1. Se concluyó que i) el tratamiento con agLDL durante 8 horas produjo una acumulación significativa de CE en estas células, sin la formación evidente de *lipid droplet* ii) la captación de estas lipoproteínas modificadas fue mediada por la interacción de las mismas con LRP1, ya que este efecto fue bloqueado por GST-RAP; iii) la interacción entre las agLDL y LRP1 generó cambios significativos en la distribución subcelular del receptor, incrementando su localización en compartimentos de degradación del tipo endosomas tardíos o lisosomas, los cuales resultaron ser disfuncionales; iv) la alteración en la distribución subcelular de LRP1 producida por las agLDL, afectó su localización en dominios de membranas ricas en caveolina por acción de insulina y por ende su interacción con IR; v) las agLDL afectaron la activación de la cascada de señalización intracelular inducida por insulina y vi) finalmente, se encontró una reducción de la exocitosis hacia la membrana plasmática de GLUT4 y una menor captación de glucosa por acción de insulina en los cardiomiocitos expuestos a agLDL. Por lo tanto, concluimos que LRP1 es un regulador clave de la respuesta a la insulina en células HL-1, siendo su acción afectada por agLDL.

# **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de la distribución y tráfico intracelular de LRP1 regulado por insulina

El LRP1 es un receptor clave para la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos en diversos tejidos y tipos celulares (Herz y Strickland, 2001; Lillis y col., 2008). Además de su función endocítica, LRP1 también participa de la regulación de eventos de señalización intracelular y es capaz de asociarse y regular el transporte hacia la superficie celular de diferentes proteínas y receptores transmembrana, como ser el caso de la expresión del IR en la membrana plasmática en neuronas y hepatocitos (Liu y col., 2015, Ding y col., 2016). Varias actividades del LRP1 están relacionadas con su nivel de expresión en la superficie celular, que depende en mayor medida de la relación endocitosis / reciclado de este receptor (Ferrer y col., 2016; Barcelona y col., 2013; Gonias y col., 2011). Ha sido demostrado, que la presencia de insulina favorece la expresión de LRP1 en la membrana plasmática de hepatocitos, entre otras células, y que este evento es clave para la respuesta intracelular inducida por esta hormona (Laatsch y col., 2009; Ding y col., 2016). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cómo ocurre el tráfico intracelular de LRP1 hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina, y es menos todavía lo que se conoce en relación a cómo la alteración de este tráfico de LRP1 puede afectar la respuesta intracelular inducida por la hormona. En este sentido, algunos hallazgos aportados por otros grupos de investigación, demostraron que la ausencia de LRP1 en hepatocitos y neuronas, por supresión dirigida del gen de *lrp-1*, altera de manera significativa la señalización intracelular inducida por insulina, como así también la captación de glucosa en estas células (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016).

Una característica importante a tener en cuenta a la hora de estudiar el tráfico intracelular de LRP1, es la versatilidad funcional de este receptor, dada no solo por la expresión prácticamente ubicua de LRP1, sino también por su capacidad de interactuar con una gran variedad de ligandos, de asociarse con otros

receptores de transmembrana y de unir diferentes proteínas adaptadoras a través de su dominio intra-citoplasmático (Lillis y col., 2008). La regulación de la actividad de LRP1 depende, además del tipo celular donde se expresa y de su naturaleza de receptor multiligando, de su distribución y dinámica dentro de la célula. Por ello, es de esperar que el transporte intracelular del receptor resulte clave para sus funciones biológicas.

En el presente trabajo de tesis se demostró que en células MIO-M1, LRP1 presentó una localización principalmente intracelular con un patrón de distribución característico observado en la mayoría de las células donde este receptor se expresa, en el cual LRP1 se localizó en estructuras tubulares y vesiculares de distribución perinuclear. Gran parte de estas estructuras correspondieron a endosomas tempranos, compartimentos de reciclado endocítico rápido y lento, y a compartimento de *trans*- Golgi. Es importante destacar que una baja proporción de LRP1 se localizó en endosomas tardíos, lo que concuerda con la evidencia provista por otros grupos de investigación que demuestra que al menos la subunidad  $\beta$  de este receptor se degrada principalmente por vía proteasomal (Melman y col., 2002; Ceschin y col., 2009). Luego del estímulo con insulina se encontró un aumento significativo de la localización de LRP1 en endosomas tempranos y en compartimentos de reciclado rápido entre los 15-30 minutos posteriores al estímulo, lo que sería indicativo que la insulina favorece la endocitosis del receptor, como así también su retorno a través del reciclado endocítico rápido hacia la membrana plasmática. Este tráfico de LRP1 por acción de insulina podría estar relacionado con la necesidad de mantener los niveles de este receptor en la superficie celular en células MIO-M1 estimuladas con esta hormona.

En la mayoría de los tipos celulares, la proporción de LRP1 que se localiza a nivel de la membrana plasmática es considerablemente menor en relación a la que se encuentra a nivel intracelular (Moestrup y col., 1990; Ferrer y col., 2014). Sin embargo, ha sido demostrado que luego del estímulo postprandial de insulina se incrementan los niveles de expresión de LRP1 en membrana plasmática en hepatocitos y células adiposas, lo que se asocia con una mayor capacidad para

interaccionar y depurar de la circulación sanguínea diferentes lipoproteínas ricas en apolipoproteína E (Laatsch y col., 2009; Ding y col., 2016). Por su parte, en células MIO-M1, demostramos que insulina efectivamente incrementó de manera significativa los niveles de LRP1 en la superficie celular a los 30 minutos de estímulo. Este tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática por acción de insulina en este tipo celular podría ser explicado por al menos dos mecanismos: 1- Por aporte del reciclado endocítico rápido, ya que resultados de este trabajo de tesis han demostrado que luego del estímulo con insulina, se produjo un incremento significativo de la localización de LRP1 en compartimentos de reciclado endocítico rápido [Rab4 +] y 2- por movilización de vesículas de almacenamiento intracelular de LRP1, puesto que, demostramos que insulina es capaz de incrementar los niveles de mLRP4-GFP-HA en la superficie celular desde compartimentos intracelulares de almacenamiento de este receptor quimérico constructo en células MIO-M1 luego de 30 minutos de estímulo. Este hallazgo indicaría que el aumento de la expresión de LRP1 en la membrana plasmática por acción de insulina no sería consecuencia solo del incremento en la tasa de reciclado endocítico del receptor, sino que también se debería al aporte del tráfico exocítico del mismo desde vesículas de almacenamiento intracelular de LRP1. En este sentido, ha sido demostrado en adipocitos y células musculares que LRP1 forma parte de vesículas denominadas GSVs que también almacenan otras proteínas como sortilin y VAMP2 además de GLUT4, y donde LRP1 es una de las proteínas constitutivas mayoritarias (Bogan y col., 2010; Jedrychowski y col., 2010). Ante el estímulo con insulina estas vesículas son rápidamente transportadas hacia la membrana plasmática con la cual se fusionan e incrementan la expresión de GLUT4 para la captación de glucosa extracelular (Bogan y Kandror, 2010; Kupriyanova y col., 2002). En el presente trabajo de tesis, demostramos la existencia de vesículas intracelulares que almacenan LRP1 en las células MIO-M1, a partir de las cuales se produciría la exocitosis del mismo por acción de insulina en estas células. Estas vesículas, denominadas aquí como LSV (del inglés *LRP1 storage vesicles*), presentaron un tamaño aproximado de 100 nm y una distribución perinuclear en condiciones basales en estas células. No

obstante, luego del estímulo con insulina estas estructuras se relocalizaron hacia zonas más periféricas de las células. Un aspecto interesante es que el proceso de formación de estas vesículas podría implicar la donación de membrana desde el compartimento de *trans*-Golgi, ya que mediante la evaluación de la ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión encontramos que estas vesículas presentaban una cobertura electrodensa compatible con cubiertas de clatrina (Leto y Saltiel, 2012; Robinson, 2015). Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para explicar los motivos de la formación dinámica de estas vesículas en células gliales de Müller.

Resumiendo, el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática inducido por insulina ocurriría a través del aporte del reciclado endocítico rápido desde endosomas tempranos y de la exocitosis regulada del receptor desde vesículas intracelulares preformadas o LSV.

Ha sido ampliamente demostrado, que insulina es capaz de activar la vía de señalización intracelular mediada por intermediarios moleculares como PI<sub>3</sub>K y Akt, luego de la interacción con su receptor específico (IR) en la superficie celular de hepatocitos, adipocitos y células musculares (Leto y Saltiel, 2012). De esta manera se induce la exocitosis de GLUT4 hacia la membrana plasmática favoreciendo la captación de glucosa en células del tejido adiposo y muscular. La evidencia obtenida en el presente trabajo de tesis demuestra que insulina es capaz de activar la vía de señalización de IR, evidenciada por la fosforilación de IR y Akt, en células MIO-M1. En este sentido, demostramos que mediante la utilización de inhibidores farmacológicos de PI<sub>3</sub>K, como Wortmanina o LY-294002, se afectó el retorno de LRP1 hacia la superficie celular. Estos resultados son indicativos de que insulina induciría el tráfico de LRP1 a la membrana plasmática mediante la activación del eje IR/PI<sub>3</sub>K/Akt en células MIO-M1.

