

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

MODULACIÓN DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA POR EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: EL PAPEL DEL RECEPTOR AT₂

Rimoldi, Jeremías – LU 1070392

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dominici, Fernando Pablo, IQUIFIB (UBA-CONICET)

Co-Tutor:

Quiroga, Diego Tomás, IQUIFIB (UBA-CONICET)

Martínez Tosar, Leandro Julián, UADE

Septiembre 2, 2022

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Índice

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 ESTRUCTURA DEL INFORME	8
1.2 OBJETIVOS	9
1.2.1 Objetivo específico	9
1.3 RELEVANCIA DEL PROYECTO	10
2. ESTADO DEL ARTE	12
2.1 DIABETES MELLITUS DE TIPO II (DMT2) Y PATOLOGÍAS RELACIONADAS	12
2.2 INSULINA: SEÑALIZACIÓN Y MECANISMOS DE RESISTENCIA	14
2.3 EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	17
2.4 EL RECEPTOR AT ₂	19
2.5 COMPUESTO 21 (C21): FUNDAMENTOS Y POTENCIAL TERAPÉUTICO.....	21
3. HIPÓTESIS	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 ESTIMULO AGUDO EN RATONES C57BL/6.....	25
4.2 PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS.....	28
4.2.1 Determinación de la concentración de proteínas en homogenatos de tejido y preparación de muestras para WB.....	29
4.3 WESTERN BLOT.....	32
4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	32
4.3.2 Transferencia	36
4.3.3 Incubación con anticuerpos	40
4.3.4 Revelado	41
4.4 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE	43

4.5 EXPRESION DE LOS RESULTADOS Y ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS	44
5. RESULTADOS	46
5.1 TRATAMIENTO DE RATONES C57BL/6 CON C21	46
5.1.1 Efecto del tratamiento con C21 sobre la señalización de la insulina en tejido adiposo	46
5.1.2 Efecto del tratamiento con C21 sobre la señalización de la insulina en músculo cardíaco	49
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
6.1 CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL TEMA DE ESTUDIO: RECOPIACIÓN DE CONCEPTOS EN BASE AL CONOCIMIENTO DESARROLLADO HASTA EL MOMENTO.....	51
6.2 EFECTOS GENERADOS POR EL AGONISMO FARMACOLÓGICO DEL RECEPTOR AT ₂	52
6.3 OBSERVACIONES RESPECTO A LA MODULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA INDUCIDA POR EL RECEPTOR AT ₂	55
7. CONCLUSIONES	58
8. BIBLIOGRAFÍA	59
8.1 ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (PAPERS).....	59
8.2 LIBROS.....	68
8.3 SITIOS WEB	69
9. ANEXOS	71
9.1 ANEXO A: GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS	71
9.2 ANEXO B: PIERCE™ BCA PROTEIN ASSAY KIT – USER GUIDE.....	72
9.3 ANEXO C: PIERCE™ ECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE – USER GUIDE	76

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Dominici, por confiar en mí y otorgarme un espacio donde poder realizar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Diego Quiroga, por ser mi formador, instruirme desde el ejemplo y fomentar el desarrollo de mis habilidades.

A toda la gente del IQUIFIB que tuve la suerte de conocer. Supieron recibirme como a uno más. Me llevo tanto experiencia como gratos momentos.

Al Dr. Leandro Martinez Tosar, por acceder a ser co-tutor de mi tesis y prestarme su apoyo a lo largo de este trabajo. Su calidad como docente y su forma de impartir conocimiento fueron las razones que me hicieron elegirlo para tal posición.

A mi madre, Alejandra, de la cual herede la palabra escrita. A mi padre, Pablo, del cual recibí su oratoria. Sin su compañía y confianza plena esta odisea hubiera resultado prácticamente imposible.

A mi hermana, Delfina, con la cual supimos transitar en conjunto la vida del estudiante. Siempre será uno de mis más claros ejemplos de vocación y entrega.

A mi compañera, Aldana. A ella le debo la paz de mi mente y la calidez de mi corazón. Su apoyo incondicional me trajo hasta acá, hasta este momento y estas palabras.

A mis innumerables tíos y primos, siempre celebrando a la par de uno, acompañando. Cada momento compartido en familia son memorias que vivirán para siempre.

A mi abuela, Blanca, a la cual le agradezco la oración de cada día. A mi abuelo, Osvaldo, quien me inculco su pasión por aprender, descubrir y crear. Esto es por y para ellos.

A Carlota y Juan. Sepan que los llevo conmigo.

A Juan y Fran, con quienes decidimos ser amigos y la vida nos supo hermanar. Espero ser capaz de devolverles aunque sea un poco del tiempo que les robé.

A mis amigos, mi cable a tierra, mi desconexión del mundo. Mis risas más genuinas y mis deseos más sinceros siempre van a estar reservados para ustedes.

A Julián, Romina, Juan, Esteban, Pamela, Luis, Mariel, Claudio, Diego y tantos otros nombres que en este momento faltó en recordar. Docentes que cuentan con un vasto conocimiento y, por sobre todas las cosas, con una gran pasión por lo que hacen. Me enseñaron a abandonar el guion y pensar por fuera de lo establecido. Me transmitieron su amor por la ciencia, misma disciplina que nos congregó a todos.

Por último, al Dr. Federico Prada, director de la carrera, por ofrecer soluciones en momentos de incertidumbre, por ser un fervoroso educador y por buscar siempre elevar el nombre de nuestra institución.

Resumen

Cuantiosa evidencia científica sustenta que el sistema renina-angiotensina modula la acción de la insulina. El receptor AT₁, cuyo accionar ha sido ampliamente estudiado, se asocia generalmente con el desarrollo de ciertas patologías. El accionar de su contraparte, el receptor AT₂, se opone directamente a sus efectos. Se ha demostrado que la activación de este receptor mediante un agonista (C21) induce una modulación positiva sobre la vía de señalización de la insulina, potenciándola. Por lo tanto, el AT₂R representa una pieza fundamental en la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento del síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo con el fin de estudiar el papel del AT₂R, partiendo de la hipótesis de que modula positivamente las acciones de la insulina. Para esto se decidió realizar un ensayo de estimulación aguda empleando ratones macho C57BL/6. Vía vena cava, se suministraron diferentes soluciones correspondientes a las 3 condiciones de estudio: Basal, Insulina y C21. Se extrajeron muestras de tejido adiposo, cardiaco y hepático, en lapsos de tiempo diferenciales. Las muestras de tejidos adiposo y cardiaco fueron debidamente procesadas y acondicionadas para su análisis. Mediante la técnica de Western Blot se evaluaron los niveles de fosforilación para Akt, ERK1/2 e IR (Insulin Receptor), componentes esenciales en la vía de señalización de la insulina.

En el tejido cardiaco, el tratamiento con C21 no indujo cambios en los niveles de fosforilación basales de Akt o de ERK1/2. Por el contrario, en el tejido adiposo, el tratamiento con el agonista promovió un previsto incremento en los niveles de fosforilación basales para Akt, así como también un llamativo aumento en la actividad basal de ERK1/2. Así mismo, se identificó una respuesta tejido-específica al tratamiento con C21 y se determinó la capacidad de acción del AT₂R incluso en un estado fisiológico.

En definitiva, en lo que respecta a la hipótesis principal de este trabajo, los resultados obtenidos para el tejido cardiaco resultan poco conclusivos y requieren estudios complementarios. Los resultados del tejido adiposo denotan una tendencia descripta previamente en otros trabajos afines y permiten confirmar la hipótesis principal, al igual que reafirmar la relevancia del tejido adiposo blanco en la homeostasis de la glucosa.

Abstract

There is considerable scientific evidence that the renin-angiotensin system modulates insulin action. The AT1 receptor, whose action has been extensively studied, is generally associated with the development of certain pathologies. The action of its counterpart, the AT2 receptor, directly opposes its effects. It has been shown that activation of this receptor by an agonist (C21) induces a positive modulation on the insulin signaling pathway, enhancing it. Therefore, the AT2R represents a fundamental piece in the search for therapeutic alternatives for the treatment of metabolic syndrome and type 2 diabetes.

