

Revista de Endocrinología y Nutrición

Volumen
Volume **13**

Número
Number **4**

Octubre-Diciembre
October-December **2005**

Artículo:

El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, AC

Otras secciones de este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

Others sections in this web site:

-  [*Contents of this number*](#)
-  [*More journals*](#)
-  [*Search*](#)



medigraphic.com



Artículo de revisión

El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular

Raúl A Bastarrachea,* Hugo Laviada-Molina,** Ildefonso Machado-Domínguez,*** Jack Kent Jr,* Juan Carlos López-Alvarenga,* Anthony G Comuzzie*

- * Department of Genetics Auxology and Metabolism Working Group Southwest Foundation for Biomedical Research. San Antonio, Texas, USA.
** Departamento de Nutrición y Metabolismo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.
*** Colegio Peninsular de Nutrición Clínica y Obesidad, A.C. Mérida, Yucatán, México.

Correspondencia:
Raúl A. Bastarrachea, M.D.
Department of Genetics
Southwest Foundation for Biomedical Research.
7620 NW Loop 410 at Military Drive
San Antonio, Texas, USA 78227-5301
E-mail: raulbs@darwin.sfbr.org

Fecha de recepción: 31-Diciembre-2005
Fecha de aceptación: 23-Enero-2006

Resumen

Las acciones de la insulina inician con su acoplamiento al receptor de insulina (IR), una proteína de membrana heterotetramérica unida por disulfuros. La insulina se une a dos sitios asimétricos de las subunidades extracelulares **alpha** y ocasiona cambios conformacionales que dan lugar a la autofosforilación de las subunidades **beta** que se insertan a través de la membrana, y a la activación de la tirosina cinasa intrínseca del receptor. Los receptores de la insulina transfosforilan varios sustratos subyacentes (en los residuos Tyr), incluyendo los sustratos proteicos del receptor de insulina (IRS). Estos eventos dan lugar a la activación de moléculas de señalización en el interior del citosol. La función del receptor de tirosina cinasa es esencial para los efectos biológicos de la insulina. La patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 es compleja e involucra el desarrollo progresivo de resistencia a la insulina así como defectos en la secreción de la insulina, la cual conduce con el tiempo hacia la hiperglucemia franca. Las bases moleculares para la aparición de resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2 permanecen aún pobemente comprendidas. Aun con esto, el papel de la resistencia a nivel hepático y en tejidos periféricos a la insulina en la patogénesis de la diabetes es indiscutible. La resistencia a la insulina puede deberse a múltiples defectos en la transducción de las señales (como por ejemplo, la activación defectuosa del receptor insulínico de tirosina cinasa y la activación disminuida de la fosfatidilinositol-3-OH cinasa estimulada por insulina (PI-3K)). Un número sustancial de objetivos moleculares están siendo investigados hoy en día como estrategia para aumentar la transducción de señales mediadas por la insulina. Los nuevos enfoques se encuentran dirigidos a inhibir las vías enzimáticas que desactivan el receptor de insulina, o a sus efectores intrasitosólicos subyacentes como las proteínas IRS. De esta manera, se han podido identificar proteínas de tirosin-fosfatasa específicas (PTPs) como objetivos genéticos, entre otras.

Palabras clave: Fosfatasa de protein-tirosina (PTPs), cinasa de glucógeno-sintetasa-3 (GSK-3), inositol-5 fosfatasa tipo 2 con dominio SH-2 (SHIP2), cinasa IκB (IKK), proteincinasa C-θ (PKC-θ).

Revista de Endocrinología y Nutrición 2005; 13(4):180-189

Abstract

The actions of insulin are initiated by its binding to the insulin receptor (IR), a disulfide-bonded heterotetrameric membrane protein. Insulin binds to two asymmetric sites on the extracellular α subunits and causes conformational changes that lead to autophosphorylation of the membrane-spanning β subunits and activation of the receptor's intrinsic tyrosine kinase. Insulin receptors transphosphorylate several immediate substrates (on Tyr residues) including insulin receptor substrate (IRS) proteins. These events lead to the activation of downstream signaling

molecules. The function of the receptor tyrosine kinase is essential for the biological effects of insulin. The pathogenesis of type 2 diabetes mellitus is complex, involving progressive development of insulin resistance and a defect in insulin secretion, which leads to overt hyperglycemia. The molecular basis for insulin resistance in type 2 diabetes remains poorly understood. However, the role of peripheral and hepatic insulin resistance in the pathogenesis of diabetes is undisputed. Insulin resistance can be due to multiple defects in signal transduction (such as impaired activation of insulin receptor-tyrosine kinase and reduced activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K). A number of molecular targets are now being investigated as ways of enhancing insulin-mediated signal transduction. New approaches to targeting the insulin receptor itself would be to inhibit enzymes responsible for deactivation of the receptor or downstream targets in the signalling pathway (for example, IRS proteins). A number of specific protein tyrosine phosphatases (PTPs) have been identified as candidate targets, among others.

Key words: Protein tyrosine phosphatases (PTPs), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase type 2 (SHIP2), $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase (IKK), protein kinase C- θ (PKC- θ).

Revista de Endocrinología y Nutrición 2005; 13(4):180-189

"De un exceso de grasa la diabetes comienza y de un exceso de grasa el diabético muere" EP Joslin, 1927

INTRODUCCIÓN

La epidemia de diabetes tipo 2 y la alteración en la tolerancia a la glucosa, son dos de las principales causas de enfermedad y mortalidad en todo el mundo. En ambos desórdenes, tejidos tales como los músculos, la grasa y el hígado, responden menos o son resistentes a las acciones de la insulina. Este defecto está también vinculado a otros problemas comunes de salud, como obesidad, síndrome de ovarios poliquísticos, hiperlipidemia, hipertensión y aterosclerosis. La fisiopatología de la resistencia a la insulina involucra una compleja red de vías de señalización activados por el receptor de insulina, el cual regula el metabolismo intermedio y su organización en el interior de las células.