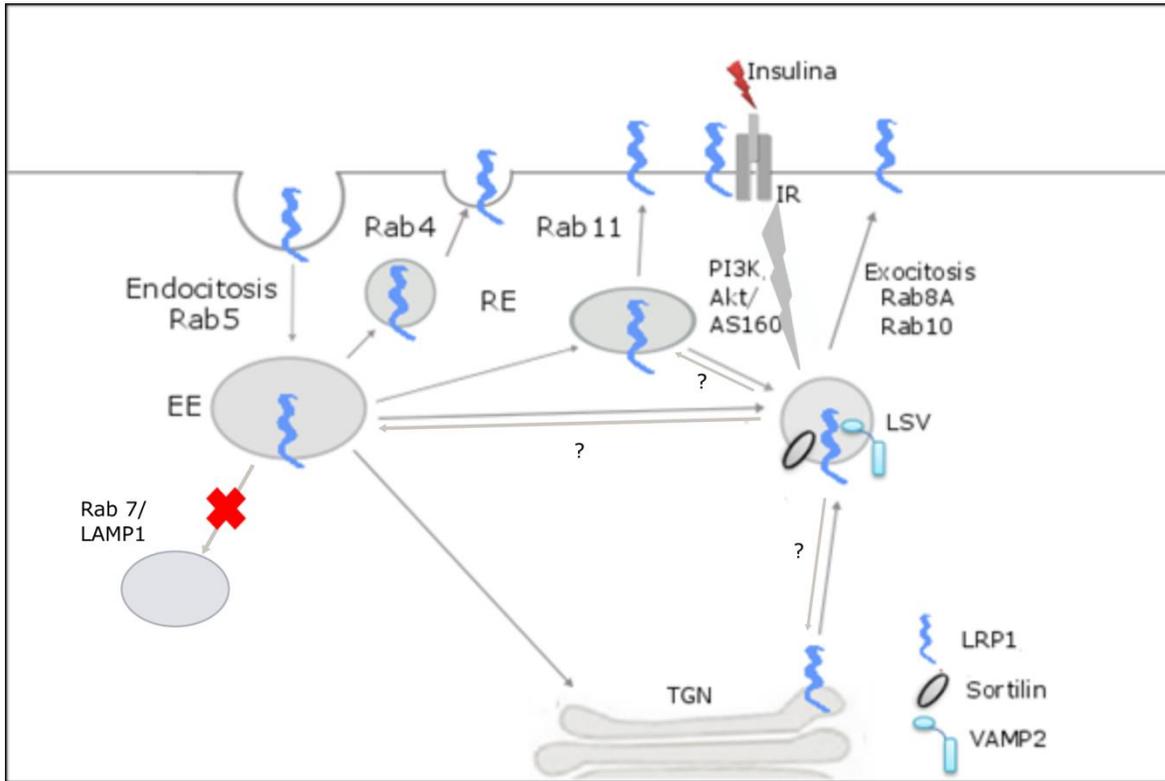
Mediante la vía de señalización intracelular inducida por insulina se produce la activación de Rab8A y Rab13 en células musculares y Rab10 en adipocitos, las cuales son algunas de las GTPasas más estudiadas encargadas de motorizar el transporte de las vesículas GSVs para favorecer su fusión con la membrana

plasmática (Chen y col., 2010; Zeigerer y col., 2004). Resultados del presente trabajo de tesis permitieron evidenciar que una proporción importante de Rab8A y Rab10 colocalizaron en las mismas estructuras que LRP1. Al utilizar vectores de expresión de las versiones wt-Rab8A y wt-Rab10 se encontró un incremento significativo de la expresión de LRP1 a nivel de la membrana plasmática en comparación con las células control sin transfección. Mientras que las dominantes negativas, constitutivamente inactivas, de estas GTPasas, dn-Rab8A y dn-Rab10, afectaron de manera significativa el tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática tanto en una situación basal como en la condición de estímulo con insulina. Estos hallazgos fueron corroborados mediante la utilización de siRNA específicos de estas GTPasas. En este sentido, ha sido demostrado que Rab8A está implicada en el tráfico de membrana entre endosomas y el compartimento de *trans*-Golgi, mientras que Rab10 tiene un papel importante en la vía exocítica (Sun y col., 2014; Jaldin-Fincati y col., 2017).

También encontramos que sortilin, otra de las proteínas constituyentes de las LSVs, mostró un patrón de expresión similar en la membrana plasmática a la de LRP1, mientras que el TfR, un receptor de reciclado endocítico dependiente de Rab11, no mostró ningún cambio sustancial en su nivel en membrana plasmática en células transfectadas con dn-Rab8A o dn-Rab10, lo que corrobora la especificidad de este transporte exocítico (Maxfield y McGraw, 2004). Estos resultados son indicativos de que las GTPasa Rab8A y Rab10 estarían involucradas en el mantenimiento de niveles estables de LRP1 en la superficie celular, así como en la exocitosis regulada por insulina de este receptor en células MIO-M1.

En conjunto estos hallazgos sugieren que el estímulo con insulina induce el tráfico intracelular de LRP1 favoreciendo su localización en endosomas tempranos y compartimentos de reciclado endocítico rápido luego de 30 minutos de estímulo. A nivel de la membrana plasmática, encontramos que insulina promovió el transporte de LRP1 hacia la superficie celular posiblemente mediante el aporte del reciclado endocítico rápido, como así también a la exocitosis regulada desde LSVs que almacenarían este receptor. Este tráfico de LRP1 hacia la membrana plasmática

sería mediado por la activación de la vía de señalización intracelular dependiente del eje IR/PI<sub>3</sub>K/Akt y presentaría diferentes vías posibles de reciclado y/o exocitosis, entre ellas, la vía de reciclado endocítico rápido [Rab4+] y la vía exocítica mediada por las GTPasas Rab8A y Rab10, como se detalla en la Figura 51.



**Figura 51. Esquema de la distribución y tráfico intracelular de LRP1 regulado por insulina en células MIO.M1.** Bajo condiciones basales LRP1 se encuentra principalmente en el nivel intracelular y se endocita constitutivamente desde la membrana plasmática hasta los endosomas tempranos (EE), y luego regresa a la superficie celular a través de una ruta de reciclado endocítico (RE) dependiente de la GTPasa Rab4 (reciclado rápido) o Rab11 (reciclado lento). Luego del estímulo con insulina, LRP1 puede movilizarse a la membrana plasmática por diferentes vías. Una de ellas sería a través del reciclado endocítico rápido (Rab4 +) y otra sería mediante exocitosis regulada a partir de vesículas de almacenamiento intracelulares de LRP1 (LSV), las cuales serían originadas a partir de la donación de membranas provenientes del compartimento de *trans*-Golgi (TGN), compartimentos de reciclado endocítico y los endosomas tempranos (EE), y transportadas principalmente por las GTPasas Rab8A y Rab10, entre otras.

## **5.2 Evaluación de la participación de LRP1 sobre la respuesta celular a la insulina**

La resistencia a la insulina está estrechamente relacionada con la insuficiencia cardíaca. En situaciones clínicas, ambas condiciones coexisten con mayor frecuencia acompañadas del desbalance en los niveles de lipoproteínas, lo que contribuye negativamente a la progresión de la cardiomiopatía. Sin embargo, la relación entre la resistencia a la insulina, la dislipemia y la disfunción cardíaca no están claras en la actualidad. Como se ha mencionado previamente, varios trabajos han demostrado que LRP1 es uno de los receptores involucrados en la captación de colesterol esterificado desde las lipoproteínas, principalmente desde las agLDL en VSMCs y otros tipos celulares (Costales y col., 2015; Swarnakar y col., 2001). También es conocido, que LRP1 coopera con el IR para su adecuada fosforilación por acción de insulina, aunque el mecanismo molecular a través del cual esto ocurre todavía no está claro y requiere una mayor investigación (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016). Es por ello, que el estudio de la participación de LRP1 en estos procesos a nivel cardíaco puede resultar clave para entender las causas de la resistencia a la insulina y poder así prevenir la cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca.

Los resultados del presente trabajo de tesis demostraron que en células HL-1, el LRP1 es un receptor clave para la unión e internalización de agLDL. Este proceso fue revertido mediante la incubación con GST-RAP, la cual es una proteína chaperona que se une a LRP1 y bloquea todos los dominios de unión a ligandos del receptor. De esta manera al bloquear la unión de las agLDL al LRP1, se encontró una menor incorporación de lípidos provenientes de estas lipoproteínas en estas células. Respecto a la distribución subcelular, pudimos observar que un porcentaje importante de la colocalización entre las agLDL y LRP1 ocurría en endosomas tempranos, lo que sugeriría que luego de la interacción entre el ligando y el receptor se desencadenaría un evento de endocitosis. Un hallazgo importante fue que el tratamiento con las agLDL produjo una redistribución de LRP1 hacia compartimentos de degradación del tipo endosomas tardío/lisosoma

[LAMP1+] en donde, como previamente demostramos, no es habitual encontrar este receptor. Este incremento de la localización de LRP1 en compartimentos de degradación podría tener relación con el proceso de biogénesis de LD. Estas organelas son sintetizadas a partir de membranas donadas por el retículo endoplásmico y por aporte de CE proveniente de la captación de las lipoproteínas procesadas en los lisosomas, aunque el mecanismo y las proteínas participantes en este proceso no están lo suficientemente caracterizadas (Walther y col., 2017; Xu y col., 2017). En este sentido, una hipótesis interesante que surgió de estos resultados fue que LRP1 podría interactuar con las agLDL y mediar su endocitosis. En los endosomas tempranos, este receptor generalmente se disocia de su cargo, pero en base a estos resultados, las agLDL se mantendrían unidas a LRP1 y juntos serían transportados hasta los lisosomas para el aporte de CE a la formación de los LD. De esta manera se podría explicar la presencia de LRP1 en estos compartimentos de degradación.

Un punto importante en este sentido es que varios grupos de trabajo han demostrado que estas lipoproteínas modificadas incrementan la expresión de LRP1 como así también su estabilidad a tiempos prolongados de tratamiento en VSMCs (Cal y col., 2013). Los resultados del presente trabajo de tesis demostraron que si bien había una importante localización de este receptor en compartimentos de degradación luego del tratamiento con agLDL por 8 horas, no se encontró una disminución en la expresión de proteína para LRP1, ni como así tampoco un aumento en los niveles de ARNm de este receptor. Estos hallazgos permitieron pensar en una posible disfuncionalidad lisosomal producto del tratamiento con las lipoproteínas modificadas. Una causa importante de disfuncionalidad de los lisosomas es la alteración de la permeabilidad de la membrana de dicha organela (Aits y col., 2015). En este sentido, nuestros resultados demostraron que luego del tratamiento con las agLDL los lisosomas presentaron un aumento de la permeabilidad de su membrana, evidenciada por un incremento de la localización de Gal1 en estas estructuras vesiculares. Esto generó disfuncionalidad de estas organelas con una menor actividad de las proteasas lisosomales, lo cual pudimos demostrar a través de la pérdida de

proteólisis de DQ<sup>TM</sup> BSA *red* en células tratadas con agLDL respecto a condiciones controles. Esta evidencia sugiere que luego de su internalización las agLDL serían transportadas junto con LRP1 hacia lisosomas generando su disfuncionalidad, lo que permite explicar por qué no se observa pérdida en la expresión proteica de LRP1.

En base a los resultados obtenidos, se procedió a evaluar si la alteración en el tráfico y localización subcelular LRP1 producida por la incorporación de las agLDL podía afectar alguna de las funciones de este receptor en las células HL-1. En este sentido, se sabe que además de su función como receptor endocítico, LRP1 coopera como una proteína *scaffold* con el IR, lo que resulta clave para permitir la fosforilación de este último receptor por acción de insulina en neuronas y hepatocitos (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016). De esta manera, la alteración de la expresión de LRP1 en estos tipos celulares resulta en una señalización defectuosa de la insulina, con disminución de la fosforilación del IR, Akt y GSK3 $\beta$  y en una supresión incompleta de la expresión de genes gluconeogénicos (Liu y col., 2015; Ding y col., 2016). Por su parte, también se ha demostrado que el LRP1 hepático es importante para mantener la sensibilidad hepática a la insulina, prevenir la esteatosis inducida por dieta y regular la movilización de GLUT2 a la membrana plasmática en respuesta a la insulina (Laatsch y col., 2009; Ding y col., 2016).