This thesis work was carried out in order to study the role of AT2R, based on the hypothesis that it positively modulates insulin actions. For this purpose, it was decided to perform an acute stimulation assay using male C57BL/6 mice. Via vena cava, different solutions corresponding to the 3 study conditions were administered: Basal, Insulin and C21. Adipose, cardiac and hepatic tissue samples were extracted at differential time lapses. The adipose and cardiac tissue samples were duly processed and conditioned for analysis. Western blotting was used to evaluate the phosphorylation levels for Akt, ERK1/2 and IR (Insulin Receptor), essential components in the insulin signaling pathway.

In cardiac tissue, C21 treatment did not induce changes in basal phosphorylation levels of Akt or ERK1/2. In contrast, in adipose tissue, treatment with the agonist promoted a predicted increase in basal phosphorylation levels for Akt, as well as a striking increase in basal ERK1/2 activity. Likewise, a tissue-specific response to C21 treatment was identified and the ability of AT2R to act even in a physiological state was determined.

In short, with regard to the main hypothesis of this work, the results obtained for cardiac tissue are inconclusive and require further studies. The results for adipose tissue show a trend previously described in other related studies and confirm the main hypothesis, as well as reaffirming the relevance of white adipose tissue in glucose homeostasis.

1. Introducción

1.1 Estructura del informe

El presente documento se encuentra segmentado en una serie de secciones bien definidas. Este formato de organización se corresponde con la estructura general de cualquier documento de investigación. Dicho formato permite la compilación eficiente del total de la información que ha sido recabada a lo largo de los meses transcurridos hasta la finalización del proyecto y la consecuente elaboración de este informe. La información en cuestión proviene tanto de la pertinente revisión bibliográfica, así como del propio contexto experimental.

Ésta breve descripción de la estructura del escrito presentado se encuentra englobada dentro de la **Introducción**, sección en la que también se encuentran los objetivos del proyecto y donde se explica la relevancia del mismo. Continuando se encuentra la sección de **Estado del arte** donde se plasma toda aquella información recopilada de trabajos anteriores, los cuales sentaron un precedente elemental para la materialización de este proyecto y cuyos descubrimientos permitieron nutrir de fundamento científico a este documento. La siguiente sección es la de **Hipótesis** en la cual se asienta la pregunta que constituye el núcleo duro de este trabajo, alrededor de la cual el mismo toma forma y que buscara ser respondida llegado el final del documento. En el apartado de **Materiales y métodos** se expone el diseño experimental y se detallan el conjunto de prácticas que fueron necesarias para la concreción de este proyecto. La sección de **Resultados** marca el inicio de los tramos finales del documento y en la misma los datos obtenidos de la etapa experimental son expuestos convenientemente en figuras graficas representativas acompañadas de una breve descripción de cada una de ellas. Seguidamente se encuentra la sección de **Discusión de resultados** donde, como bien lo denota el título correspondiente, se procede a la discusión de los resultados obtenidos, explicando la naturaleza de los mismos en relación al tema de estudio. Inmediatamente después se alcanza el apartado de **Conclusiones**, último de los apartados considerados como principales de este informe y donde se busca concluir sobre los resultados obtenidos a lo largo del proyecto a la vez que se intenta responder la pregunta fundamental que dio inicio originalmente al proyecto en cuestión. Las dos secciones restantes se reservan para la **Bibliografía** y los **Anexos**. En la primera de ellas

se detallan todos los recursos bibliográficos que fueron consultados detenidamente en el proceso de elaboración de este documento, mientras que en la segunda de las secciones se expone cualquier información complementaria que cuenta con cierta relevancia pero que por diversos motivos se decidió omitirla del cuerpo principal del informe.

1.2 Objetivos

La elevación crónica de angiotensina (Ang) II origina, a través del receptor AT1 (AT1R), procesos patogénicos (estrés oxidativo, inflamación, alteraciones en la reactividad vascular, activación de plaquetas y fibrosis) que en el caso de prevalecer en el tiempo dan lugar a estados patológicos, incluyendo hipertensión y disminución de la sensibilidad a la insulina. El receptor AT2 (AT2R) comparte un 34% de homología de secuencia con el receptor AT1R, pero los mecanismos por los cuales la Ang II transmite su señal a través del AT2R son poco conocidos e involucran vías no clásicas, incluyendo la estimulación de la síntesis de NO y la activación de fosfatasa.

En general, las funciones del AT2R se oponen a las mediadas por el AT1R y ejercen, en general, efectos protectores sobre los tejidos y beneficiosos a nivel metabólico. Por ello, el conocimiento del balance entre los efectos gatillados por el AT1R y aquellos originados por activación del AT2R es un objeto de estudio muy atractivo en cuanto a su potencial terapéutico. En particular, se sabe poco acerca del papel del AT2R sobre la modulación de la sensibilidad a la insulina. La información disponible obtenida a partir del uso de antagonistas y agonistas farmacológicos del AT2R sugiere su participación como un modulador positivo de la sensibilidad a la insulina.

1.2.1 Objetivo específico

Investigar los mecanismos por los cuales el AT2R participa en el control de la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa, empleando protocolos que involucran experimentos a realizar principalmente in vivo.

1.3 Relevancia del proyecto

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza por la prevalencia de niveles elevados de glucosa en sangre o hiperglucemia. Sin tratamiento o mal controlada, con el tiempo esta condición puede empeorar y desencadenar una gran variedad de afecciones de índole cardiovascular, renal, neurológico, entre otros. Esto lógicamente lleva al deterioro general y sistémico del paciente, aumentando considerablemente las probabilidades de una muerte prematura.

Esta enfermedad se presenta en dos variantes principales: **Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)** y **Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)**. La **DMT1** (conocida también como “insulinodependiente”) está caracterizada por una producción escasa e insuficiente de insulina, asociada a una atrofia sufrida por las células β del páncreas. Las personas que padecen este primer tipo requieren la administración externa periódica de insulina para mantener niveles normales de glucemia. La **DMT2** (por contraposición la “no insulinodependiente”) por su parte se origina en la imposibilidad del organismo de utilizar de manera eficiente la insulina que produce, ya sea por la adquisición de cierto grado de resistencia a la acción de la hormona o porque la producción de la misma no es suficiente para los requerimientos del organismo en cuestión. De los dos tipos mencionados es el más común (más del 95% de los pacientes diabéticos lo padecen) y existen condiciones que aumentan las probabilidades de desarrollar DMT2 tales como la mala alimentación, la falta de ejercicio físico, la obesidad, etc.

Según datos presentados por la **Federación Internacional de Diabetes** (International Diabetes Federation o IDF por sus siglas en inglés) en la décima edición de su **Diabetes Atlas** del año 2021, unos 537 millones de adultos de entre 20 y 79 años viven actualmente con diabetes alrededor del mundo. Se predice que este número aumentara a 643 millones para el año 2030 y 783 millones para el año 2045. A su vez, la diabetes fue la causa de muerte de 6.7 millones de personas en el año 2021 (Federation, 2022).

Esta escueta introducción no alcanza para dimensionar la extensión real de la problemática en cuestión, pero es suficiente para denotar la gravedad que dicha problemática

representa en materia de salud, más aún si se consideran seriamente los números expuestos en el párrafo anterior.