A pesar de que los mamíferos, y en especial los humanos, experimentan períodos de ayuno y de alimentación (estado postprandial), la variación de la glucosa plasmática se mantiene en un rango estrecho entre 4 y 7 mM en individuos normales. Este rango tan estricto y constante se encuentra bajo el control y equilibrio entre la absorción de glucosa desde el intestino, la producción de glucosa hepática y su absorción y metabolismo en los tejidos periféricos. La insulina incrementa la absorción de glucosa en músculo y en el tejido adiposo, e inhibe la producción hepática, actuando de esta manera como el regulador primario de la concentración de glucosa en la sangre. La insulina estimula también el crecimiento y la diferenciación celular y promueve el almacenamiento de sustratos en el adipocito, hígado y músculo al estimular la lipogénesis, la síntesis de proteínas y glucógeno, e inhibiendo la lipólisis, la glucogenólisis y la catabolía proteica. La resistencia a la insulina o

deficiencia de la misma, es el resultado de una profunda alteración en la regulación de estos procesos, cuya consecuencia da lugar a elevaciones deletéreas en los niveles de glucosa y lípidos en ayunas y postprandiales. La insulina es la hormona anabólica más potente conocida y promueve la síntesis y el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, al mismo tiempo que inhibe su degradación y liberación al torrente circulatorio. La insulina estimula la absorción de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos al interior de las células e incrementa la expresión o actividad de enzimas que catalizan la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, inhibiendo al mismo tiempo la actividad o expresión de aquellas que catalizan su degradación.

La insulina incrementa la captación de glucosa en las células al estimular la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde sitios intracelulares hasta la superficie celular. Prácticamente el 75% de la utilización de glucosa estimulada por insulina ocurre en el músculo esquelético, en tanto que el tejido adiposo es responsable de apenas una pequeña fracción del total utilizado.¹ A pesar de estos conceptos, se ha podido documentar que roedores manipulados genéticamente por técnicas de knockout en la que se elimina la funcionalidad y expresión genética del receptor de insulina en el músculo, tienen una tolerancia normal a la glucosa,² en tanto que aquellos en los que se elimina el transportador de glucosa sensible a insulina en grasa presentan tolerancia alterada a la glucosa, aparentemente debido a resistencia a la insulina inducida en músculo e hígado.³ Tanto la obesidad como la lipoatrofia, también ocasionan resistencia a la insulina y una predisposición a la diabetes tipo 2 demostrando que el tejido adiposo es crucial para la regulación del metabolismo de los carbohidratos más allá de su capacidad en captar glucosa. Aunque la insulina no estimula la captación de glucosa

en hígado, bloquea la glucogenólisis y la gluconeogénesis y estimula la síntesis de glucógeno, regulando de esta manera los niveles de glucosa en ayuno. La acción de la insulina en tejidos que no son considerados normalmente como sensibles a la insulina, incluyendo el cerebro y las células beta pancreáticas, son también importantes en la homeostasis de glucosa.^{4,5}

ACCIONES DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA A NIVEL MOLECULAR

La insulina circulante rápidamente alcanza sus tejidos blanco donde interactúa con su receptor correspondiente. El receptor de la insulina (InsR), el cual es ampliamente expresado, es una cinasa de tirosina transmembrana (Tir) que es expresado como un tetrámero en una configuración $\alpha_2\beta_2$.^{6,7} La insulina, al unirse a las regiones específicas de la subunidad α , da lugar a un inmediato cambio configuracional en el receptor que ocasiona la autofosforilación de los residuos específicos Tir en la región intracelular de las subunidades β a través de un mecanismo de transfosforilación. La autofosforilación da lugar a la activación en la actividad de la cinasa Tir del receptor.⁸ En el estado inactivo, el sitio catalítico de la cinasa Tir es bloqueado por un "circuito de activación" que previene el acceso de ATP y varios sustratos. La autofosforilación de residuos Tir en las posiciones 1,158, 1,162 y 1,163 en el "circuito de activación" ocasiona un cambio conformacional que permite al ATP y los sustratos alcanzar el sitio catalítico.^{9,10} La cinasa activada del receptor de insulina fosforila proteínas sustrato en los residuos Tir, y estos residuos Tir fosforilados sirven como sitios de acoplamiento para los efectores del receptor, que posteriormente transmitirán la señalización molecular intracitosólica hacia el núcleo celular. Se han podido identificar genes que expresan proteínas como las moléculas Shc, las proteínas que integran los sustratos del receptor de insulina (IRS), y Gab-1 entre otras, las cuales se enganchan directamente al receptor de insulina, proporcionando un área física de acoplamiento para los sustratos encargados de transmitir la señalización del receptor hacia el interior del citosol.