En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis sugieren que en la línea celular HL-1 efectivamente existe una asociación molecular entre LRP1 e IR evidenciada mediante ensayos de inmunoprecipitación en células no estimuladas. Esta asociación con el IR involucraría la participación de la subunidad  $\beta$  de LRP1, ya que al preincubar con GST-RAP, que se asocia y bloquea la subunidad  $\alpha$ , no vimos alteración de la interacción con IR. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar por un lado, si esta asociación ocurre en la membrana plasmática o en endosomas tempranos, y por otro, si esta interacción es directa o está mediada por moléculas intermediarias o proteínas adaptadoras, ya que tanto el DIC de la subunidad  $\beta$  del LRP1 como la subunidad  $\beta$  del IR podrían interactuar con varias proteínas adaptadoras en común como ser

quinasa Fyn (Maier y col., 2013; Rushworth y col., 2013; Samovski y col., 2018). Esta asociación entre LRP1 e IR además se vió incrementada por acción de insulina, mientras que dicho efecto fue alterado por la incubación con las agLDL, lo que podría explicar las consecuencias de la acumulación de estas lipoproteínas sobre la funcionalidad del IR ante estímulos con insulina.

Como se ha mencionado previamente, el LRP1 se localiza principalmente en dominios de la membranas ricos en clatrina e internaliza a la mayoría de sus ligandos mediante endocitosis mediada por esta vía (May y col., 2005; Lillis y col., 2008). Por su parte, ha sido descrito que el IR se ubica en dominios de la membrana plasmática ricos en colesterol o de tipo *lipid rafts/caveolae*, y es desde allí donde se activa la cascada de señalización corriente abajo de IR por acción de insulina (Delint-Ramirez y col., 2015). En este sentido, existe evidencia que, bajo ciertas condiciones como el estímulo con insulina, el LRP1 puede localizarse de manera transitoria en dominios de la membrana plasmática de tipo *lipid rafts/caveolae* (Zhang y col., 2004). Este evento favorecería la asociación molecular entre LRP1 e IR y por ende la activación de la cascada de señalización de insulina mediante la fosforilación de IR. Es importante destacar, que la activación de la cascada de señalización intracelular inducida por insulina ocurre tanto a nivel de la membrana plasmática como desde compartimentos endosomales (Giudice y col, 2013). Esta posibilidad podría tener relación con estudios que describieron que LRP1 interactúa y regula la función de receptores como el de PDGF (PDGF-R $\beta$ ) en endosomas tempranos, modulando su capacidad de señalización intracelular (Muratoglu y col., 2010).

La evidencia obtenida en el presente trabajo de tesis sugiere que tras el estímulo con insulina, LRP1 se localiza en regiones de la membrana plasmática ricas en caveolina, lo que podría favorecer su interacción con IR. No obstante, bajo el tratamiento con las agLDL solas o junto al estímulo con insulina se produce un incremento de la localización del receptor en dominios ricos en clatrina. Este último resultado sugeriría que las agLDL afectan la asociación entre LRP1 e IR al redistribuir a LRP1 hacia dominios ricos en clatrina y no hacia *lipid rafts/caveolae*

como si lo hace insulina, disminuyendo de esta manera las posibilidades de asociación de este receptor con el IR.

Posteriormente, al analizar la expresión de LRP1 e IR en la superficie celular encontramos que tanto la insulina como las agLDL favorecen la expresión de ambos receptores a nivel de la membrana plasmática, ya sea probablemente debido al aumento del reciclado endocítico y/o exocitosis de los mismos, como así también por la disminución de su endocitosis. Un hallazgo interesante fue que en la condición de células tratadas con agLDL y estimuladas posteriormente con insulina se encontraron efectos opuestos en la expresión en membrana plasmática para estos receptores, observándose un incremento en la expresión de LRP1 en la superficie celular, probablemente debido a la combinación del estímulo de captación de las lipoproteínas y al efecto de la insulina previamente demostrado. Por el contrario en estas mismas condiciones, encontramos una disminución en la expresión de IR en la superficie celular, lo que podría deberse a la combinación de, el aumento de la endocitosis de IR desencadenada por insulina (Giudice y col., 2013), sumado a la disminución de su retorno a la membrana plasmática debido al efecto de las lipoproteínas sobre su interacción con LRP1, que sería necesaria para el anclaje de IR en la superficie celular.

Es ampliamente conocido que la insulina al interactuar con IR en la en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares desencadena la autofosforilación de residuos de tirosina presentes en la subunidad  $\beta$  de este receptor, lo que lleva a la propagación de una cascada de señalización intracelular que finalmente regula numerosos procesos biológicos en la célula (Leto y Saltiel, 2012). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis sugieren que efectivamente las agLDL tienen un efecto negativo en la activación de la señalización intracelular de insulina en las células HL-1. Este efecto no se debería meramente a un inconveniente estérico por la formación de LD para el almacenamiento del colesterol proveniente de estas lipoproteínas, como ha sido propuesto en otros trabajos (Kim y col., 2015). Sino que la pérdida de la señalización intracelular inducida por insulina podría estar relacionada con la

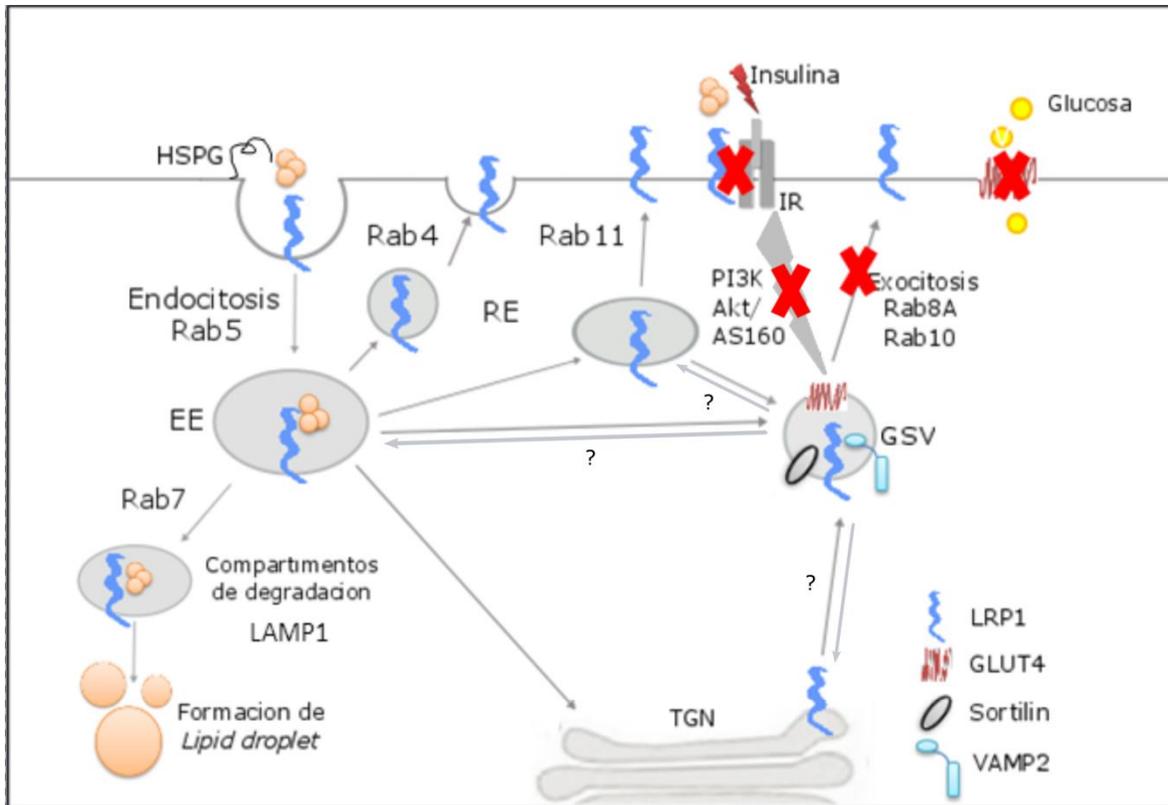
alteración de la asociación molecular entre LRP1 e IR producida por la redistribución subcelular de LRP1 luego de su interacción con las agLDL. Más específicamente, en este punto, nuestros resultados demostraron que el tratamiento con las agLDL afectó la fosforilación de intermediarios de la vía de señalización intracelular inducida por insulina como Akt y AS160 en las células HL-1. Este efecto a su vez tuvo consecuencias en la expresión del GLUT4 a nivel de la membrana plasmática, de manera que nuestros hallazgos permitieron corroborar que las agLDL afectan la exocitosis de este transportador hacia la superficie celular probablemente debido a la alteración en la señalización intracelular de insulina.

Finalmente, en este sentido, nuestra evidencia sugiere que la captación de las agLDL mediante LRP1 es capaz de afectar la captación de 2-NBDG, un análogo fluorescente de glucosa, por parte de las células HL-1. Esto produciría la pérdida de la flexibilidad metabólica y una disminución de la eficiencia energética en los cardiomiocitos que podrían ser la causa de las alteraciones en el metabolismo, estructura y función cardíaca.

Sin embargo, se requieren estudios adicionales para explicar si este proceso de resistencia a la insulina debido a la captación de lipoproteínas modificadas por el corazón es capaz de generar procesos inflamatorios, producción de especies reactivas de oxígeno y alteración de la actividad mitocondria que finalmente también contribuyan a las alteraciones cardíacas y al desarrollo de la cardiomiopatía.

En su conjunto estos resultados sugieren que LRP1 tiene una activa participación sobre la respuesta celular a insulina en células HL-1. El tratamiento con agLDL durante 8 horas produjo captación de CE en estas células, sin la formación evidente de LD a los tiempos evaluados. La captación de estas lipoproteínas modificadas fue medida por LRP1, ya que este efecto fue bloqueado por GST-RAP. Esta interacción entre las agLDL y LRP1 generó cambios significativos en la distribución subcelular del receptor, favoreciendo su localización en compartimentos de degradación del tipo endosomas tardío/lisosomas que

resultaron disfuncionales, por lo que no se encontró una disminución en los niveles de expresión de ARN mensajero ni de proteína para LRP1. La alteración en la distribución subcelular de LRP1, afectó su localización en dominios del tipo *lipid rafts/caveolae* por acción de insulina y por ende su asociación molecular con IR. A nivel de la membrana plasmática, encontramos que las agLDL afectaron la expresión de IR en la superficie celular, como así también la consecuente activación de la cascada de señalización intracelular inducida por insulina. Finalmente, se encontró una reducción de la exocitosis hacia la membrana plasmática de GLUT4 y una menor captación de glucosa por acción de insulina en los cardiomiocitos expuestos a las lipoproteínas modificadas, como se puede observar en la Figura 52. Por lo tanto, concluimos que LRP1 es un regulador clave de la respuesta a la insulina en cardiomiocitos, siendo su acción afectada por agLDL.