La elaboración de este documento marca la conclusión de una ardua labor de investigación, la cual a su vez forma parte de una ya extensa línea de trabajo que ha sido llevada adelante por el equipo del laboratorio de endocrinología molecular del IQUIFIB. El desafío por comprender las bases biológicas detrás de desórdenes metabólicos tales como la diabetes previamente descrita constituyen el motor impulsor que ha permitido ampliar los conocimientos en el tema y arrojar nueva luz sobre características pobremente desarrolladas o que carecían de una correcta caracterización. En el último tiempo se ha focalizado la investigación sobre una fracción de esta vasta área de estudio, a través de la cual se busca dilucidar la influencia del sistema renina-angiotensina y sus diferentes actores sobre el accionar de la insulina. Particularmente el énfasis se encuentra en el estudio del receptor AT₂, su mecanismo de acción y su extraordinario potencial como contraparte de la actividad del receptor AT₁, notablemente relacionado a diversas patologías. Una comprensión exhaustiva del funcionamiento del receptor AT₂ permitiría realizar avances en el campo de lo terapéutico, lo que ha llevado por ejemplo a profundizar el estudio de los efectos del Compuesto 21 o C21, un fármaco de administración oral que funciona como un agonista de dicho receptor.

En definitiva, tanto este documento como todo el trabajo de investigación que hay detrás del mismo buscan cumplir la humilde función de contribuir al conocimiento que se tiene hasta el momento dentro de esta área de estudio. Un área de estudio que en el último tiempo ha estado arrojando resultados muy prometedores y que augura un futuro esperanzador en materia de salud.

2. Estado del arte

2.1 Diabetes mellitus de tipo II (DMT2) y patologías relacionadas

La diabetes mellitus de tipo II es una enfermedad que se caracteriza generalmente con una condición de insulinoresistencia, ya sea generada por una producción deficiente de insulina por parte del páncreas o porque el organismo es incapaz de utilizar de manera eficiente la hormona. Esta afección lleva a que se presenten anormalmente altos de glucosa en la sangre, debido a que la inacción de la insulina restringe el ingreso de glucosa a las células. La elevación en los niveles de glucemia lleva a una mayor producción de insulina por parte del organismo, lo que con el tiempo puede desencadenar que el páncreas resulte atrofiado, produciendo cada vez menos insulina. Esto solo empeora el panorama, elevándose los niveles de glucosa en sangre hasta límites críticos (hiperglucemia). Es el tipo de diabetes más común (alrededor del 90% de los casos diagnosticados) en comparación con la diabetes de tipo I y es considerada uno de los desafíos médicos definitivos del siglo XXI (Zimmet *et al.*, 2001). Se estima que alrededor de 537 millones de adultos viven actualmente con diabetes alrededor del mundo (**Fig. 1**). Se proyecta que ese valor ascenderá a 643 millones para 2030 y 738 millones para 2045. Tan solo en el año 2021, esta enfermedad causó 6.7 millones de muertes, en conjunto con 966 mil millones de dólares en gastos médicos (International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, 2022).



Figura 1. Diabetes en números alrededor del mundo. Se estima que unas 537 millones de personas padecen esta enfermedad en todo el mundo (1 de cada 10). El 90% de los casos (483.3 millones de personas) se corresponden con un diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). (Fuente: IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation, ©2022. <<https://diabetesatlas.org/>>)

La mayoría de los casos de diabetes mellitus tipo 2 se diagnostican en adultos mayores, aunque en el último tiempo se ha generado una tendencia alarmante en el incremento de casos en infantes, adolescentes y adultos jóvenes, principalmente producto de un aumento en los casos de obesidad, una propensión al sedentarismo y una dieta pobre. El consumo excesivo de alimentos ultra procesados, nutricionalmente mediocres y, sobre todas las cosas, relativamente accesibles, ha generado un incremento sin precedentes en los niveles de obesidad a nivel mundial. Solo en los EUA (por citar un ejemplo), la prevalencia combinada de diabetes y prediabetes se encuentra por encima del 50 % (Menke *et al.*, 1988–2012). Si bien solo un porcentaje de personas obesas desarrollan DMT2, la obesidad es un factor de riesgo determinante para la DMT2, y los niveles de prevalencia de DMT2 han igualado los de obesidad (Kahn *et al.*, 2006).

La glucosa presente en la sangre (proveniente de los alimentos que consumimos) es la principal fuente de energía para el correcto funcionamiento del organismo. La insulina, una

hormona peptídica producida en las células beta del páncreas, ayuda a que las células capturen la glucosa circulante para su posterior conversión a energía. Esta hormona se une a todas aquellas células que posean un receptor para la misma, orquestando una respuesta anabólica integrada dependiente de la abundancia relativa de nutrientes.

En la DMT2, la insulina producida por el organismo es defectuosa o los niveles de hormona producida son menores a los requerimientos normales. Se establece que un sujeto es insulinoresistente cuando son necesarios niveles de insulina por encima de los normales para generar una reducción significativa de glucosa en la sangre. Este condicionamiento induce una sobre exigencia del páncreas, lo que lleva a una descompensación de las células beta. Este es uno de los mecanismos principales que influyen en el desarrollo de DMT2 (Kahn, 2003; Kasuga, 2006; Schwartz *et al.*, 2017)

Innumerables trabajos han puesto en evidencia que el diagnóstico de insulinoresistencia es un predictor fehaciente de un padecimiento futuro de DMT2 (Lillioja *et al.*, 1993; Warram *et al.*, 1990).

De más está decir que niveles anormales de glucosa en la sangre pueden llevar al desarrollo de una gran variedad de afecciones, como patologías cardíacas, renales, nerviosas, etc.

2.2 Insulina: señalización y mecanismos de resistencia

Como bien se explicó anteriormente, la insulina es una hormona peptídica que se une a receptores de membrana de aquellas células que posean los mismos (Haeusler *et al.*, 2018) y se encarga de orquestar una respuesta anabólica integrada en relación a la disponibilidad de nutrientes.

La señalización inducida por la insulina regula la homeostasis de glucosa, lípidos y energía. Si bien existen receptores en varios tejidos y tipos celulares, la acción reguladora de la insulina se ejecuta principalmente en el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo (grandes sitios de almacenamiento de energía).

La correcta modulación de esta vía de señalización (**Fig. 2**) es esencial para que el organismo pueda adaptarse a los ciclos normales de saciedad y ayuno. Es necesario comprender tanto las modulaciones negativas y positivas que ocurren a lo largo de esta vía, así como las interacciones entre los diferentes agentes que la componen. Solo con una basta comprensión de estos aspectos es que se podrán desarrollar nuevas drogas y terapias para el padecimiento de patologías tales como la diabetes, el síndrome metabólico y complicaciones derivadas.

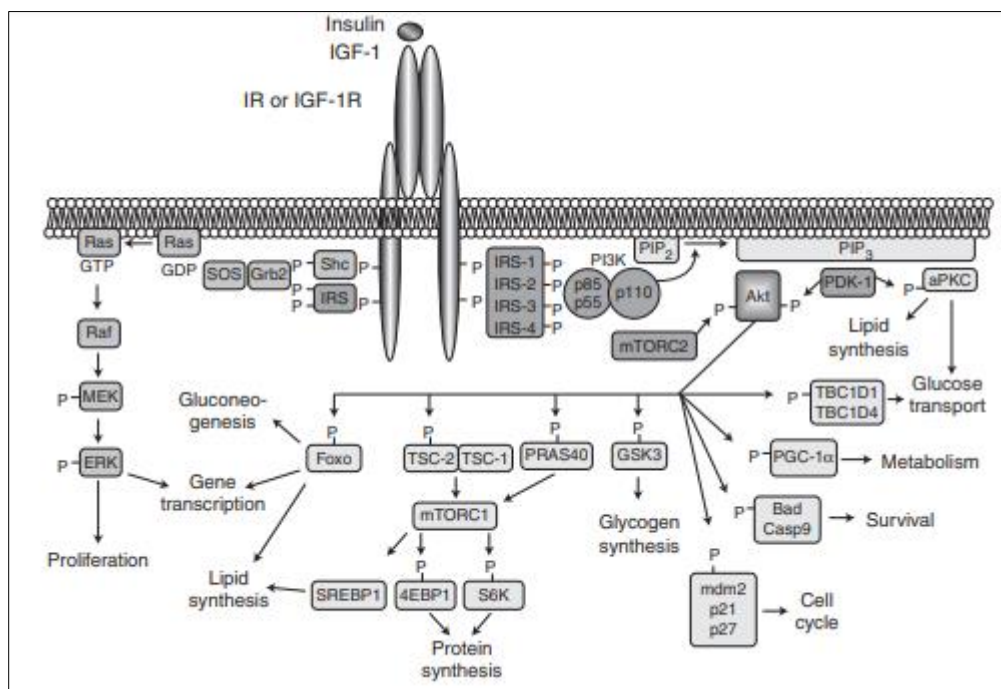


Figura 2. Vía de señalización de la insulina. La interacción de la insulina con su receptor correspondiente (IR) desencadena un proceso de transducción de señal que atraviesa un gran número de componentes de señalización intracelulares. Entre estos componentes se destacan Akt y ERK1/2, considerados esenciales dentro de esta vía y de gran relevancia en la elaboración de este trabajo. (Fuente: Boucher, J. et al., Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014.).