Las proteínas del receptor de insulina denominadas IRS contienen un dominio conservado PH localizado en la porción terminal proteica -NH₂, cuya función es mantener a las proteínas del receptor IRS unidas y en proximidad cercana al receptor.^{11,12} Las proteínas IRS también cuentan con otro dominio de unión fosfato-Tir denominado PTB con una porción terminal proteica COOH- cercana al dominio PH. El dominio PTB, presente en un número importante de moléculas de señalización,¹³ comparte una secuencia de casi el 75% idéntica¹⁴ a las proteínas del receptor de insulina IRS-1 y IRS-2, y funciona como un

elemento de acoplamiento para promover la interacción entre el receptor de insulina y la proteína IRS-1.^{15,16} La región terminal COOH- de las proteínas IRS se encuentra pobremente conservada. Contiene múltiples diseños (motifs) de fosforilación Tir cuya función es servir como sitios de acoplamiento para proteínas que contienen dominios SH2, como serían la subunidad reguladora p85 α de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K), el receptor del factor de crecimiento de la proteína-2 de unión (Grb2), Nck, Crk, Fyn, SHP-2 y otras, todas las cuales intervienen como mediadoras en las funciones metabólicas y en las funciones promotoras de crecimiento de la insulina.¹⁷

La señalización del receptor de insulina involucra dos vías principales: la vía de la proteína cinasa activadora de la mitogénesis (MAP) denominada la vía mitogénica y la fosfatidilinositol-3-OH cinasa estimulada por insulina (PI-3K) denominada la vía metabólica. Aunque estas vías son descritas en un contexto lineal, debe de tenerse en cuenta que cada una de estas vías podría, bajo ciertas circunstancias, activar la otra y viceversa. La vía de las MAP cinasas es activada cuando se une Grb2 a Shc Tir-fosforilado, o a IRS vía su dominio SH2. A su vez, Grb2 se encuentra ligada a una proteína de intercambio de nucleótidos denominada Son of Sevenless o mSOS de mamíferos, que cataliza el intercambio de GDP por GTP en una pequeña proteína GTPasa denominada Ras, resultando en su activación. La proteína Ras activada se une a la parte interna de la membrana plasmática, reclutando y uniendo a la membrana plasmática, la región NH₂-terminal de otra proteína denominada Raf. La interacción Ras-Raf desplaza las proteínas 14-3-3 que están ligadas a Raf y permite la fosforilación de Raf por un número de cinasas Ser/Tr, desinhibiendo y liberando de esta manera la cinasa Raf.¹⁸ Raf-1 activa una cinasa de especificidad dual, la MEK1, al fosforilar dos residuos regulatorios Ser. Así mismo, MEK1 activa otras dos cinasas reguladoras de señales extracelulares denominadas ERK-1 y ERK-2 al fosforilar residuos regulatorios Tir y Tr.¹⁹ Este paso es sumamente importante, ya que las señales ERK activadas son las mediadoras de los efectos mitogénicos y anabólicos de la insulina, ya que inducen la fosforilación de factores de transcripción nucleares tales como Elk-1, llevando a la inducción de la expresión de genes cuyos efectos se relacionan con las acciones de factor de crecimiento tisular de la insulina.

La respuesta metabólica a la insulina es mediada principalmente por la vía de la PI-3K. La secuencia de eventos moleculares se encuentra ya bien caracterizada e inicia con la asociación del complejo de proteínas p85/p110 de la PI-3K con las proteínas del IRS. La activación de PI-3K estimula la producción de una enzima denominada PIP3, activando a su vez PDK1.^{20,21} Esta enzima fosforila y activa la proteína Akt, y este es el paso importante en el transporte de glucosa al interior de la célula, facilitado por la

insulina. Akt interviene en la regulación de la translocación de GLUT4, el transportador de glucosa más importante sensible a la insulina que se expresa en músculo y las células adiposas.^{22,23} Así mismo, ha sido interesante el poder documentar que la Akt podría no ser la única cinasa intracitosólica o "segundo mensajero" que interviene en la regulación de la translocación de GLUT4 a la superficie de la célula. Las isoformas de la proteincinasa C (PKC) δ y γ son activadas también por PI-3K y PDK1 e intervienen en la regulación de la translocación de GLUT4^{24,25} (Figura 1).

VÍAS PROXIMALES DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR INSULÍNICA

El receptor de la insulina. El receptor de la insulina pertenece a una subfamilia de receptores de tirosina-cinasas que incluyen el receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF)-I y el receptor relacionado con el receptor de insulina (IRR). Como hemos mencionado, estos receptores son proteínas tetraméricas que consisten en dos subunidades α y dos subunidades β que funcionan como enzimas alostéricas en la que la subunidad α inhibe la actividad de la tirosina-cinasa de la subuni-

dad β . Al unirse la insulina a la subunidad α , ocurre una desinhibición y una transfosforilación en la actividad de la tirosina-cinasa, seguida de un cambio conformacional en la subunidad β , que incrementa la actividad de la enzima y provoca la señalización de la insulina al interior de la célula.²⁶ Los receptores de insulina, de IGF-I y de IRR, pueden formar híbridos funcionales. Por ello, una mutación inhibitoria en un receptor puede inhibir la actividad de los otros receptores.²⁷

Homólogos del receptor de insulina y del receptor de IGF-I han sido identificados en la mosca *Drosophila*, en *Caenorhabditis elegans*, y en esponjas marinas metazoarios.²⁸ Estos organismos inferiores utilizan muchas de las vías de señalización intracelular de la insulina críticas para la regulación molecular de señalización insulínica en células de mamíferos incluyendo a humanos, entre las cuales figuran la fosfatidilinositol-3-OH cinasa (PI-3K), la Akt, y factores de transcripción bifurcados denominados forkhead. Se ha podido documentar que cuando se identifican polimorfismos inhibitorios de los receptores de insulina/IGF-I en *C. elegans*, estos animales mutantes viven más tiempo que sus contrapartes normales que no cursan con estas mutaciones en dichos receptores, dando