**Figura 52. Esquema de la distribución intracelular de LRP1 por acción de agLDL y la consecuente pérdida de señalización del sistema insulina/IR en células HL-1.** LRP1 participa en la unión e internalización de agLDL en células HL-1. Luego de este evento, LRP1 se localiza en compartimentos de degradación lisosomal, contribuyendo al aporte del colesterol esterificado para la formación de *lipid droplet*. La alteración de la distribución subcelular habitual de LRP1 generada por las agLDL, produce la disminución de la localización de LRP1 en regiones de la MP del tipo *lipid/rafts*, alterando de esta manera su interacción molecular con IR. Esto lleva a la alteración de la activación de la vía de señalización intracelular inducida por insulina, con una menor expresión de GLUT4 nivel de la superficie celular y por ende una disminución en la captación de glucosa por parte de los cardiomiocitos.

En resumen, los resultados del presente trabajo de tesis sugerirían que parte de los mecanismos moleculares, bioquímicos y celulares implicados en la resistencia a la insulina podrían ser explicados desde la funcionalidad del LRP1 y su capacidad de regular la actividad del IR. En este sentido, LRP1 podría desempeñar diversas funciones celulares, influyendo de algún modo la distribución subcelular y el tráfico intracelular de este receptor regulado por acción de la insulina. En este sentido, la insulina regularía la participación de LRP1 en procesos de migración y activación del componente celular retinal, en particular de células gliales de Müller, en procesos fisiológicos y patológicos de la retina. De la

misma manera, LRP1 tendría una activa capacidad de regular la función del IR, actuando como un receptor de andamiaje o *scaffold protein* necesario para la activación de IR inducida por la hormona. En este sentido, la producción de lipoproteínas modificadas del tipo agLDL, que se unen a LRP1 podrían ser responsables de inducir cambios en la funcionalidad de este receptor, lo que afectaría la activación de IR produciendo consecuentemente resistencia a la insulina. Es por ello, que la relación del tráfico intercelular de LRP1 y la respuesta celular a la insulina constituiría un aspecto clave para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la retinopatía y la cardiomiopatía diabética.

### **5.3 Perspectivas**

El estudio realizado en el presente trabajo de tesis doctoral abre varias perspectivas a futuro relacionadas con comprender y dilucidar mecanismos celulares y moleculares básicos relacionados a la participación de LRP1 en procesos neurodegenerativos retinales y de disfunción cardíaca, como así también con el diseño de estrategias terapéuticas racionales que permitan intervenir en el desarrollo de enfermedades asociadas a la dislipemia y resistencia a la insulina, como lo son la retinopatía y cardiomiopatía diabética.

En este sentido, en células MIO-M1 sería interesante evaluar los siguientes aspectos:

- 1- La participación de LRP1 en la regulación de la expresión en la superficie celular de transportadores de hexosas que no son sensibles a la insulina como lo es GLUT1, que está ampliamente expresado en estas células como así también en neuronas y que se conoce que es el principal regulador de la captación de glucosa en estas células.
- 2- La posibilidad de que estas células sean capaces de unir e internalizar, mediante LRP1, colesterol esterificado proveniente de agLDL y las consecuencias de dicho evento a nivel de la funcionalidad celular.

Así mismo, en células HL-1 sería interesante investigar:

- 1- El efecto competitivo de ligandos de LRP1, como  $\alpha 2M^*$ , sobre el efecto de agLDL en la respuesta a la insulina. En este sentido,  $\alpha 2M^*$  produce un tráfico intracelular de LRP1 diferente al que generan las agLDL, lo que podría dar idea de que no afectaría la asociación molecular de LRP1 con IR. Por este motivo, sería interesante evaluar si  $\alpha 2M^*$  compite por la unión a LRP1 con las agLDL y de este modo si es capaz de restaurar la señalización intracelular inducida por insulina, como así también la captación de glucosa en cardiomiocitos.
- 2- La participación de sortilin en la localización de LRP1 en compartimentos de degradación producto de la incubación con agLDL. Se sabe que la proteína intracelular ligada al retrómero, sortilin, está involucrada en el transporte retrogrado de ciertos receptores y proteínas membranas desde la vía de degradación hacia la de reciclaje. Por lo tanto, en este punto sería interesante evaluar si sortilin participa en el rescate de LRP1 desde compartimentos de degradación, como así también si este evento se ve afectado por la presencia de agLDL.

# **6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

## 6. PRODUCCION CIENTIFICA

### 6.1 Publicaciones

-2019. En revisión. **“Aggregated LDL affects the insulin response mediated by LDL receptor-related protein-1 in HL-1 cardiomyocytes”**. Actis Dato Virginia; Benitez-Amaro Aleyda; Vazquez Maximiliano; De Gonzalo-Clavo David; Bonacci Gustavo; Llorente-Cortés Vicenta; Chiabrando Gustavo A.

-2019. En revisión. **“Activated Alpha 2-Macroglobulin Induces Retinal Müller Glial Cell Motility through Regulated Exocytosis of Low Density Lipoprotein-Related Protein-1”**. Jaldín Fincati Javier \*; Actis Dato Virginia\*; Sánchez María Cecilia; Barcelona Pablo; Chiabrando Gustavo A.

- 2018. Review: **“The role of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in lipid metabolism, glucose homeostasis and inflammation”**. Actis Dato Virginia; Chiabrando Gustavo A. *International Journal of Molecular Science*. Junio 2018. doi: 10.3390/ijms19061780

- 2018. Paper: **“Insulin-induced exocytosis regulates the cell surface level of low density lipoprotein-related protein-1 in Müller Glial cells”**. Actis Dato Virginia; Grosso Rubén A; Sánchez María Cecilia; Fader Claudio M; Chiabrando Gustavo A. *Biochemical Journal*, Abril 2018. doi: 10.1042/BCJ20170891.

- 2017. Paper: **“Activated  $\alpha 2$  -Macroglobulin Induces Mesenchymal Cellular Migration Of Raw264.7 Cells Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1”**. Ferrer Dario G, Actis Dato Virginia, Jaldin – Fincati Javier R, Lorenc Valeria E, Sanchez Maria Cecilia, Chiabrando Gustavo A. *J Cell Biochem*, Julio 2017. doi: 10.1002/jcb.25857.

### 6.2 Congresos Nacionales e Internacionales

- 2014. Poster. **“Intracellular traffic of LRP1 and GLUT4 in  $\alpha 2$ -macroglobulin-stimulated MIO-M1 cells**. Actis Dato V, Jaldin-Fincati JR, Bonacci G, Sancez MC, Chiabrando G. L reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular(SAIB) Rosario, Santa Fe, Argentina.

- 2015. Poster. **“Differential intracellular traffic of Irf1 induced by  $\alpha 2$ -macroglobulin and insulin”**. Actis Dato V, Vazquez MM, Jaldin-Fincati JR, Bonacci G, Sancez MC, Chiabrando G. LI reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB).Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

- **2016. Poster:** *“Insulin induces the exocytic traffic of LRP1 from GSV-like structural vesicles”*. Actis Dato V, Vázquez MM, Barcelona PF, Sanchez MC, Chiabrando G. LII reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular(SAIB). Córdoba, Argentina.
- **2017. Conferencia Oral:** *“Aggregated LDL affects the regulatory action of LRP1 on the insulin-dependent intracellular signaling and GLUT4 trafficking in HL-1 cardiomyocytes “*. Actis Dato V.; Vázquez MM.; Gutiérrez V.; Benítez-Amaro A.; Nasarre L.; Llorente-Cortes V.; Chiabrando GA. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Noviembre, Buenos Aires
- **2017. Poster.** *“Nitro-fatty acid modulates expression of CD36 and LRP1 scavenger receptors on RAW264.7 macrophages”*. Vazquez MM, Gutierrez MV, Actis Dato V, Chiabrando GA, Bonacci G. Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Baltimore, USA.
- **2018. Poster.** *“Insulin regulates the LRP1 translocation to the cell surface in müller glial cells”*. Actis Dato V.; Vázquez MM.; Gutiérrez V.; Barcelona PF., Bonacci GR., Sanchez MC., Fader C., Chiabrando GA. LIII reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Parana, Argentina.
- **2018. Conferencia oral.** *“Nitro fatty acids: novel CD36 ligands which modulate fatty acids metabolism”*. Vazquez MM, Gutierrez MV, Actis Dato V, Chiabrando GA, Bonacci G. Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM),Chicago, USA.

### 6.3 Pasantías

- **2016.** Pasantía de Investigación. Duración 3 meses. ICCC-CSIC. Barcelona, España.
- **2017.** Pasantía de Investigación. Duración 3 semana. IHEM-UNCuyo. Mendoza, Argentina.

### 6.4 Becas

- **2014.** Beca Doctoral. 2014-2017. Fondo para la Investigacion Científica y Tecnológica (FONCyT).
- **2015.** Beca “Albert Renold Travel Fellowship” para la realización de pasantía en el exterior. Fundacion Europea para el Estudio de la Diabetes (EFSD).