La insulina induce todos los efectos descritos mediante su unión con el receptor específico IR presente en las membranas celulares de las células target. Este receptor consiste en un receptor tirosin quinasa heterotetramérico, compuesto de dos subunidades alfa extracelulares (que se unen a insulina) y dos subunidades beta transmembrana con dominios tirosin quinasa (Hubbard, 2013).

En todos los tipos celulares, el primer paso luego de la unión de insulina a su receptor es el reclutamiento por parte de dicho receptor de proteínas scaffold o de andamiaje (Taniguchi *et al.*, 2006). Estas proteínas activan a su vez otras proteínas efectoras río abajo y ayudan a una ramificación inicial de la señal para la activación de varios módulos en simultáneo. Las proteínas de andamiaje mejor caracterizadas son las proteínas de la familia IRS (Insulin Receptor Substrates).

Las proteínas IRS fosforiladas reclutan a PI3K, con su subunidad regulatoria p85 y su subunidad catalítica p110. PI3K cataliza la producción de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-tris fosfato) a partir de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato). PIP3 reclutara por su parte a la quinasa dependiente de fosfoinositol PDK 1. Finalmente, PDK 1 fosforila y activa quinasas de la familia AGC en residuos de serina y treonina, como en el caso de Akt en la posición Thr-308 (Alessi *et al.*, 1997). La activación completa de Akt se logra mediante la fosforilación de un residuo Ser en la posición 473 (ser-473), inducido por acción por mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2)(Sarbasov *et al.*, 2005).

La familia de proteínas Akt/PKB consiste en tres isoformas diferentes de quinasas serina/treonina, codificadas por diversos genes (Schultze *et al.*, 2011). El total de isoformas poseen dominios PH que les permiten tanto la interacción con PIP3, así como el reclutamiento a la membrana celular. Akt2 tiene una mayor abundancia en tejidos sensibles a la insulina y parece ocupar un rol predominante mediando la acción de la insulina en el metabolismo, ya que se ha observado que ratones noqueados para Akt 2 son insulino resistentes y desarrollan diabetes (Cho *et al.*, 2001), mientras que ratones noqueados para Akt 1 o 3 no muestran dicha condición ni padecen la enfermedad. Esto transforma a Akt en uno de los nodos principales dentro de la vía de señalización de la insulina y lo dota de gran relevancia.

Los mecanismos de resistencia a la insulina son muy diversos. En menor proporción la insulinoresistencia se debe a una mutación en el receptor IR, mientras que en una proporción mayor esto se debe a perturbaciones a nivel celular.

En pacientes obesos y diabéticos se observa un aumento en la presencia de ceramidas en plasma. Entre otras acciones contraproducentes, las ceramidas inhiben la activación de Akt reduciendo por diferentes mecanismos su interacción con PIP3 (Teruel *et al.*, 2001).

La obesidad se caracteriza por el desarrollo de una condición crónica de respuesta inflamatoria leve. Este “estado” está íntimamente relacionado con el desarrollo de insulinoresistencia asociada a obesidad (Osborn y Olefsky, 2012).

La hiperglicemia también puede generar insulinoresistencia mediante diferentes mecanismos de acción, los cuales se creen que están ligados a estrés oxidativo (Evans *et al.*, 2005). Así también, la hiperglicemia inducida por un decrecimiento en el transporte de glucosa en el musculo esquelético perjudica la acción de la insulina en el tejido hepático (Zisman *et al.*, 2000).

2.3 El sistema renina-angiotensina

El sistema renina angiotensina (o RAS por sus siglas en inglés) es un sistema que interviene en la regulación de una gran cantidad de funciones fisiológicas en tejidos múltiples como el renal, cardiaco y vascular. Bajo circunstancias patológicas, este sistema contribuye activamente en el desarrollo de varias enfermedades, de ahí la importancia de su estudio y la necesidad de comprender de manera exhaustiva las bases moleculares mediante las cuales este sistema funciona.

La angiotensina II es un octapeptido y una de las hormonas principales de este sistema. Deriva del procesamiento de AGT (Angiotensinogen precursor) por parte de la renina (Karnik *et al.*, 2015). La ANG II es un péptido vasoactivo, pero también se encarga de la regulación de la presión sanguínea y es un factor clave en la hipertensión.

Existen una variedad de receptores presentes en la señalización del sistema RAS (**Fig. 3**). De todos ellos los principales son el receptor AT₁ y el receptor AT₂.

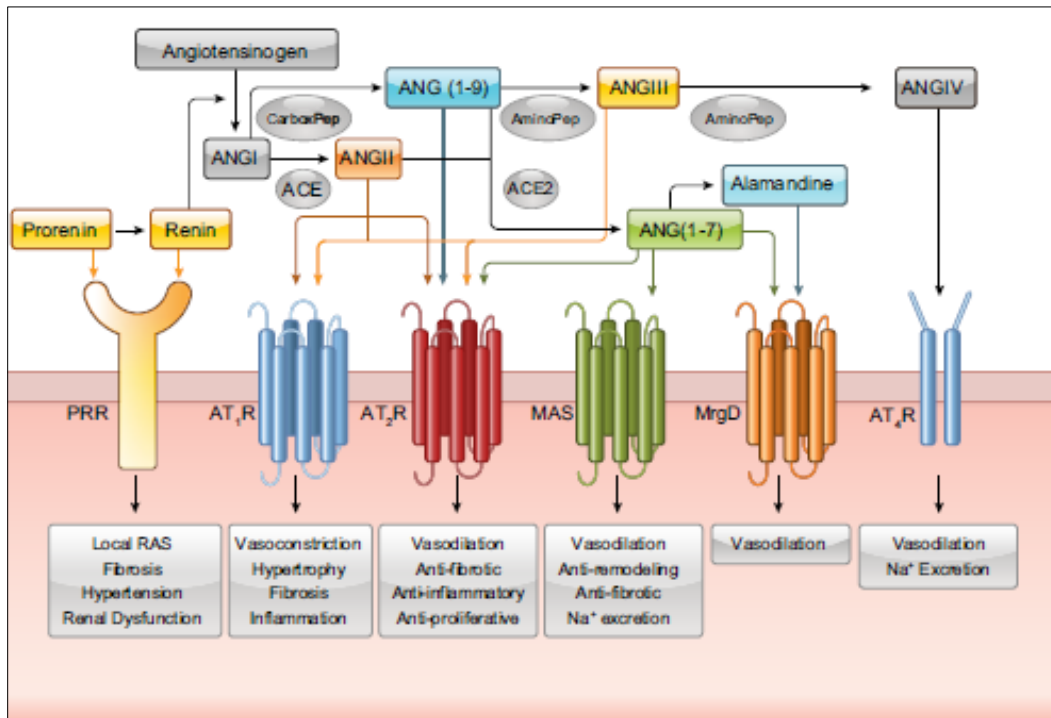


Figura 3. Péptidos identificados derivados del precursor angiotensinógeno y receptores caracterizados del SRA. De todos los receptores caracterizados para el sistema renina-angiotensina, el más estudiado es el receptor AT₁. Si bien en condiciones fisiológicas dicho receptor cumple una serie de funciones esenciales, en condiciones patológicas se lo asocia con el origen y desarrollo de diversas afecciones. Esto ha llevado a que cobre relevancia el estudio de su contraparte, el receptor AT₂, cuyo accionar se opone al del AT₁R. (Fuente: Forrester et al., Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology, *Physiol Rev*, 2018.).