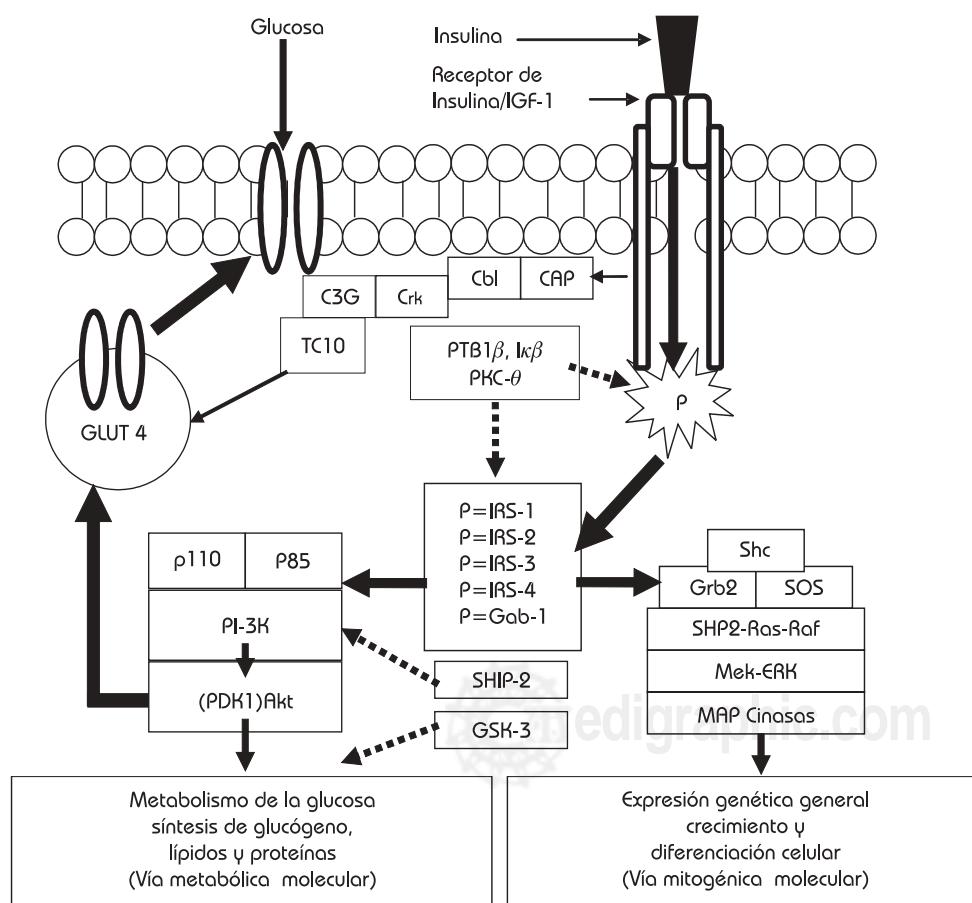


Figura 1. Vías moleculares de señalización de la insulina. Flechas punteadas: Inhibición de la señalización (resistencia a las acciones de la insulina). Flechas continuas: Señalización apropiada (sensibilidad a las acciones de la insulina).

lugar a las teorías que asocian la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina con condiciones que acortan el tiempo y la calidad de vida, como obesidad, diabetes y aterosclerosis acelerada.

Para resumir, el receptor de insulina es una cinasa de tirosina que sufre autofosforilación, catalizando a su vez la fosforilación de proteínas celulares tales como los miembros de la familia IRS, Shc, y Cbl. Inmediatamente después de su tirosin-fosforilación, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización intracitosólicas a través de sus dominios SH2, dando lugar a una amplia serie de vías de señalización molecular en el citosol que transmiten el mensaje de la insulina hacia factores de transcripción en la membrana nuclear. Esta activación molecular de las señalizaciones principalmente incluye la activación de PI-3K, Ras y la cascada de las MAP cinasas y la activación de Cbl/CAP y de TC10. Estas vías moleculares actúan de forma integrada y con alta precisión para coordinar la regulación del tráfico vesicular, la síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas clave y principalmente la expresión genética desde el núcleo, cuyo resultado final es la regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas (*Figura 1*).

Substratos del receptor de insulina. Al menos nueve sustratos intracelulares de las cinasas del receptor de insulina/IGF-I han sido identificados. Cuatro de estos sustratos pertenecen a la familia de las proteínas IRS del receptor de insulina.²⁹ Otros sustratos incluyen Gab-1, p60dok, Cbl, APS, e isoformas de Shc.³⁰ Las tirosinas fosforiladas en estos sustratos actúan como zonas de acoplamiento para proteínas que contienen dominios de SH2. Muchas de estas proteínas SH2 son moléculas que funcionan como adaptadores, como serían la proteína de la subunidad reguladora p85 de PI-3K y de Grb2, o como CrkII, la cual activa pequeñas proteínas G al unirse a factores de intercambio de nucleótidos. Otras son enzimas propiamente dichas y se incluye en esta categoría a la fosfatasa de fosfotirosina SHP2 y la cinasa de tirosina citoplasmática Fyn. Los sustratos que se unen a estas proteínas SH2 pueden regular la actividad de dichas enzimas o también indicar su ubicación subcelular.