- **2016.** Beca de Finalización de Doctorado. 2017-2019. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- **2018.** Beca “Boehringer Ingelheim Fonds” para la realización de un curso de Microscopía de Super-resolución en el centro EMBL, Alemania. Boehringer Ingelheim Fonds (BIF).
- **2018.** Beca Posdoctoral. 2019-2021. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

# **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A., Heamealistero, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Hogh, S., Farkas, T., Jonassen, A., Gromova, I., Mortensen, M y Jeaattelea, J. (2015). "*Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay*". *Autophagy* **11**:8, 1408—1424.
- Aoi, W., Naito, Y., y Yoshikawa, T. (2013). "*Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage*". *Free Radic Biol Med*, **65**:1265-1272.
- Aroor, A. R., Mandavia, C. H., Sowers, J. R., y Pulakat, L. (2012). "*Mitochondria and oxidative stress in cardiorenal metabolic syndrome*". *Cardiorenal Med*, **2**:87—109.
- Ashcom, J. D., Tiller, S. E., Dickerson, K., Cravens, J. L., Argraves, W. S. y Strickland, D. K. (1990). "*The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin*". *J Cell Biol*, **110**(4): 1041-8.
- Ashrafian, H., Frenneaux, M. P., y Opie, L. H. (2007). "*Metabolic mechanisms in heart failure*". *Circulation*, **116**(4):434-48.
- Bai, L., Wang, Y., Fan, J., Chen, Y., Ji, W., Qu, A., Xu, P., James, D. E., y Xu, T. (2007). "*Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action*". *Cell Metab.* **5**, 47—57.
- Baitsch, D., Bock, H. H., Engel, T., Telgmann, R., Muller-Tidow, C., Varga, G., Bot, M., Herz, J., Robenek, H., von Eckardstein, A., y Nofer, J. R. (2011). "*Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages*". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, **31**, 1160—1168.
- Bancells, C., Villegas, S., Blanco, F.J., Benítez, S., Gállego, I., Beloki, L., Pérez-Cuellar, M., Ordóñez-Llanos, J., y Sánchez-Quesada, J.L. (2010). "*Aggregated electronegative low density lipoprotein in human plasma shows a high tendency toward phospholipolysis and particle fusion*". *J Biol Chem*, **285**(42):32425-35.
- Barcelona, P.F., Luna, J.D., Chiabrando, G.A., Juarez, C.P., Bhutto, I.A., Baba, T., McLeod, D.S., Sánchez, M.C., y Luty, G.A. (2010). "*Immunohistochemical localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 and*

*alpha(2)-Macroglobulin in retinal and choroidal tissue of proliferative retinopathies*". *Exp Eye Res*, **91**(2):264-72.

Barcelona, P.F., Ortiz, S.G., Chiabrando, G.A., y Sánchez, M.C. (2011). "*alpha2-Macroglobulin induces glial fibrillary acidic protein expression mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Müller cells*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **9**;52(2):778-86.

Barcelona, P.F., Jaldín-Fincati, J.R., Sánchez, M.C., y Chiabrando, G.A. (2013). "*Activated  $\alpha$ 2-macroglobulin induces Müller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1*". *FASEB J*, **27**(8):3181-97.

Barnett, N.L. y Pow, D.V. (2000). "*Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function*". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 585–591.

Beffert, U., Durudas, A., Weeber, E.J., Stolt, P.C., Giehl, K.M., Sweatt, J.D., Hammer, R.E., y Herz, J. (2006). "*Functional dissection of Reelin signaling by site-directed disruption of Disabled-1 adaptor binding to apolipoprotein E receptor 2: distinct roles in development and synaptic plasticity*". *J Neurosci*, **26**(7):2041-52.

Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., y Scherer, P.E. (2001). "*The adipocyte secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action*". *Nat Med*, **7**: 947- 53.

Bertrand, L., Horman, S., Beauloye, C. (2008). "*Insulin signaling in the heart*". *Cardiovasc Res*, **79**(2):238–48.

Bing, R.J., Siegel, A., Vitale, A., Balboni, F., Sparks, E., Taeschler, M., Klapper M., y Edwards S. (1953). "*Metabolic studies on the human heart in vivo. I. Studies on carbohydrate metabolism of the human heart*". *Am J Med*, **3**:284–96.

Bissig, C., Gruenberg, J. (2013) "*Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis*". *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**(10):a016816.

Biswas, S.K., Zhao, Y., Nagalingam, A., Gardner, T.W. y Sandirasegarane, L. (2008). "*PDGF- and insulin/IGF-1-specific distinct modes of class IA PI 3-kinase activation in normal rat retinas and RGC-5 retinal ganglion cells*". *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **49**, 3687–3698.

Bonacci, G.R., Caceres, L.C., Sanchez, M.C. y Chiabrando, G.A. (2007). "*Activated alpha(2)-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-*

- activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line". *Arch Biochem Biophys*, **1**:100-6.
- Bogan, J.S., Kandror, K.V.(2010). "*Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4*". *Curr Opin Cell Biol*, **22**(4):506-12.
- Bogan, J.S. (2012). "*Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes*". *Annu Rev Biochem*. **81**:507-32.
- Borén, J., Taskinen, M.R., Olofsson, S.O., y Levin, M. (2013). "*Ectopic lipid storage and insulin resistance: A harmful relationship*". *Journal of Internal Medicine*, 25–40.
- Borth, W. (1992). "*Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics*". *FASEB J*, **15**:3345-53.
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.P., Anderson, R.G. y Herz, J. (2003). "*LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*". *Science*, **300**(5617):329-32.
- Bu, G., Maksymovitch, E.A., Geuze, H., y Schwartz, A.L. (1994). "*Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells*". *J Biol Chem*, **269**(47):29874-82.
- Bugger, H., y Abel, E.D. (2014). "*Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy*". *Diabetologia*. **4**:660-671.
- Bull, N. D., Limb, G. A. y Martin, K. R. (2008). "*Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration*". *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **49**(8): 3449-56.
- Caceres, L.C., Bonacci, G.R., Sanchez, M.C. y Chiabrando, G.A. (2010). "*Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines*". *J Cell Biochem*, **3**:607-17.
- Canton, J., Neculai, D. y Grinstein, S. (2013). "*Scavenger receptors in homeostasis and immunity*". *Nat Rev Immunol.*, **13**(9):621-34.
- Cal, R., Juan-Babot, O., Brossa, V., Roura, S., Gálvez-Montón, C., Portoles, M., Rivera, M., Cinca, J., Badimon, L., y Llorente-Cortés, V. (2012). "*Low density lipoprotein receptor-related protein 1 expression correlates with cholesteryl ester accumulation in the myocardium of ischemic cardiomyopathy patients*". *J Transl Med*. **10**:160.

- Cal, R., García-Arguinzonis, M., Revuelta-López, E., Castellano, J., Padró, T., Badimon, L., y Llorente-Cortés, V. (2013). "Aggregated low-density lipoprotein induces LRP1 stabilization through E3 ubiquitin ligase CHFR downregulation in human vascular smooth muscle cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **33**(2):369-77.
- Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., y Bondjers, G. (1998). "Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis". *Atherosclerosis*, **139**: 205-222.
- Ceschin, D., Sanchez M.C. y Chiabrando G.A. (2009). "Insulin Induces the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Degradation by the Proteasomal System in J774 Macrophage-Derived Cells". *Journal of Cellular Biochemistry*, **106**:372–380.
- Chen, X.W., Leto, D., Xiong, T., Yu, G., Cheng, A., Decker, S. y Saltiel, A.R.(2010). "Raf GAP complex links PI 3-kinase/Akt signaling to RafA activation in insulin action". *Mol. Biol. Cell* **22**, 141–152.
- Chen, Y., Lippincott-Schwartz, J.(2013). "Insulin triggers surface-directed trafficking of sequestered GLUT4 storage vesicles marked by Rab10". *Small GTPases*, **4**(3):193-7.
- Chen, Y., Lippincott-Schwartz, J.(2013). "Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane". *Communicative & integrative biology*, **6**(3):e23779.
- Chen, J.W., Kong, Z.L., Tsai, M.L., Lo, C.Y., Ho, C.T. y Lai, C.S. (2018). "Tetrahydrocurcumin ameliorates free fatty acid-induced hepatic steatosis and improves insulin resistance in HepG2 cells". *J Food Drug Anal*, **26**(3):1075-1085.
- Chiabrando, G.A., Vides, M.A. y Sanchez, M.C. (2002). "Differential Binding Properties of Human Pregnancy Zone Protein and  $\alpha$ 2-Macroglobulin Proteinase Complexes to Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein". *Arch Biochem Biophys*, **398**(1):73-8.
- Chokshi, A., Drosatos, K., Cheema, F.H., Ji, R., Khawaja, T., Yu, S., et al. (2012). "Ventricular Assist Device Implantation Corrects Myocardial Lipotoxicity, Reverses Insulin Resistance, and Normalizes Cardiac Metabolism in Patients With Advanced Heart Failure". *Circulation*, p. 2844– 53.
- Cnop, M., Foufelle, F., Velloso, L.A. (2012). "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes". *Trends Mol Med*, **18**:59–68.

- Costales, P., Fuentes-Prior, P., Castellano, J., Revuelta-Lopez, E., Corral-Rodriguez, M.A., Nasarre, L., Badimon, L. y Llorente-Cortes, V. K. (2015). "Domain CR9 of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1) Is Critical for Aggregated LDL-induced Foam Cell Formation from Human Vascular Smooth Muscle Cells". *J. Biol. Chem*, **290**, 14852–14865.
- Davegardh, C., García-Calzón, S., Bacos, K. y Ling, C.(2018). "DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans". *Mol Metab*, **S2212-8778**(17)31102-X.
- Delint-Ramirez, I., Maldonado Ruiz, R., Torre-Villalvazo, I., Fuentes-Mera, L., Garza Ocañas, L., Tovar, A., y Camacho, A.(2015). "Genetic obesity alters recruitment of TANK-binding kinase 1 and AKT into hypothalamic lipidrafts domains". *Neurochem Int*, **80**:23-32.
- DeNofrio, D., Hooek, T.C., Herman, I.M. (1989). "Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes". *J. Cell. Biol.*, **109**: 191-202.
- Depre, C., Vanoverschelde, J. L. (1999). "Glucose for the heart." *Circulation* **99**(4): 578-88.
- Descamps, O., Bilheimer, D. y Herz, J. (1993). "Insulin stimulates receptor-mediated uptake of apoE-enriched lipoproteins and activated alpha 2-macroglobulin in adipocytes". *J Biol Chem*, **268**(2): 974-81.
- Ding, Y., Xian, X., Holland, W.L., Tsai, S. y Herz, J.(2016). "Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Protects Against Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Steatosis". *EBioMedicin*, **7**, 135–145.
- Doehner, W., Frenneaux, M., Anker, S.D.(2014). "Metabolic impairment in heart failure: the myocardial and systemic perspective". *J Am Coll Cardiol*, **64**:1388-1400.
- Donoso, M., Cancino, J., Lee, J., van Kerkhof, P., Retamal, C., Bu, G., Gonzalez, A., Caceres, A. y Marzolo, M. P. (2009). "Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways". *Mol Biol Cell*, **20**(1): 481-97.
- Domenighetti, A.A., Danes, V.R., Curl, C.L., et al. (2010). "Targeted GLUT-4 deficiency in the heart induces cardiomyocyte hypertrophy and impaired contractility linked with Ca (2+) and proton flux dysregulation". *J Mol Cell Cardiol*, **48**:663–672.