La importancia que recae sobre estos dos receptores se debe a que ANG II tiene una alta afinidad por ambos (Ferrario *et al.*, 2014; Karnik *et al.*, 2015; Carey, 2017).

Si bien todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la señalización dependiente del receptor AT₂, comúnmente se reconoce como la contraparte de la señalización dependiente del receptor AT₁. De esta manera, modular correctamente el balance entre la cantidad de cada uno de los receptores tiene una significativa relevancia en condiciones patológicas como la aterosclerosis, la insulinoresistencia, la diabetes mellitus, la nefropatía y la fibrosis pulmonar (Padia y Carey, 2013; Paulis *et al.*, 2016).

El sistema RAS juega un papel crucial en el desarrollo de síndrome metabólico y de DMT2 (Henriksen, 2007). La activación del receptor AT₁ aumenta la producción de citoquinas inflamatorias y el estrés oxidativo, lo que desencadena una disminución en la sensibilidad a la

insulina en el tejido afectado y una consecuente resistencia a la insulina (Forrester *et al.*, 2018). Por el contrario, su bloqueo mejora la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de glucosa en varios modelos animales (Munoz *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2018). En contraposición, evidencia reciente sugiere que la activación del receptor AT₂ bloquea la producción de citoquinas inflamatorias y disminuye el estrés oxidativo, oponiéndose a los efectos de la activación del receptor AT₁ y, por ende, mejorando la sensibilidad a la insulina y su secreción (Carey, 2017; Santos *et al.*, 2019).

2.4 El receptor AT₂

De los dos receptores principales del sistema RAS, solo el receptor AT₁ ha sido ampliamente estudiado con el paso del tiempo. Aun especulando o trabajando con supuestos, el interés por estudiar el receptor AT₂ se ha incrementado con los años hasta la actualidad, buscando comprender exhaustivamente los mecanismos que subyacen a la función del mismo. Este renovado interés ha permitido que comiencen a dilucidarse ciertos aspectos de la señalización mediada por este receptor.

El AT₂R es miembro de la familia de proteínas GPCR (G protein-coupled receptor). Se ha observado que presenta niveles de expresión altos durante el proceso de desarrollo del feto en modelos de roedores (ratas), donde participa en el desarrollo y diferenciación de los órganos. A pesar de esto, sus niveles de expresión disminuyen significativamente durante el periodo neonatal al igual que su abundancia en los tejidos adultos, sobre todo al compararlo con el AT₁R (Ferrario *et al.*, 2014; Karnik *et al.*, 2015; Carey, 2017). Solo algunos tejidos en estadio adulto presentan un mayor número de AT₂R que de AT₁R, como por ejemplo la medula adrenal, el páncreas y algunas regiones particulares del cerebro (Ozono *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Miyata *et al.*, 1999; Padia y Carey, 2013; Shao *et al.*, 2013; Karnik *et al.*, 2015; Carey, 2017). La principal característica que tiene la señalización del receptor AT₂ es que sus acciones (**Fig. 4**) se contraponen con las acciones inducidas por la activación de su opuesto, el receptor AT₁ (AbdAlla *et al.*, 2001). Esto se sustenta, por ejemplo, en la evidencia obtenida en los últimos años donde se pudo observar que mientras la activación del receptor AT₁ inducía alteraciones que llevaban a una disminución en la sensibilidad a la insulina en ciertos tejidos y

a una condición de insulinoresistencia (Forrester *et al.*, 2018), la activación del receptor AT₂ demostró hacer justamente lo contrario, revirtiendo las condiciones impuestas y mejorando el panorama metabólico general (Santos *et al.*, 2019; Carey, 2017)

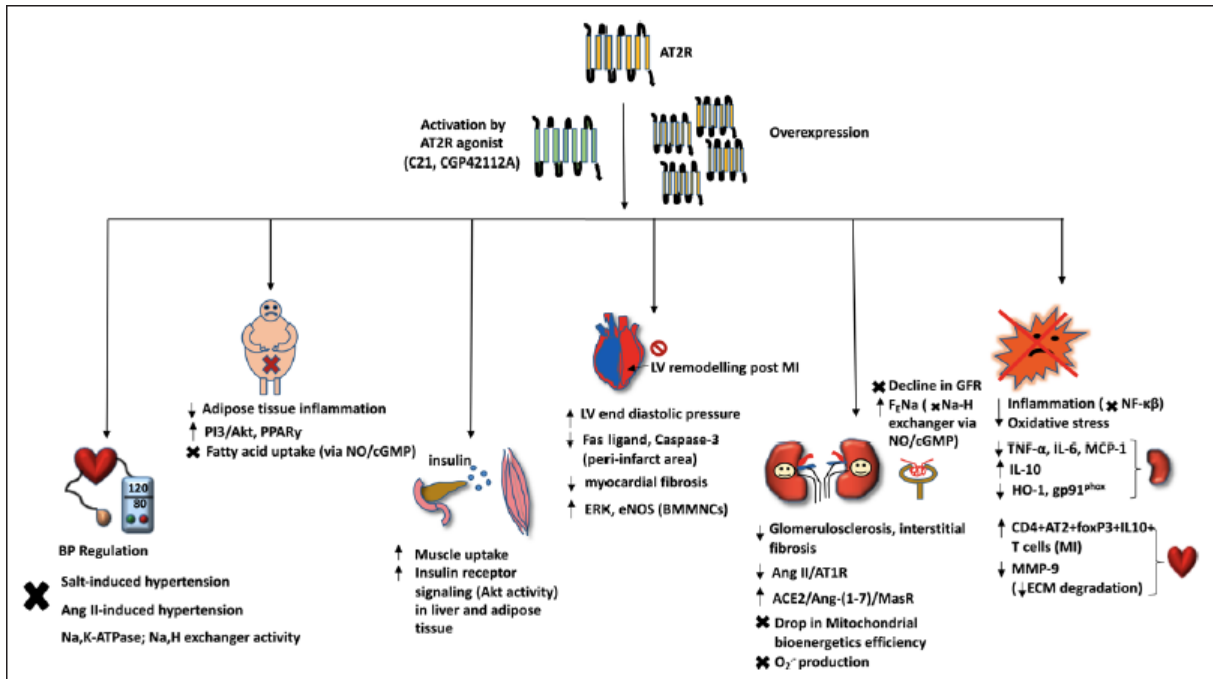


Figura 4. El AT₂R y su activa participación en procesos metabólicos, inflamatorios y de protección de órganos. El accionar de este receptor funciona a varios niveles y sus efectos benéficos alcanzan a un gran numero de tejidos, como el tejido adiposo, cardíaco, hepático, renal, etc. (Fuente: Fatima et al., Angiotensin II Type 2 Receptor, Hypertension, 2021)

Estudios suplementarios demostraron que un bloqueo sistémico del receptor AT₂ reducía las células beta del páncreas a una cantidad cercana a las presentes en un estadio neonatal de los islotes de Langerhans, perjudicando considerablemente su función secretora de insulina y la consecuente tolerancia a la glucosa (Leung *et al.*, 2014). Se ha descrito que los niveles de expresión del AT₂R aumentan considerablemente en tejidos que estén afectados por una condición patológica y en el cual están ocurriendo procesos inflamatorios y de remodelación de tejido (Booz y Baker, 1996, Lemarie y Schiffrin, 2010, Namsolleck *et al.*, 2014, Karnik *et al.*, 2015, Carey, 2017)). Es así que el la modulación del balance existente entre AT₁R y AT₂R tiene implicaciones terapéuticas considerables en lo que a condiciones patológicas respecta (Carey, 2013; Paulis *et al.*, 2016).