Aunque las proteínas IRS son altamente homólogas, estudios recientes en roedores en los que se les eliminan los genes que las expresan por técnicas de knockout y experimentos que utilizan líneas celulares, sugieren que las IRS desempeñan acciones complementarias, no redundantes, en la señalización del receptor de insulina/IGF-I. Roedores en los que se ha eliminado por knockout el gen que expresa la proteína específica IRS-1 exhiben un retardo generalizado en su crecimiento pre- y postnatal, así como resistencia a la insulina en tejidos periféricos y tolerancia alterada a la glucosa.^{31,32} Ratones con eliminación por knockout del gen IRS-2 también exhiben

resistencia a la insulina tanto en tejidos periféricos como en hígado, pero solamente presentan alteraciones en el desarrollo y crecimiento en algunos tejidos, incluyendo ciertas regiones del cerebro, islotes pancreáticos y retina.³³ En el roedor IRS-2(-/-), esta resistencia multifactorial a la insulina combinada con una disminución de la masa total de células β pancreáticas da lugar al desarrollo de la diabetes tipo 2.³⁴ Por el contrario, los ratones con eliminación del gen IRS-3 e IRS-4 tienen un crecimiento y metabolismo normal o cercano a lo normal.³⁵ Las diferentes proteínas IRS parecen desempeñar funciones distintas a nivel celular, probablemente debido a diferencias en su distribución en tejidos, a su localización subcelular y la actividad intrínseca de estas proteínas. Las células con eliminación (knockout) del gen IRS-1 exhiben un estímulo muy disminuido para inducir la síntesis de DNA codificado para a su vez inducir la expresión de IGF-I y son incapaces para diferenciarse en adipocitos en cultivos celulares.^{36,37} La eliminación (knockout) en las células del gen que expresa IRS-2 da como resultado un defecto muy importante en el transporte de glucosa estimulada por la insulina. Los papeles de IRS-3 e IRS-4 son menos claros en cultivos celulares, pero la evidencia sugiere que estos sustratos podrían actuar como reguladores negativos de IRS-1 e IRS-2.³⁸

Inhibición de la señalización del receptor de insulina. En adición a su fosforilación de tirosina, tanto el receptor de insulina como las proteínas IRS son altamente sensibles a padecer fosforilaciones de serina, las cuales pueden fuertemente atenuar o abolir la vía de señalización intracitosólica de la insulina al disminuir o interrumpir la fosforilación de tirosina mediada por la insulina³⁹ y promover también interacciones con las proteínas 14-3-3.⁴⁰ Estas fosforilaciones inhibitorias proveen de retroalimentación negativa a la señalización de la insulina y sirven como un mecanismo molecular puente para la comunicación cruzada de otras vías intracitosólicas que ocasionan resistencia a la insulina. Varias cinasas han sido implicadas en este proceso incluyendo la PI-3K, Akt, la cinasa glucógeno-sintetasa GSK-3 y el receptor en mamíferos de rapamicina (mTOR). Datos muy recientes indican que la atenuación de la señalización de insulina inducida por defectos en función del tejido adiposo podría quizás desencadenarse a través de otras vías moleculares y genómicas que ocasionan la activación secuencial de la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa del inhibidor del factor nuclear- $\kappa\beta$ (Ik β).^{41,42}

La acción de la insulina también es atenuada por proteínas fosfatases de tirosina (PTPasas), las cuales catalizan una rápida desfosforilación del receptor y sus substratos. Un buen número de ATPasas han sido identificadas, su función se dirige a catalizar la desfosforilación del re-

ceptor de la insulina *in vitro*, se ha determinado también que son expresadas en células insulino-sensibles y que principalmente se sobreexpresan en estados de resistencia a la insulina. La mayor atención se ha enfocado en la fosfatasa citoplásmica PTP1B. La eliminación (knockout) del gen que expresa PTP1B da lugar a una fosforilación de tirosina incrementada en el receptor de insulina y sus proteínas IRS en músculo, mejorando notablemente su sensibilidad a la insulina.⁴³ Los ratones PTP1B-/ son resistentes a la obesidad inducida por dieta, sugiriendo que el cerebro es otro sitio importante de sus acciones. Esta combinación de efectos implica a la proteína PTP1B como un objetivo terapéutico potencial en la diabetes y la obesidad.

Acciones de la insulina y PI-3K. La PI-3K tiene un papel esencial en las acciones metabólicas y mitogénicas de la insulina y del IGF-I.⁴⁴ Los inhibidores de clase para la PI-3K, así como transfecciones genéticas con constructores negativos dominantes de la enzima, bloquean la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, incluyendo la estimulación del transporte de glucosa, y la síntesis de lípidos y glucógeno. La PI-3K consiste en una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85 que posee dos áreas de dominio SH2 que interactúan con diseños (motifs) de tirosina fosforilada en las proteínas IRS.⁴⁵ Se han identificado cuando menos ocho isoformas de las subunidades reguladoras. Éstas derivan de tres genes (p85 α , p85 β , y P55pik).⁴⁶ La p85 α es la que predomina y se considera la vía más importante en la respuesta a los estímulos.^{47,48} La fosfatidilinositol-3 fosfato (PI-3K) regula tres clases principales de moléculas de señalización: la familia AGC de cinasas proteicas de serina/treonina,⁴⁹ proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina de la familia de GTPasas Rho,⁵⁰ y la familia TEC de tirosina- cinasas.⁵¹ La mejor caracterizada de las cinasas AGC es la cinasa dependiente de fosfoinositida 1 (PDK1), una de las cinasas de serina que fosforila y activa la cinasa de serina/treonina Akt/PKB.⁵² Se ha sugerido que Akt es clave importante en la transmisión de la señal intracitosólica de la insulina al fosforilar la enzima GSK-3 y la proteína vinculadora del elemento de respuesta a cAMP.^{53,54} Aunque estudios que han utilizado formas inhibitorias o activadoras de Akt no han inhibido o estimulado uniformemente las acciones de la insulina,⁵⁵ la eliminación de Akt2 produce una profunda resistencia hepática a la insulina en ratones.⁵⁶ Otras cinasas AGC, que se encuentran más profundamente localizadas en el citosol al final de la vía señalizadora de la PI-3K, incluyen las 2 atípicas PKCs: PKC ζ y PKC λ .⁵⁷ La Akt y/o las PKCs atípicas parecen ser requeridas para el transporte de glucosa inducida por la insulina.