- Doyle, M.E., Egan, J.M. (2003). "Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion". *Pharmacol Rev*, **55**:105-31.
- Ebara, T., Conde, K., Kako, Y., Liu, Y., Xu, Y., Ramakrishnan, R., Goldberg, I.J. y Shachter, NS. (2000). "Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice". *J Clin Invest.*, **105**(12):1807-18.
- Edeling, M. A., Smith, C., y Owen, D. (2006). "Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures". *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 32-44.
- Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM. (2001). "Insulin resistance as a predictor of age-related diseases". *J Clin Endocrinol Metab.*, **86**:3574-78.
- Falcão-Pires, I., Leite-Moreira, A.F.(2012). "Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment". *Heart Fail Rev*, **17**(3):325-44.
- Farfan, P., Lee, J., Larios, J., Sotelo, P., Bu, G. y Marzolo, M. P. (2013). "A sorting nexin 17-binding domain within the LRP1 cytoplasmic tail mediates receptor recycling through the basolateral sorting endosome". *Traffic*, **14**(7): 823-38.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K. y Silverstein, R.L. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice". *J Clin Invest.*, **105**(8):1049-56.
- Feng, H., Guo, L., Wang, D., Gao, H., Hou, G., Zheng, Z., Ai, J., Foreman, O., Daugherty, A. y Li, X.A. (2011). "Deficiency of scavenger receptor *Bl* leads to impaired lymphocyte homeostasis and autoimmune disorders in mice". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **31**(11):2543-51.
- Ferrer, D.G., Jaldin-Fincafi, J.R., Amigone, J.L., Capra, R.H., Collino, C.J., Albertini, R.A. y Chiabrande, G.A. (2014). "Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes". *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.*, **85**(7):601-10.
- Ferrer, D.G., Actis Dato, V., Jaldin Fincafi, J.R., Lorenc, V.E., Sanchez, M.C. y Chiabrande, G.A.(2016). "Activated alpha2 -Macroglobulin Induces Mesenchymal Cellular Migration of Raw264.7 Cells through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1". *J Cell Biochem.*, **118**(7):1810-1818.

- Fuentealba, R.A., Liu, Q., Zhang, J., Kanekiyo, T., Hu, X., Lee, J.M., LaDu, M.J. y Bu, G. (2010). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal Abeta42 uptake and lysosomal trafficking". *PLoS One.*, **29**;5(7):e11884.
- Gaultier, A., Hollister, M., Reynolds, I., Hsieh, EH. y Gonias, S.L. (2010). "LRP1 regulates remodeling of the extracellular matrix by fibroblasts". *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.*, **29**(1):22-30.
- Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, A.M. y Hebbachi, A.M.(2004). "Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein". *Biochem Soc Trans.* , **32**(Pt 1):59-64.
- Giudice, J., Jares-Erijman, E.A., Leskow, F.C. (2013). "Endocytosis and intracellular dissociation rates of human insulin-insulin receptor complexes by quantum dots in living cells". *Bioconjug Chem.*, **24**(3):431-42.
- Goldberg, J. (2001). "Diabetic dyslipidemia: causes and consequences". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 965–971.
- Goldstein, J,L y Brown, M.S.(2009). "The LDL receptor". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **29**(4):431-8.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. y Brown, M.S.(1979). "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**(1):333-7.
- Gonias, S.L., Gaultier, A., Jo, M. (2011). "Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1)". *Current pharmaceutical design*, **17**(19):1962-9.
- Gonzalez, E. y McGraw, T. E. (2006). "Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane". *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4484–4493.
- Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J. y Herz, J.(2000). "Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signaltransduction". *J Biol Chem.* , **275**(33):25616-24.

- Govers, R., Coster, A. C. y James, D. E. (2004). "Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway". *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6456–6466.
- Gray, S., Kim, J.K. (2011). "New insights into insulin resistance in the diabetic heart". *Trends Endocrinol Metab.* **22**:394–403.
- Griffin, E., Ullery, J.C., Cox, B.E. y Jerome, W.G. (2005). "Aggregated LDL and lipid dispersions induce lysosomal cholesteryl ester accumulation in macrophage foam cells". *Journal of Lipid Research*, **46**.
- Grundy, S.M. (2006). "Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance". *Clin Cornerstone.* , **8** Suppl 1:S21-7.
- Haffner, S., Taegtmeyer, H. (2003). "Epidemic obesity and the metabolic syndrome". *Circulation.*, **108**(13):1541-5.
- Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. y Stanley, K. K. (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor". *EMBO J*, **7**(13): 4119-27.
- Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (1990). "Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment". *EMBO J*, **9**(6): 1769-76.
- Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K. y Brown, M. S. (1991). "39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor". *J Biol Chem*, **266**(31): 21232-8.
- Herz, J., Clouthier, D. E. y Hammer, R. E. (1992). "LDL receptorrelated protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation," *Cell*, **71**, 3, 411–421.
- Herz, J. y Bock, H. H. (2002). "Lipoprotein receptors in the nervous system". *Annu Rev Biochem*, **71**: 405-34.
- Herz, J., Strickland, D.K. (2001). "LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor". *J Clin Invest.*, **108**(6):779-84.
- Hollborn, M., Birkenmeier, G., Saalbach, A., Iandiev, I., Reichenbach, A., Wiedemann, P. y Kohen, L. (2004). "Expression of LRP1 in retinal pigment epithelial cells and its regulation by growth factors". *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **45**(6):2033-8.

- Horwich, T.B., Fonarow, G.C. (2010). "Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure". *J Am Coll Cardiol.* **26**;55(4):283-93.
- Hossaina, A., Tauhidb, L., Davenporta, I., Huckabaa, T., Gravesc, R., Mandalc, T., Muniruzzamana, S., Ahmedd, S., y Bhattacharjee, P. (2017). "LRP-1 Pathway Targeted Inhibition of Vascular Abnormalities in the Retina of Diabetic Mice". *Curr Eye Res.*,**42**(4): 640–647.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., y Spiegelman, B.M. (1996). "IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF $\alpha$ , and obesity-induced insuline resistance". *Science*, **271**: 665-8.
- Itahana, Y., Itahana, K.(2018). "Emerging Roles of p53 Family Members in Glucose Metabolism". *Int J Mol Sci.* **8**;19(3).
- Ishikura, S., y Klip, A. (2008). "Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C1016–C1025.
- Jagasia, D., McNulty, P.H.(2003). "Diabetes mellitus and heart failure". *Congest Heart Fail.* ,**9**(3):133-9.
- Jaldin-Fincati, J.R., Pavarotti, M., Frendo-Cumbo, S., Bilan, P.J. y Klip, A. (2017) "Update on GLUT4 vesicle traffic: a cornerstone of insulin action". *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 597–611.
- Jedrychowski, M. P., Gartner, C. A., Gygi, S. P., Zhou, L., Herz, J., Kandror, K. V., y Pilch, P. F. (2010). "Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling". *J Biol Chem* **285**, 104-114.
- Johnson, T.V., Bull, N.D., Martin, K.R. (2009). "Transplantation prospects for the inner retina". *Eye (Lond).*, **23**(10):1980-4.
- Kahn, B.B. (1994). "Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle". *J Nutr.* **124**(8 Suppl):1289S-1295S.
- Kanai, Y., Wang, D., Hirokawa, N. (2014). "KIF13B enhances the endocytosis of LRP1 by recruiting LRP1 to caveolae". *J Cell Biol.* **204**(3):395-408.
- Kandror, K.V., Pilch, P.F. (2011)."The sugar is sIRVed: sorting Glut4 and its fellow travelers".*Traffic.*, **12**(6):665-71.

- Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A. y McGraw, T. E. (2004). "GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes". *Mol. Biol. Cell* **15**, 870–882.
- Kim, J.I., Huh, J.Y., Sohn, J.H., Choe, S.S., Lee, Y.S., Lim, C.Y., Jo, A., Park, S.B., Han, W. y Kim, J.B.(2015). "Lipid-overloaded enlarged adipocytes provoke insulin resistance independent of inflammation". *Mol Cell Biol.*, **35**(10):1686-99.
- Kim, J.A., Wei, Y., Sowers, J.R.(2008). "Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance". *Circ Res.*, **102**(4):401-14.
- Klefter, O.N., Hommel, E., Munch, I.C., Norgaard, K., Madsbad, S. y Larsen, M.(2016). "Retinal characteristics during 1 year of insulin pump therapy in type 1 diabetes: a prospective, controlled, observational study". *Acta Ophthalmol.*, **94**(6):540-7.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Park, H., Seol, W., Kim, J., Kim, T., Park, H.S., Choi, E.J.y Kim, S. (2001). "Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm". *J Biol Chem.*, **276**(42):39103-6.
- Kowal, R.C.; Herz, J.; Goldstein, J.L.; Esser, V.; Brown, M.S.(1989). "Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 5810–5814.
- Kraegen, E. W., James, D. E., Jenkins, A. B. y Chisholm, D. J. (1985). "Dose-response curves for *in vivo* insulin sensitivity in individual tissues in rats". *Am. J. Physiol.* **248**, e353–e362.
- Krieger, M., Herz, J.(1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)". *Annu Rev Biochem.*, **63**:601-37.
- Kruth, H.S. (2002). "Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages". *Curr Opin Lipidol.* , **13**(5):483-8.
- Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P. J., Grewal, T., Beisiegel, U. y Heeren, J. (2009). "Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance". *Atherosclerosis*, **204**(1): 105-11.

- Laatsch, A., Panteli, M., Sornsakrin, M., Hoffzimmer, B., Grewal, T. y Heeren, J. (2012). "Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E". *PLoS One*, **7**(1): e29385.
- Laclaustra, M., Bergua, C., Pascual, I., Casasnovas, J. (2005). "Síndrome Metabólico: concepto y fisiopatología". *Rev Esp Cardiol Supl*, **5**: 3-10.
- Lawrence, J.M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D.J., Reh, T.A., Luthert, P.J., Khaw, P.T. y Limb, G.A.(2007). "MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics". *Stem Cells*, **25**(8):2033-43.
- Laws, A., Hoen, H.M., Selby, J.V., Saad, M.F., Haffner, S.M. y Howard, B.V.(1997). "Differences in insulin suppression of free fatty acid levels by gender and glucose tolerance status: relation to plasma triglyceride and apolipoprotein B concentrations". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**: 64-71.
- Lebeche, D., Davidoff, A.J., Hajjar, R.J.(2008). "Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy". *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, **5**:715– 24.
- Lee, J., Retamal, C., Cuitino, L., Caruano-Yzermans, A., Shin, J. E., van Kerkhof, P., Marzolo, M. P. y Bu, G. (2008). "Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes". *J Biol Chem*, **283**(17): 11501-8.
- Leto, D. y Saltiel, A.R. (2012). "Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–396.
- Lieth, E., LaNoue, K.F., Antonetti, D.A. y Ratz, M. (2000). "Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn state retina research group. *Exp. Eye Res.* **70**, 723–730.
- Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. y Strickland, D. K. (2008). "LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies". *Physiol Rev*, **88**(3): 887-918.
- Lillis, A.P., Muratoglu, S.C., Au, D.T., Migliorini, M., Lee, M.J., Fried, S.K., Mikhailenko, I. y Strickland, D.K. (2015). "LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages". *PLoS One*, **10**(6):e0128903.