Estos hallazgos, entre tantos otros, reafirman la teoría que posiciona al AT₂R como el brazo protector del SRA, promoviendo efectos anti-inflamatorios, anti-apoptóticos, al igual que acciones de remodelación de tejidos y preservación de los mismos. Es por esto que en la actualidad ha cobrado tanta relevancia el estudio de este receptor.

2.5 Compuesto 21 (C21): fundamentos y potencial terapéutico

La angiotensina II (Ang II) está involucrada directamente en la transición a una condición de insulinoresistencia. La elevación crónica de este péptido afecta significativamente la sensibilidad a la insulina, lo que lleva al desarrollo de un estado de resistencia. Esta acción está mediada por el AT₁R (como la gran mayoría de las acciones inducidas por Ang II) (Folli *et al.*, 1997; Henriksen, 2007; Favre *et al.*, 2015)). Por otra parte, se descubrió que el antagonismo de dicho receptor inducía una mejoría en la resistencia a la insulina y disminuía el riesgo de padecimiento de diabetes (Folli *et al.*, 1997; Henriksen, 2007; Lee *et al.*, 2008; Shiuchi *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta la participación del receptor AT₁, se buscó estudiar la implicación del receptor AT₂ en la sensibilidad a la insulina. Se demostró que el antagonismo del AT₂R con el antagonista PD123319 disminuía la recaptación de glucosa en el músculo esquelético de ratas (Chai *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2011). Sumado a esto, otros trabajos demostraron que el mismo antagonismo reducía la actividad de componentes esenciales de la vía de señalización de la insulina, como Akt e IR en ratones (Munoz *et al.*, 2017).

Considerando lo que el antagonismo del receptor AT₂ promovía, era necesario estudiar lo que su agonismo podía generar. El compuesto 21 o también conocido como C21, es un agonista selectivo (25.000 veces más afín con AT₂ que con AT₁) y no peptídico del receptor AT₂. El descubrimiento del mismo permitió expandir significativamente los conocimientos en torno al funcionamiento de dicho receptor (Wan *et al.*, 2004).

La evidencia obtenida de estudios realizados con esta droga demostró que la administración de C21 mejoró la sensibilidad a la insulina tanto en modelos de ratones con DMT2, así como en ratas alimentadas con dietas ricas en fructosa y grasa (Shum *et al.*, 2013; Ohshima *et al.*, 2012). A su vez, la estimulación de receptores AT₂ en páncreas mejoró

considerablemente la síntesis de insulina y su secreción en ratas adultas (Nag *et al.*, 2015). Sumado a esto se descubrió que el tratamiento con C21 prevenía la muerte por apoptosis de células beta pancreáticas en ratas con diabetes DMT1 (Shao *et al.*, 2014).

De esta manera, el C21 se erige como una droga con una alta potencialidad para ser aplicada a futuro en el tratamiento de padecimientos como la DMT2, el síndrome metabólico y para aplacar consecuencias propias de esas patologías. Esta nueva evidencia no hace mas que reforzar la condición del AT₂R como un target de gran valor para el desarrollo de nuevas terapias destinadas al tratamiento de un gran número de enfermedades.

3. Hipótesis

La **hipótesis principal de trabajo** se basa en observaciones recientes propias y de otros grupos de trabajo que indican que el **AT2R modula positivamente las acciones de la insulina**. En particular, **se postula que dicha modulación podría ser consecuencia de la estimulación de vías que son originadas directamente por la activación del AT2R, del antagonismo de las acciones gatilladas por el AT1R, o de una combinación de ambas condiciones**. En cuanto a las vías originadas por la activación directa del AT2R, **se postula que dicho efecto podría ser consecuencia de una atenuación de componentes inhibitorios de la vía de señalización de la insulina (fosfatasas y/o Ser/Thr quinasas inhibitorias), así como el resultante de la activación/potenciación del nodo de señalización PI3K/Akt/óxido nítrico (NO)**.

Dichos efectos podrían redundar en la potenciación/facilitación de las acciones de la insulina incluyendo la inhibición de la lipólisis y la captación de glucosa. Se espera que la ejecución del presente proyecto contribuya a profundizar el conocimiento acerca del papel del AT2R en la regulación de las acciones de la insulina y el mecanismo por el cual la activación del AT2R ejerce efectos beneficiosos a nivel metabólico en condiciones de resistencia a la insulina y DMT2.

4. Materiales y métodos

A fin de validar la hipótesis planteada en este trabajo, se realizó una experiencia que consistió, en primer lugar, en un estímulo agudo en ratones C57BL/6 (ratones endocriados/isogénicos). Posterior a dicho estímulo se procedió a la extracción de diferentes tejidos de interés, los cuales fueron debidamente rotulados y almacenados para su conservación.

En una segunda etapa de la experiencia, los tejidos previamente extraídos de los sujetos de estudio fueron procesados y preparados para su análisis mediante la técnica de Western Blot, técnica clásica de la biología molecular ampliamente utilizada para la identificación de proteínas. Finalmente se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos con el fin de poder concluir sobre los mismos (**Fig. 5**).