Cascadas de fosforilación estimuladas por la insulina. Como es el caso de otros factores de crecimiento, la

insulina estimula la protein-cinasa activadora de la mitogénesis (MAPK) para a su vez estimular la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). Esta vía involucra la tirosin-fosforilación de las proteínas IRS y/o Shc, que a su vez interactúan con la proteína adaptadora Grb2, reclutando a la proteína de intercambio Son-of-sevenless (SOS) hacia la membrana plasmática para activar la proteína Ras. La activación de Ras requiere también la estimulación de la tirosina fosfatase SHP2, a través de su interacción con sustratos del receptor como Gab-1 o IRS1/2. Una vez activada, la proteína Ras opera como un interruptor (switch) molecular, estimulando a su vez una cascada de serin-cinasa a través de la activación secuencial de las proteínas Raf, MEK y ERK. La activación de ERK la transloca e introduce al interior del núcleo en donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción como p62TCF iniciando un programa transcripcional que da lugar a la proliferación y diferenciación celular.⁵⁸ El bloqueo de esta vía con mutantes proteicos negativos dominantes o inhibidores farmacológicos impide y previene la estimulación del crecimiento y diferenciación celular estimulado por la insulina, pero no tiene ningún efecto en las acciones metabólicas de la hormona⁵⁹ (Figura 1).

LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA COMO OBJETIVO MOLECULAR TERAPÉUTICO

Los actuales enfoques terapéuticos para tratar la diabetes tipo 2 se desarrollaron en ausencia de objetivos moleculares definidos o sin una comprensión sólida de la patogénesis de la enfermedad. En los últimos años, el conocimiento de las vías moleculares y bioquímicas relacionados con la génesis de los fenotipos de riesgo cardiovascular denominados síndrome metabólico se ha expandido enormemente. Existe un amplio abanico de objetivos moleculares para el desarrollo de fármacos a lo largo de estas vías de señalización genómico-molecular, han sido lenta pero constantemente identificadas en base a sus acciones celulares para la modulación de uno o más aspectos claves de la patogénesis de la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico. Han dado lugar a poder considerar varias categorías mecanísticas para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos. Entre ellas están los enfoques dirigidos a reducir la excesiva producción de glucosa por el hígado; otras son los mecanismos para aumentar la secreción de insulina estimulada por glucosa; otra categoría involucra a objetivos moleculares específicos en las vías de señalización de la insulina (motivo de este manuscrito); y una más dirigida a nuevos enfoques para tratar la obesidad y el metabolismo alterado de los lípidos que ofrece la perspectiva de mejorar las acciones (o la secreción) de la insulina⁶⁰ (Figura 2).

Un enfoque para abordar al mismo receptor de insulina como objetivo terapéutico sería la inhibición de las enzimas responsables de la desactivación del receptor o enzimas responsables de inhibir las vías de señalización insulinica intracitosólica (por ejemplo, las proteínas IRS).

Se ha identificado un número de protein-tirosin fosfatas específicas (PTPs) como candidatas para ser objetivos farmacológicos.⁶¹ El vanadio, el peroxovanadio y sus derivados son inhibidores PTPs no selectivos. Ya se ha podido demostrar la eficacia a la sensibilización de la insulina por el sulfato de vanadilo en humanos, situación que sugiere que una o más PTPs pueden ser objetivos viables farmacogenómicos.⁶² La PTP-1B es una enzima intracelular específicamente implicada en la regulación negativa de la señalización de la insulina. Resultados recientes han demostrado que la eliminación (knockout) genética de PTP-1B valida a las PTPs como fuerte objetivo potencial. Los roedores mutantes a los que se les ha eliminado el gen que expresa la proteína PTP-1B son saludables y presentan una marcada sensibilidad a las acciones de la insulina. Sorprendentemente, estos roedores también muestran una resistencia sustancial a la obesidad inducida por dietas.⁶³ Una validación adicional de PTP-1B como un objetivo farmacogenómico ha sido proporcionada por la evidencia de una acción incrementada de la insulina en ratas resistentes a la insulina tratadas con un oligonucleótido antisentido para PTP-1B. Este tratamiento pare-

ce haber funcionado con inyecciones del oligonucleótido una o dos veces a la semana y podría ser un enfoque viable para ensayar en humanos.⁶⁴

Otros reguladores negativos para las acciones celulares de la insulina han sido identificados recientemente como objetivos farmacogenómicos también. La glucógeno-sintetasa-kinase-3 (GSK-3) tiene un claro papel en contraponerse a los efectos de la insulina, al inhibir la activación de glucógeno-sintetasa y ocasionar la subsecuente acumulación de glucógeno en el músculo.⁶⁵ Resultados recientes con potentes y selectivos inhibidores sugieren que al reducir la actividad *in vivo* de la GSK-3 podría incrementarse la acción de la insulina, pudiendo esto ocurrir a múltiples niveles.⁶⁶