- Lin, B. Z., Pilch, P. F. y Kandrór, K. V. (1997). "Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles". *J. Biol. Chem.* **272**, 24145–24147.
- Limb, G. A., Daniels, J. T., Pleass, R., Charteris, D. G., Luthert, P. J. y Khaw, P. T. (2002). "Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha". *Am J Pathol*, **160**(5): 1847-55.
- Liu, C.C., Hu, J., Tsai, C.W., Yue, M., Melrose, H.L., Kanekiyo, T. y Bu, G. (2015). "Neuronal LRP1 regulates glucose metabolism and insulin signaling in the brain". *J Neurosci.*,**35**(14):5851-9.
- Llorente-Cortés, V., Martínez-González, J., Badimon, L. (2000). "LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**:1572–1579.
- Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Hurt-Camejo, E., Martínez-González, J., Badimon, L. (2002). "Human coronary smooth muscle cells internalize versicanmodified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**:387–393.
- Llorente-Cortés, V. y Badimon, L. (2005). "LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **25**(3):497-504.
- Llorente-Cortés, V., Otero-Viñas, M., Camino-López, S., Costales, P., Badimon, L. (2006). "Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **26**(1):117-23.
- Lorenc, V.E., Jaldín-Fincati, J.R., Luna, J.D., Chiabrandó, G.A. y Sánchez, M.C. (2015). "IGF-1 Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2 and Promotes Müller Glial Cell Motility". *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **56** (11):6948-60.
- Lorenc, V.E., Subirada Caldarone, P.V., Paz, M.C., Ferrer, D.G., Luna, J.D., Chiabrandó, G.A. y Sánchez, M.C. (2018). "IGF-1R Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2, Pathological Neovascularization, and Functionality in Retinas of OIR Mouse Model". *Mol Neurobiol.*, **55**(2):1123-1135.
- Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, .I, Lawrence, D.A. y Strickland, D.K. (2002). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine

*phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF". J Biol Chem., 277(18):15499-506.*

Lutty, G.A. (2013). "Effects of diabetes on the eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **54**(14):ORSF81-7.

Maier, W., Bednorz, M., Meister, S., Roebroek, A., Weggen, S., Schmitt, U., Pietrzik, C.U. (2013). "LRP1 is critical for the surface distribution and internalization of the NR2B NMDA receptor subtype". *Mol Neurodegener.* , **8**:25.

Maddux, B.A., See, W., Lawrence, J.C., Goldfine, A.L., Goldfine, I.D., Evans, J.L. (2001). "Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid". *Diabetes*, **50**: 404-10.

Mahley, R.W. (2016). "Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders". *J Mol Med (Berl).* , **94**(7):739-46.

Mantuano, E., Jo, M., Gonias, S.L., Campana, W.M. (2010). "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration". *J Biol Chem.*, **285**(19):14259-66.

Mantuano, E., Henry, K., Yamauchi, T., Hiramatsu, N., Yamauchi, K., Orita, S., Takahashi, K., Lin, J. H., Gonias, S. L. y Campana, W. M. (2011). "The unfolded protein response is a major mechanism by which LRP1 regulates Schwann cell survival after injury". *J Neurosci*, **31**(38): 13376-85.

Mari, M., Monzo, P., Kaddai, V., Keslair, F., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., Cormont, M. (2006). "The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes". *J Cell Sci.* , **119** (Pt 7):1297-306.

Martin, S., Tellam, J., Livingstone, C., Slot, J.W., Gould, G.W. y James, D.E. (1996). "The glucose transporter (GLUT4) and vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) are segregated from recycling endosomes in insulin sensitive cells". *J Cell Biol.*, **134** (3):625-35.

Martin, S., Rice, J.E., Gould, G.W., Keller, S.R., Slot, J.W. y James, D.E. (1997). "The glucose transporter GLUT4 and the aminopeptidase vp165 colocalize in tubulo-vesicular elements in adipocytes and cardiomyocytes". *J Cell Sci.* , **110**, 18 :2281-91.

- Martin, S., Millar, C.A., Lyttle, C.T., Meerloo, T., Marsh, B.J., Gould, G.W. y James, D.E.(2000). "*Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation*". *J Cell Sci.*, **19**:3427-38.
- Martínez Larrad, M.T., González Sánchez, J.L., Serrano Ríos, M.(2002). "*Insulin resistance: a genetic approach*". Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme., **6**: 79-93.
- Mathers, C.D., Loncar, D.(2006). "*Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*". *PLoS Med*, **3**(11): e442.
- Matsubara, M., Chiba, H., Maruoka, S. y Katayose, S. (2000). "*Elevated serum leptin concentrations in women with components of multiple risk factor clustering Syndrome*". *J Atheroscler Thromb*, **7**: 231-7.
- Maxfield, F.R. y McGraw, T.E. (2004). "*Endocytic recycling*". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–132.
- May, P., Herz, J. y Bock, H. H. (2005). "*Molecular mechanisms of lipoprotein receptor signalling*". *Cell Mol Life Sci*, **62**(19-20): 2325-38.
- McQueen, A.P., Zhang, D., Hu, P., Swenson, L., Yang, Y., Zaha, V.G., Hoffman, J.L., Yun, U.J., Chakrabarti, G., Wang, Z., Albertine, K.H., Abel, E.D. y Litwin, S.E. (2005). "*Contractile dysfunction in hypertrophied hearts with deficient insulin receptor signaling: possible role of reduced capillary density*". *J Mol Cell Cardiol*, **39**:882–92
- Melman, L., Geuze, H.J., Li, Y., McCormick, L.M., Van Kerkhof, P., Strous, G.J., Schwartz, A.L. y Bu, G. (2002). "*Proteasome regulates the delivery of LDL receptor-related protein into the degradation pathway*". *Mol Biol Cell*, **13**:3325–3335.
- Miinea, C.P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peranen, J., Lane, W.S., y Lienhard, G.E. (2005). "*AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain*". *Biochem. J.* **391**, 87–93.
- Mikhailenko, I., Battey, F. D., Migliorini, M., Ruiz, J. F., Argraves, K., Moayeri, M. y Strickland, D. K. (2001). "*Recognition of alpha 2-macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions*". *J Biol Chem*, **276**(42): 39484-91.
- Moestrup, S. K., Kaltoft, K., Petersen, C. M., Pedersen, S., Gliemann, J. y Christensen, E. I. (1990). "*Immunocytochemical identification of the human*

*alpha 2-macroglobulin receptor in monocytes and fibroblasts: monoclonal antibodies define the receptor as a monocyte differentiation antigen". Exp Cell Res, 190(2): 195-203.*

Moestrup, S. K. y Hokland, P. (1992). "Surface expression of the alpha 2-macroglobulin receptor on human malignant blood cells". *Leuk Res, 16(3): 227-34.*

Mueckler, M. y Thorens, B. (2013). "The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters". *Mol Aspects Med. 34(0): 121–138.*

Muratoglu, S. C., Mikhailenko, I., Newton, C., Migliorini, M. y Strickland, D. K. (2010). "Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway". *J Biol Chem, 285(19): 14308-17.*

Muretta, J. M., Romenskaia, I. y Mastick, C. C. (2008). "Insulin releases Glut4 from static storage compartments into cycling endosomes and increases the rate constant for Glut4 exocytosis". *J. Biol. Chem. 283, 311–323.*

Myers, M. G. y White, M. F. (1996). "Insulin signal transduction and the IRS proteins". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 615–658.*

Nagoshi, T., Yoshimura, M., Rosano, G.M., Lopaschuk, G.D. y Mochizuki, S.(2011). "Optimization of cardiac metabolism in heart failure". *Curr Pharm Des., 17(35):3846-53.*

Nakajima, C., Kulik, A., Frotscher, M., Herz, J., Schafer, M., Bock, H. H. y May, P. (2013). "Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes". *J Biol Chem, 288(30): 21909-23.*

Najib, S., Sánchez-Margalet, V. (2001). "Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling and glutathione has a protective effect". *J Mol Endocrinol, 27: 85-91.*

Neel, J.V. (1999). "Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? 1962". *Bull World Health Organ. , 77(8):694-703.*

Nesher, R., Cerasi, E.(2007). "Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose". *Diabetes, 51(Suppl 1):S53-9.*

- Neubauer, S. (2007). "The failing heart engine out of fuel". *N Engl J Med*, **356**:1140e1151.
- Ng, Y., Ramm, G., Lopez, J. A. y James, D. E. (2008). "Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes". *Cell Metab.* **7**, 348–356.
- Obermoeller-McCormick, L.M., Li, Y., Osaka, H., FitzGerald, D.J., Schwartz, A.L. y Bu, G. (2001) "Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein". *J. Cell Sci.* **114**(Pt 5), 899–908.
- Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C y Zuñiga, F.A. (2018). "Association between insulinresistance and the development of cardiovascular disease". *Cardiovasc Diabetol.*, **31**;17(1):122.
- Pankov, R. y Yamada, K. M. (2002). "Fibronectin at a glance". *J Cell Sci*, **115**(Pt 20): 3861-3.
- Park, Y.M., Febbraio, M., Silverstein, R.L. (2009). "CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima". *J Clin Invest.* , **119**(1):136-45.
- Park, T.S., Goldberg, I.J. (2012). "Sphingolipids, Lipotoxic Cardiomyopathy, and Cardiac Failure". *Heart Failure Clinics.*, 633–41.
- Pessin, J. E. y Saltiel, A. R. (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance". *J. Clin. Invest.* **106**, 165–169.
- Philips, D.J.W. (1996). "Insulin resistance as a programmed response to fetal Undernutrition". *Diabetología*, **39**: 1119-22.
- Pulakat, L., Aroor, A.R., Gul, R., Sowers, J.R.(2012). "Cardiac insulin resistance and microRNA modulators". *Exp Diabetes Res.*,**2012**:654904.
- Robinson, M.S. (2015) "Forty years of clathrin-coated vesicles". *Traffic*, **16**, 1210–1238.
- Rocha, V.Z., Folco, E.J. (2011). "Inflammatory concepts of obesity". *Int J Inflam.* **2011**:529061.
- Ruiz-Ramírez, A., López-Acosta, O., Barrios-Maya, M.A y El-Hafidi, M. (2016). "Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* . **2016**: 9340654.