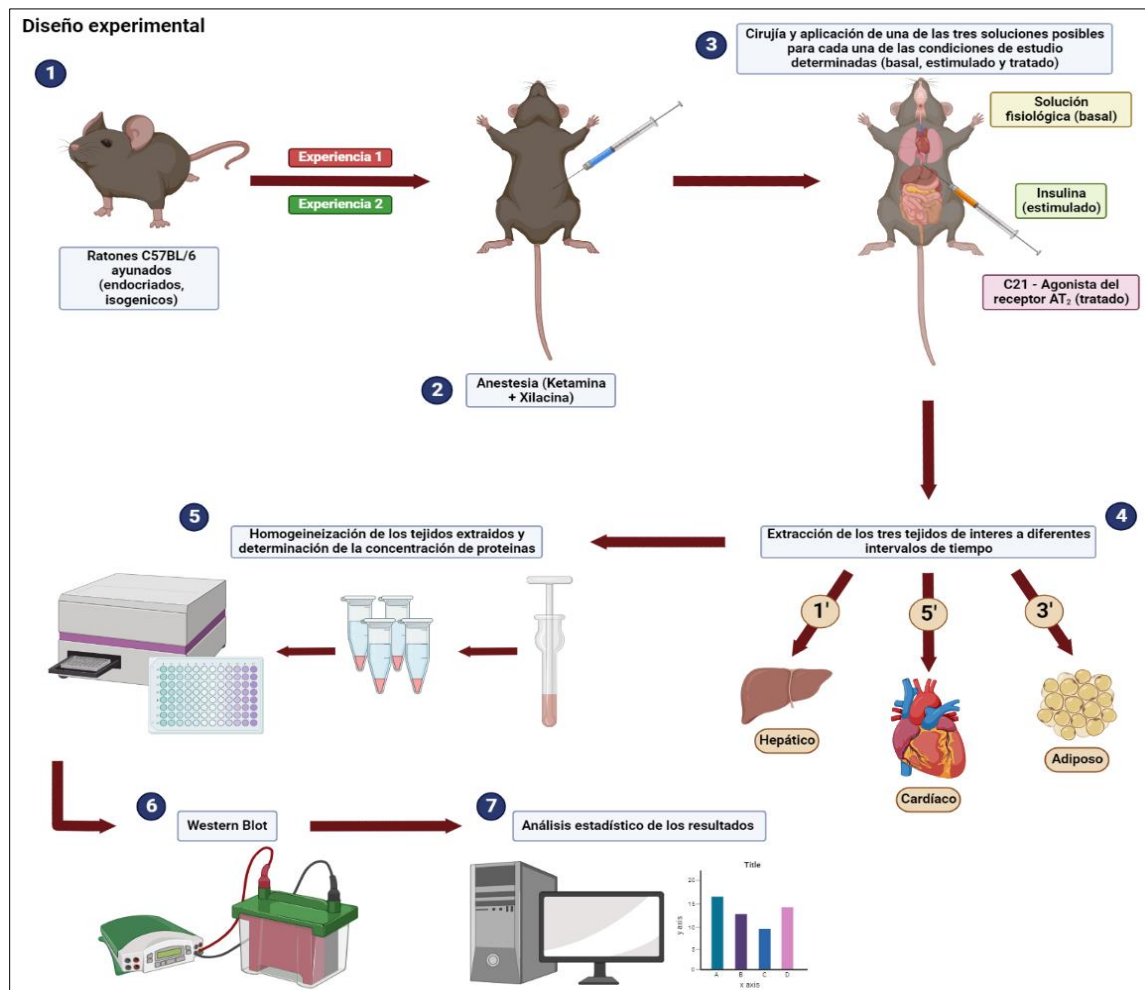


Figura 5. Diseño experimental. Descripción gráfica de las etapas que conformaron este proyecto: (1,3) Tratamiento agudo en ratones C57BL/6. (4) Extracción de tejidos de interés. (5) Procesamiento de los tejidos. (6) Western Blot. (7) Análisis estadístico de resultados. (Fuente: de mi autoría, diseñado en BioRender)

4.1 Estimulo agudo en ratones C57BL/6

Para esta instancia del trabajo se emplearon ratones macho C57BL/6 de aproximadamente 12 semanas de edad. El número total de animales utilizados fue de 22 repartidos en 2 tandas, 12 en una primera experiencia y 10 en una segunda experiencia. Los mismos fueron suministrados por el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron retirados del bioterio con un ayuno mínimo de 6 horas (condición necesaria para la experiencia). Previo a su manipulación, se los mantuvo en jaulas con marlo estéril y a temperatura ambiente. Se les proporciono agua potable de bebida

ad libitum. La administración de los fármacos y el manipuleo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” (National Academies Press, 2011; **Anexo A**).

Con el fin de establecer las tres condiciones diferenciales de estudio, los animales fueron divididos en tres grupos de la siguiente manera:

- **Grupo basal** = solución fisiológica
- **Grupo estimulado** = insulina
- **Grupo agonista** = C21

Los sujetos de estudio fueron anestesiados de a pares a medida que se los iba requiriendo. Esto se efectuó utilizando una combinación de Ketamina (Ketamina 50, 50 mg/ml, Holliday), un anestésico disociativo, y Xilazina (clorhidrato de xilazina al 2%, Kenzol® Konig), un sedante/miorrelajante, llevando a volumen final con solución fisiológica (600 ul Keta + 300 ul Xila + 1600 ul de solución fisiológica = 2500 ul de volumen final). Con un peso por animal de unos 30 g aproximadamente, la dosis de anestesia se calculó en unos 200 ul (2400 ul necesarios en total). Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal.

Una vez que la anestesia surtió efecto, y habiendo comprobado los reflejos del animal (se aplica una leve presión sobre la cola y se constata la condición del animal, según exista o no movimiento ante el estímulo), se procedió a la inmovilización del sujeto de estudio sobre la superficie de trabajo mediante la implementación de agujas G22 (se emplean un total de cuatro, una por extremidad).

Al momento de operar a los animales se utilizó material quirúrgico autoclavado (tijeras y pinzas). El abdomen del animal fue debidamente limpiado y desinfectado con etanol 70%. Cuidadosamente se procedió a realizar una incisión en la línea media ventral, intentando penetrar al mismo tiempo tanto la piel como la cavidad peritoneal del animal. Dejando expuestos los órganos del animal, los mismos fueron desplazados hacia un lado con el fin de localizar la vena cava. Empleando jeringas para insulina de 1 ml (Ultra fine II, BD) se efectuó la administración directa de la solución correspondiente a cada grupo (basal, estimulado,

agonista). El volumen administrado en todas las condiciones fue de 100 ul. Para conseguir una distribución homogénea de las muestras, los ratones se inyectaron bajo el siguiente criterio:

1. **Basal**
2. **Insulina**
3. **C21**
4. **.... así sucesivamente hasta completar el total de animales**

Por las dimensiones de la estructura objetivo a inyectar, la aguja debe ingresar en ángulo cuidando de no atravesar la vena. La solución debe administrarse lentamente, pero de manera continua, intentando que no se formen “globos”. Generalmente, la aguja se deja inserta en la vena una vez realizada la administración de la solución para evitar que el animal se desangre rápidamente, llenando de sangre la cavidad abdominal. Esto no solo dificulta la manipulación del animal para los siguientes pasos, sino que además condiciona el propio experimento, ya que se prevé que el animal continúe con vida hasta que los tejidos de interés sean extraídos en su totalidad.

Posterior a la administración directa en vena cava de las soluciones, se procedió a la extracción de algunos tejidos de interés para el trabajo. En total se extrajeron tres tejidos, siendo estos parte del hígado, el tejido adiposo epididimal y el corazón. Estas extracciones se realizaron de manera cronometrada según los siguientes tiempos:

- **Hígado:** 1 min
- **Tejido adiposo epididimal:** 3 min
- **Corazón:** 5 min

Cada tejido extirpado fue sumergido brevemente en solución fisiológica a modo de lavado y posteriormente fue colocado en un contenedor aluminio correctamente rotulado y llevado rápidamente a hielo seco para su conservación.

Al finalizar una cirugía cada animal fue sacrificado y debidamente descartado. Al completar el total de procedimientos los tejidos extirpados que permanecían en hielo seco

fueron trasladados a un congelador de -80°C para su correcta conservación hasta el momento de ser procesados.

Finalizada esta etapa, y tras las dos experiencias realizadas, la distribución del total de animales requeridos para este trabajo quedo de la siguiente manera:

- **Grupo basal = 8 animales**
- **Grupo estimulado = 7 animales**
- **Grupo agonista = 7 animales**
- **Total = 22 animales**

4.2 Procesamiento de los tejidos

En esta segunda etapa de la experiencia, se efectuó la homogeneización de los tejidos extirpados en la etapa anterior. Este proceso permite la fragmentación de las células que componen los tejidos y la consecuente liberación de los contenidos celulares. De estos contenidos era de nuestro interés quedarnos con las proteínas para su posterior análisis mediante la técnica de Western Blot, con el fin de analizar algunos de los componentes de la vía de señalización de la insulina. De los tres tejidos extirpados solo dos de ellos tenían relevancia en lo que compete a la elaboración de este trabajo. Los dos tejidos seleccionados para su procesamiento fueron el tejido adiposo epididimal y el corazón. No se harán distinciones entre tejidos con respecto al proceso de homogeneización ya que son, en esencia, procesos cuasi idénticos. Las muestras de ambos tejidos fueron procesadas en dos tandas (en consonancia con la forma en que fueron obtenidas) con el fin de agilizar el trabajo y minimizar las probabilidades de errores experimentales. Se ejemplificará tomando como referencia el tejido adiposo epididimal obtenido de la primera experiencia con el objetivo de facilitar el desarrollo de los pasos concernientes al proceso en cuestión.

Las 12 muestras de tejido adiposo epididimal que se encontraban en conservación a -80°C fueron retiradas del freezer en cuestión y colocadas en un freezer a -20°C. Una a una las muestras fueron extraídas del freezer, pesadas en balanza analítica y colocadas en buffer de solubilizado a razón de 500 ul de buffer por 100 mg de tejido. La composición del buffer de solubilizado fue la siguiente: Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), ácido etilen-diaminotetraacético

(EDTA) 10 mM y Tritón X-100 1% (P/V), conteniendo PMSF 2 mM (50 ul) y aprotinina 0,1 mg/ml (45 ul) como inhibidores de proteasas. El buffer se mantuvo sin inhibidores hasta el momento de su uso (los inhibidores tienen un tiempo de vida media limitado). Una vez colocados los inhibidores se debe regular nuevamente el pH del buffer, teniendo en cuenta que el mismo debe rondar los 7,4. Se agrega HCl 1M para acidificar (se puede agregar NaOH para alcalinizar, aunque no es recomendable).