La 5-fosfatasa tipo 2 con un dominio inositol-SH2 (SHIP2) parece actuar desfosforilando fosfolípidos claves por ejemplo, fosfatidilinositol-3 fosfato generado por la activación de la PI-3K mediada por insulina. La SHIP2 ha sido implicada recientemente como objetivo antidiabetes ya que ratones heterocigotos con eliminación del gen que expresa a esta enzima proteica muestran una sensibilidad marcadamente aumentada a las acciones de la insulina.⁶⁷

Un nuevo e interesante objetivo molecular potencial antidiabetes ha sido revelado recientemente.^{68,69} Dos líneas de evidencia han indicado el importante papel de la cinasa IκB (IKK) como una potente mediadora de una fosforilación aumentada de treonina o serina, cuyo potencial

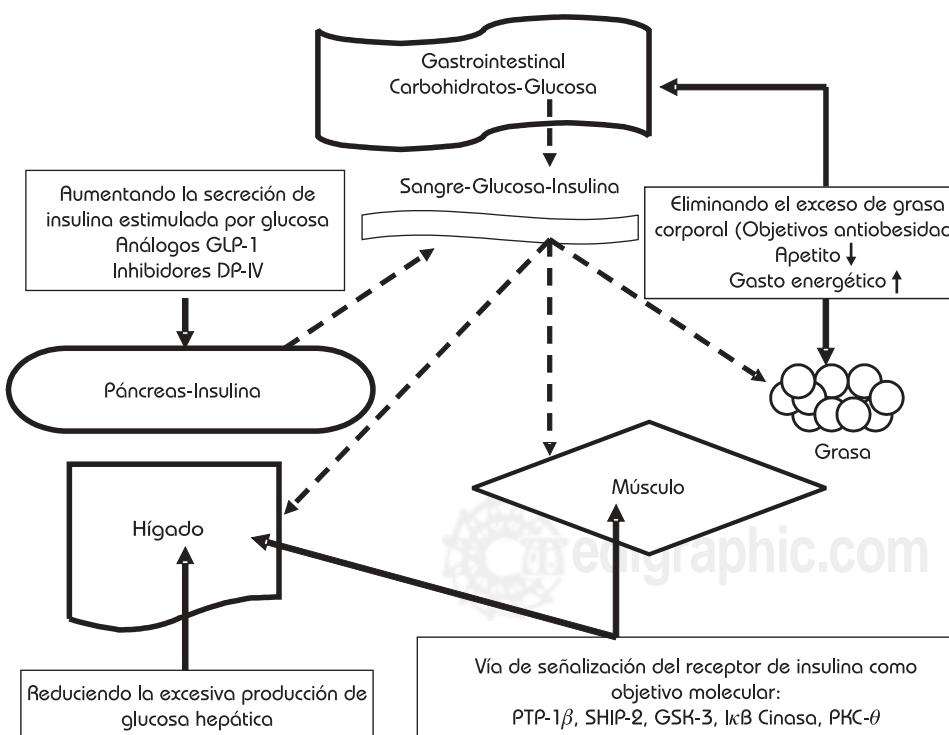


Figura 2. Farmacogenómica antidiabesidad.

Categorías mecanísticas dirigidas a objetivos moleculares específicos. (Las flechas punteadas indican el flujo de glucosa e insulina desde el sistema gastrointestinal y el páncreas a través del torrente sanguíneo, hacia el tejido adiposo, músculo e hígado).

en disminuir la señalización a las acciones moleculares de la insulina es conocido ampliamente. En primer lugar, altas dosis de salicilato puede producir una mayor sensibilidad a las acciones de la insulina y se asocian a una inhibición de la expresión de IKK, y en segundo lugar, roedores mutantes con eliminación de la expresión genética de IKK presentan un fenotipo único de sensibilidad aumentada a la insulina. Como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) (ampliamente identificado como mediador de resistencia a la insulina asociada a la obesidad)⁷⁰ puede activar el complejo IKK/NF- κ B, la implicación del papel específico que desempeña IKK en la resistencia a la insulina mediada por TNF- α parece ser inobjetable.

De manera similar, la protein-cinasa-θ (PKC-θ) podría ser un objetivo terapéutico molecular adicional, ya que una actividad incrementada de PCK-θ en músculo se ha observado en el contexto de resistencia a insulina inducida por ácidos grasos.⁷¹