- Rushworth, J.V., Griffiths, H.H., Watt, N.T. y Hooper, N.M.(2013). "*Prion protein-mediated toxicity of amyloid- $\beta$  oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1*". *J Biol Chem.* , **288**(13):8935-51.
- Saha, A.K., Xu, X.J., Balon, T.W., Brandon, A., Kraegen, E.W. y Ruderman, N.B. (2011). "*Insulin resistance due to nutrient excess Is it a consequence of AMPK downregulation?*". *Cell Cycle.*, **10**(20): 3447–3451.
- Saltiel, A.R. (2001). "*New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes*". *Cell*, **104**: 517-29.
- Saltiel, A. R. y Kahn, C. R. (2001). "*Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*". *Nature* **414**, 799–806.
- Salzman, N. H. y Maxfield, F. R. (1989). "*Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells*". *J Cell Biol*, **109**(5): 2097-104.
- Samouillan, V., Revuelta-López, E., Dandurand, J., Nasarre, L., Badimon, L., Lacabanne, C. y Llorente-Cortés, V. (2014). "*Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes elastin physical alteration and degradation Role of LRP1 and cathepsin S*". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **55**, 209–219.
- Samovski, D., Dhule, P., Pietka, T., Jacome-Sosa, M., Penrose, E., Son, N., Flynn, C.R., Shoghi, K., Hyc, K., Goldberg, I.J., Gamazon, E.R y Abumrad, N.A. (2018). "*Regulation of Insulin Receptor Pathway and Glucose Metabolism by CD36 Signaling*". *Diabetes* , **67**:1272–1284
- Sanchez, M. C., Luna, J. D., Barcelona, P. F., Gramajo, A. L., Juarez, P. C., Riera, C. M. y Chiabrando, G. A. (2007). "*Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*". *Exp Eye Res*, **85**(5): 644-50.
- Sánchez-Margalet V.(1999). "*Modulation of insulin receptor signaling by pancreastin in HTC hepatoma cells*". *Diabetología*, **42**: 317-25.
- Sanlioglu, A.D., Altunbas, H.A., Balci, M.K., Griffith. T.S. y Sanlioglu, S. (2013). "*Clinical utility of insulin and insulin analogs*". *Islets.*, **5**(2): 67–78.
- Sano, H. (2007). "*Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane*". *Cell Metab.* **5**, 293–303.

- Scott, C. C., Vacca, F. y Gruenberg, J. (2014). "Endosome maturation, transport and functions". *Semin Cell Dev Biol*, **31C**: 2-10.
- Sena, S., Hu, P., Zhang, D., (2009). "Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction". *J Mol Cell Cardiol*. 46:910–18.
- Shewan, A. M., van Dam, E.M., Martin, S., Bor Luen, T., Hong, W., Bryant, N.J. y James, D.E. (2003). "GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif". *Mol. Biol. Cell* **14**, 973–986.
- Shi, Y., Yamauchi, T., Gaultier, A., Takimoto, S., Campana, W. M. y Gonias, S. L. (2011). "Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1". *J Neurosci Res*, **89**(4): 544-51.
- Shi, J., Huang, G. y Kandror, K. V. (2008). "Self-assembly of Glut4 storage vesicles during differentiation of 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* **283**, 30311–30321.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., Lienhard, G. E. y James, D. E. (1991). "Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat". *J. Cell Biol.* **113**, 123–135.
- Song, H., Li, Y., Lee, J., Schwartz, A. L. y Bu, G. (2009). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9". *Cancer Res*, **69**(3): 879-86.
- Soran, H., Schofield, J.D, Adam, S., Durrington, P.N. (2016). "Diabetic dyslipidaemia". *Curr Opin Lipidol.*, 27(4):313-22.
- Sowers, J.R. (2012). "Role of TRIB3 in diabetic and overnutrition-induced atherosclerosis". *Diabetes*. ,**61**:265–6.
- Steer, C.J. y Klausner, R.D. (1983). "Clathrin-coated pits and coated vesicles: functional and structural studies". *Hepatology* **3**, 437–454.
- Strickland, D. K., Ashcom, J. D., Williams, S., Battey, F., Behre, E., McTigue, K., Battey, J. F. y Argraves, W. S. (1991). "Primary structure of alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen". *J Biol Chem*, **266**(20): 13364-9.
- Su, X., y Abumrad, N.A. (2009). "Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction". *Trends Endocrinol Metab*, **20** (2):72-7.

- Subirada, P.V., Paz, M.C., Ridano, M.E., Lorenc, V.E., Vaglianti, M.V., Barcelona, P.F., Luna, J.D. y Sánchez, M.C.(2018). “A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death”. *Eur J Neurosci.*, 47(12):1429-1443.
- Sun, Y., Bilan, P. J., Liu, Z., y Klip, A. (2010). “*Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells*”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 19909–19914.
- Sun, Y., Chiu, T.T., Foley, K.P., Bilan, P.J. y Klip, A. (2014). “*Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells*”. *Mol Biol Cell.*, **25**(7):1159-70.
- Swarnakar, S., Beers, J., Strickland, D.K., Azhar, S., Williams, D.L. (2001). “*The apolipoprotein E-dependent low density lipoprotein cholesteryl ester selective uptake pathway in murine adrenocortical cells involves chondroitin sulfate proteoglycans and an alpha 2-macroglobulin receptor*”. *J Biol Chem.*, **276**(24):21121-8.
- Takayama, Y. y Takezawa, T. (2006). “*Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors*”. *Biochem Cell Biol*, **84**(3): 268-74.
- Tanner, L. I. y Lienhard, G. E. (1987). “*Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization*”. *J. Biol. Chem.* **262**, 8975–8980.
- Tao, M.W., Moore, R., Smith, E.R. y Xu, X.(2016): “*Endocytosis and Physiology: Insights from Disabled-2 Deficient Mice*”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **25**;4:129.
- Tuunanen, H., Knuuti, J. (2011). “*Metabolic remodelling in human heart failure*”. *Cardiovasc Res.*, **90**:251–7.
- Unger, R.H. “*Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome*”. *Endocrinology*, **144**: 5159–65.
- van de Sluis, B., Wijers, M., Herz, J. (2017). “*News on the molecular regulation and function of hepatic low-density lipoprotein receptor and LDLR-related protein 1*”. *Curr Opin Lipidol.*, **28**(3):241-247.
- van de Weijer, T., Schrauwen-Hinderling, V.B., Schrauwen, P. (2011). “*Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy*”. *Cardiovasc Res.*, **92**:10–8.
- Wagner, T.y Pietrzik, C.U.(2012).“*The role of lipoprotein receptors on the physiological function of APP*”. *Exp Brain Res.* , **217**(3-4):377-87.

- Walters, J. J. y Berwin, B. (2005). "Differential CD91 dependence for calreticulin and *Pseudomonas* exotoxin-A endocytosis". *Traffic*, **6**(12): 1173-82.
- Walther, T.C., Farese, R. V. (2012). "Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism". *Annual Review of Biochemistry*, **2012**, 687–714.
- Walther, T.C., Chung, J., Farese, R.V. (2017). "Lipid Droplet Biogenesis". *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **6**;33:491-510.
- Wen, L., y Duffy, A. (2017). "Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes". *J Nutr.*, **147**(7): 1468S–1475S.
- Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., Tataranni, P.A. (2001). "Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia". *J Clin Endocrinol Metab*, **86**: 1930-5.
- Williams, S.E., Ashcom, J. D., Argraves, W. S y Strickland, D. K. (1992). "A novel mechanism for controlling the activity of  $\alpha 2$ -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein: multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein," *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 13, 9035–9040.
- Wilcox, G. (2005). "Insulin and Insulin Resistance". *Clinical Biochemist Reviews.*, **26**(2):19-39.
- Willnow, T.E., Rohlmann, A., Horton, J., Otani, H., Braun, J.R., Hammer, R.E. y Herz, J. (1996). "RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors". *EMBO J.*, **15**(11):2632-9.
- Witteles, R.M., Fowler, M.B. (2008). "Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options". *J Am Coll Cardiol.*, **51**:93–102.
- Whiteman, E. L., Cho, H. y Birnbaum, M. J. (2002). "Role of Akt/protein kinase B in metabolism". *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 444–451.
- Wong, C., Marwick, T.H. (2007). "Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology". *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, **4**:436–43.
- Wu, L. y Gonias, S. L. (2005). "The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts". *J Cell Biochem*, **96**(5): 1021-33.

- Xian, X., Ding, Y., Dieckmann, M., Zhou, L., Plattner, F., Liu, M., Parks, J.S., Hammer, R.E., Boucher, P., Tsai, S. y Herz, J. (2017). "*LRP1 integrates murine macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responses in Atherosclerosis*". *eLife*, **6**, e29292.
- Xie, X., Gong, Z., Mansuy-Aubert, V., Zhou, Q.L., Tatulian, S.A., Sehr, D., Gnad, F., Brill, L.M., Motamedchaboki, K., Chen, Y., Czech, M.P., Mann, M., Krüger, M., Jiang, Z.Y. (2011). "*C2 domain containing phosphoprotein CDP138 regulates GLUT4 insertion into the plasmamembrane*". *Cell Metab.*, **7**;14(3):378-89.
- Xu, Y., Rubin, B.R., Orme, C.M., Karpikov, A., Yu, C., Bogan, J.S., y Toomre, D.K. (2001). "*Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis*". *J. Cell Biol.* **193**, 643–653.
- Xu, S., Zhangb, X., Liu, P. (2017). "*Lipid droplet proteins and metabolic diseases*". *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, **1864**(5):1968-1983.
- Yang, J. y Holman, G. D. (1993). "*Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells*". *J. Biol. Chem.* **268**, 4600–4603.
- Yamada, E., Okada, S., Saito, T., Ohshima, K., Sato, M., Tsuchiya, T., Uehara, Y., Shimizu, H. y Mori, M. (2005). "*Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles*". *J Cell Biol.*, **168**(6):921-8.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F.R., Butler, A.E. y Sahebkar, A.J. (2018). "*Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms*". *Cell Physiol.*
- Young, M. E., McNulty, P. y Taegtmeyer, H. (2002). "*Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms*." *Circulation*, **105**(15): 1861-70.
- Zhang, H., Links, P.H., Ngsee, J.K., Tran, K., Cui, Z., Ko, K. y Yao, Z. (2004). "*Localization of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 to Caveolae in 3T3-L1 Adipocytes in Response to Insulin Treatment*". *J Biol Chem.*, **279**(3):2221-30.
- Zhang, J., Gao, Z., Yin, J., Quon, M.J. y Ye, J. (2008). "*S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2*". *J Biol Chem.*, **283**:35375–35382.

- Zeigerer, A., Lampson, M.A., Karylowski, O., Sabatini, D.D., Adesnik, M., Ren, M. y McGraw, T.E. (2002). "*GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps*". *Mol. Biol. Cell* **13**, 2421–2435.
- Zeigerer, A., McBrayer, M. K. y McGraw, T. E. (2004). "*Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160*". *Mol. Biol. Cell* **15**, 4406–4415.