CONCLUSIÓN

La diabetes tipo 2 es precedida por un largo período de tolerancia alterada a la glucosa (IGT), resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria, estados metabólicos potencialmente reversibles asociados con un riesgo incrementado de complicaciones macrovasculares. Al momento del diagnóstico, más de una tercera parte de los pacientes ya han desarrollado las complicaciones de la diabetes a largo plazo. Factores genéticos y adquiridos contribuyen a la patogénesis de la diabetes tipo 2. Las características distintivas fisiopatológicas consisten en resistencia progresiva a la insulina, agotamiento progresivo de las células beta pancreáticas y excesiva producción de glucosa hepática. El tratamiento ideal para la diabetes tipo 2 debería ser corregir la resistencia a la insulina, la disfunción de las células beta y normalizar la producción hepática de glucosa, así como también prevenir, retrasar o revertir las complicaciones propias de la diabetes. Enfoques emergentes para la terapéutica de la diabetes tipo 2 incluyen objetivos moleculares específicos en las vías celulares de señalización de la insulina (PTP-1B, SHIP-2, GSK-3, IκB cinasa y PKC-θ). Un enfoque farmacogenómico dirigido a un nivel molecular para intentar corregir los múltiples procesos fisiopatológicos subyacentes ofrece una mejor oportunidad futura para el control de la diabetes y sus complicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990; 13: 228-243.
2. Bruning JC et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 1998; 2: 559-569.
3. Abel ED et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001; 409: 729-733.
4. Gavrilova O et al. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipodystrophic mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 271-278.
5. Kulkarni RN et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999; 96: 329-339.
6. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Claußer E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine IW. The human IR cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell* 1985; 40: 747-758.
7. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Takai T, Noda M, Mishina M, Shimizu S, Furutani Y, Kayano T, Ikeda T, Kubo T, Takahashi H, Takahashi T. Human IR and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; 313: 756-761.
8. Lee J, Pilch PF, Shoelson SE, Scarlata SF. Conformational changes of the IR upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 1997; 36: 2701-2708.
9. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human IR. *Nature* 1994; 372: 746-754.
10. Hubbard SR. Crystal structure of the activated IR tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 1997; 16: 5572-5581.
11. Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA. Pleckstrin domain homology. *Nature* 1993; 363: 309-310.
12. Voliovitch H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of IR substrate-1 *in vivo* depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem* 1995; 270: 18083-18087.
13. Pawson T. Protein modules and signaling networks. *Nature* 1995; 373: 573-580.
14. Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. IR substrate-2 binds to the IR through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem* 1996; 271: 5980-5983.
15. Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE. PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. *J Biol Chem* 1995; 270: 27407-27410.
16. Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trub T, Nolte RT, Shoelson SE. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the IR. *Cell* 1996; 85: 695-705.
17. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16: 117-142.
18. Roy S, McPherson RA, Apolloni A, Yan J, Lane A, Clyde-Smith J, Hancock JF. 14-3-3 facilitates Ras-dependent Raf-1 activation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3947-3955.

19. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-185.
20. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 1999; 274: 1865-1868.
21. Etgen GJ, Valasek KM, Broderick CL. *In vivo* adenoviral delivery of recombinant human protein kinase C- ζ stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1999; 274: 22139-22142.
22. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, Galloway L, Karnam P, Moscat J, Farese RV. Activation of protein kinase C (α , β , and ζ) by insulin in 3T3/L1 cells: transfection studies suggest a role for PKC- ζ in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272: 2551-2558.
23. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; 378: 785-789.
24. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 1993; 294: 625-629.
25. Lawrence JC Jr, Abraham RT. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 345-349.
26. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998; 9: 89-109.
27. Butler AA, LeRoith D. Tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001; 142: 1685-1688.
28. Skorokhod A et al. Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biol Bull* 1999; 197: 198-206.
29. White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 3-11.
30. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 165-169.
31. Tamemoto H et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372: 182-186.
32. Araki E et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-190.
33. Kido Y et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 2000; 105: 199-205.
34. Withers DJ et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-904.
35. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E127-E133.
36. Fasshauer M et al. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 319-329.
37. Mendez R, Myers MG Jr, White MF, Rhoads RE. Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2857-2864.
38. Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 26-38.
39. Hotamisligil GS et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-668.
40. Craparo A, Freund R, Gustafson TA. 14-3-3 (E) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate 1 in a phosphoserine-dependent manner. *J Biol Chem* 1997; 272: 11663-11669.
41. Yuan M et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 2001; 293: 1673-1677.
42. Kim JK et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108: 437-446.
43. Elchebly M et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283: 1544-1548.
44. Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* 1995; 305: 25-28.
45. Myers MG Jr et al. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10350-10354.
46. Pons S et al. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4453-4465.
47. Antonetti DA, Algenstaedt P, Kahn CR. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 2195-2203.
48. Fruman DA, Cantley LC, Carpenter CL. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 1996; 37: 113-121.
49. Peterson RT, Schreiber SL. Kinase phosphorylation: keeping it all in the family. *Curr Biol* 1999; 9: R521-R524.
50. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273: 20685-20688.
51. Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR. Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 1993; 8: 663-670.
52. Alessi DR et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997; 7: 261-269.
53. Cross DA et al. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 1994; 303: 21-26.
54. Nakae J, Park BC, Accili D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine

- 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 15982-15985.
55. Brady MJ, Bourbonais FJ, Saltiel AR. The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 14063-14066.
 56. Cho H et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB). *Science* 2001; 292: 1728-1731.
 57. Standaert ML et al. Protein kinase C- as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem* 1997; 272: 30075-30082.
 58. Boulton TG et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675.
 59. Lazar DF et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem* 1995; 270: 20801-20807.
 60. Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001; 414(6865): 821-827.
 61. Goldstein BJ, Li PM, Ding WD, Ahmad F, Zhang WR. In: *Vitamins and Hormones—Advances in Research and Applications*. (ed. Litwack, J.) Academic, San Diego 1998; 54: 67-96.
 62. Cohen N et al. Oral vanadyl sulphate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995; 95: 2501-2509.
 63. Elchebly M et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999; 283: 1544-1548.
 64. Bush EN et al. Treatment of Zucker diabetic fatty rats with antisense oligonucleotide to phosphotyrosine phosphatase-1B for 5 weeks halts development of diabetes. *Diabetes* 2001; 50(Suppl 2): A81.
 65. Weston CR, Davis RJ. Signaling specificity—a complex affair. *Science* 2001; 292: 2439-2440.
 66. Henriksen EJ et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors potentiate glucose tolerance and muscle glycogen synthase activity in the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes* 2001; 50(Suppl 2): A279.
 67. Clement S et al. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 2001; 409: 92-97.
 68. Yuan M et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* 2001; 293: 1673-1677.
 69. Kim JK et al. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 2001; 108: 437-446.
 70. Moller DE. Potential role of TNF in the pathogenesis of insulin resistance and type II diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 212-217.
 71. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 171-176.