Los tejidos sumergidos en buffer de solubilizado fueron homogeneizados empleando un homogeneizador Omni-Mixer Sorvall operado a 200 rpm durante 90 segundos (entre 10 y 12 pasadas). Previamente el tejido es disgregado mecánicamente utilizando tijeras, hasta que adquiera una consistencia similar a jugo de manzana. La muestra fue mantenida en frío en todo momento, tanto durante la homogenización en sí como previa y posteriormente a la misma, minimizando el riesgo de proteólisis por acción de proteasas presentes en la muestra una vez fragmentadas las células. Los homogenatos fueron colocados en tubos Eppendorf.

Los tubos deben ser correctamente pesados uno a uno en balanza analítica para determinar las parejas que irán enfrentadas en la centrifuga (paso esencial para no arruinar el equipo). Una vez hecho esto, los doce tubos fueron centrifugados a 13.200 rpm a 4°C, durante 60 minutos en una centrifuga Eppendorf 5415 R. Pasado el tiempo correspondiente se extrajeron los tubos de la centrifuga. Cuidadosamente para evitar tomar parte del sobrenadante (grasa) o del pellet (detritos celulares), se recolectó el infranadante rico en proteínas de cada tubo y se trasladaron los mismos a nuevos tubos. Nuevamente se colocaron en hielo para mantenerlos a una temperatura de unos 4°C. Cabe destacar que, para el caso del tejido cardíaco, solo hay que evitar re suspender el pellet y tomar el sobrenadante, dado que no hay restos grasos presentes.

4.2.1 Determinación de la concentración de proteínas en homogenatos de tejido y preparación de muestras para WB

Para poder preparar las muestras para su posterior análisis por la técnica de Western Blot, primero fue necesario determinar la concentración de proteínas que existía en cada uno de los homogenatos del tejido estudiado. Para esto se utilizó el método del ácido bicinoninico

(BCA, Pierce™; **Anexo B**), un método popular para la detección colorimétrica y cuantificación de proteína total. El kit en cuestión cuenta con un reactivo BCA A (2 x 500 ml), un reactivo BCA B (25 ml) y ampollas estándar de albumina (2 mg/ml, 10 x 1 ml).

Se realizaron diluciones 1/5 del homogenato en nuevos tubos colocando 20 ul de homogenato y llevando a 100 ul finales con agua destilada. Se debe tener preparado previamente el patrón de albumina que ofrece el kit según se detalle en el data sheet. Dicho patrón se compone de 9 soluciones, de la A a la I (la solución A por lo general no se utiliza por estar altamente concentrada). Este mismo nos será de ayuda para la generación de una curva de calibración. Al trabajar con el tejido cardiaco la dilución utilizada fue de 1/50 (20 ul de homogenato llevados a 1000 ul finales), debido a la mayor cantidad de proteínas presentes en este tejido.

En una placa multiwell de 96 pocillos se sembraron 25 ul de cada uno de los homogenatos, así como de cada uno de los componentes del patrón (sin el componente A). Las siembras fueron realizadas por duplicado (**Fig. 6**).

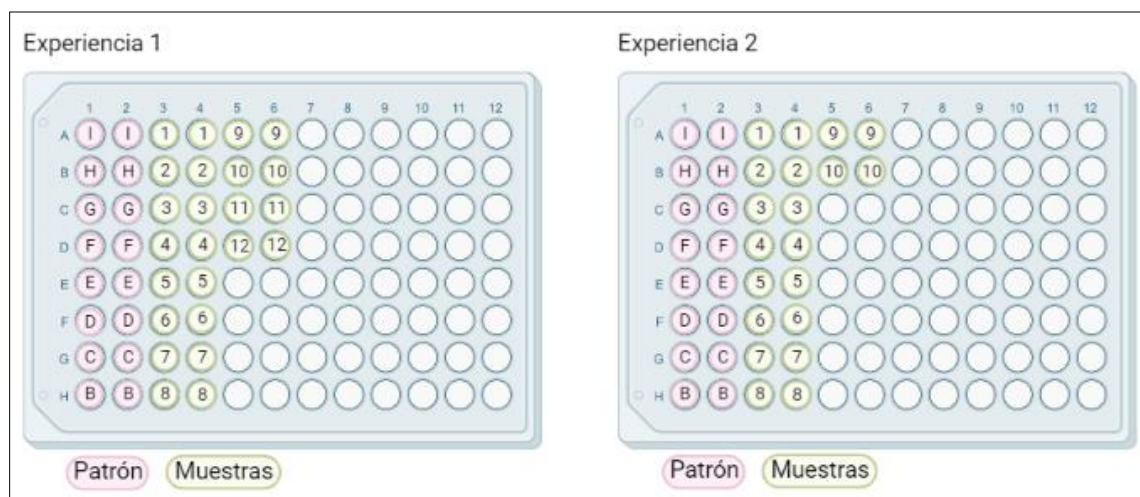


Figura 6. Esquema de sembrado de las muestras para la cuantificación de proteínas. Las muestras fueron sembradas en placas multiwell de 96 pocillos en conjunto con el patrón. (Experiencia 1) 12 muestras. (Experiencia 2) 10 muestras. Todas las siembras se realizaron por duplicado. (Fuente: de mi autoría, diseñado en BioRender)

Posterior a este paso, fue necesario preparar la solución compuesta por los reactivos A y B del kit que luego se sembraría en conjunto con lo que ya se encontraba sembrado en la placa multiwell (para la reacción colorimétrica). Esta solución (A+B) se prepara según una relación

de 50 (A) : 1 (B). El total de pocillos sembrados fue de 40 (8 patrones y 12 muestras, ambos por duplicado). Sabiendo que en cada pocillo debían sembrarse 200 ul de la solución A+B, el volumen total de solución que se debió preparar fue de 8000 ul (200 ul x 40 pocillos). Se decidió preparar 9000 ul de la solución A+B en caso de que fuera necesario algo de volumen extra. La preparación consistió en la combinación de 9000 ul del reactivo A con 180 ul del reactivo B en una probeta que luego se cubrió con Parafilm para realizar un mezclado por inversión. La solución A+B debe prepararse al momento de ser utilizada, ya que al consistir en un método colorimétrico existe la posibilidad de que la reacción se agote.

Una vez preparada la solución A+B se sembraron 200 ul de la misma en cada uno de los pocillos. Acto seguido, la placa multiwell fue colocada en una estufa a 37°C donde se la dejó incubar por 15 min.

Pasado el periodo de incubación, se retiró la placa de la estufa y se procedió a realizar la medición de las absorbancias de las muestras mediante un lector de placas. Las mediciones correspondientes se efectuaron a una longitud de onda de 560 nm. El software empleado en el análisis de los datos fue Magellan™ (Tecan). Los valores de absorbancias obtenidos fueron trasladados a una planilla de Excel donde se realizaron los cálculos pertinentes.

El tejido adiposo posee la particularidad de que presenta una menor concentración de proteínas totales. Por esta razón, y luego de los cálculos realizados en Excel, se decidió preparar las muestras para WB con una concentración final de proteínas de 0,4 ug/ul. Para esto, se les agregó a cada una de las muestras sample buffer o buffer de Laemmli 2X (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8; 2-mercaptoetanol 500 mM; 10% SDS; 50% glicerol y 0,25% azul de bromofenol) y buffer de solubilizado en cantidad suficiente para que todas posean la concentración final deseada de proteínas. Las muestras de tejido cardiaco se prepararon con una concentración final de proteínas de 4 ug/ul (como se mencionó anteriormente, este tejido presenta mayor abundancia de proteínas totales en comparación con el tejido adiposo).

Para terminar, se sellaron los tubos con parafilm y se colocaron en un baño termostático a 95°C por 5 min. Luego se transfirieron las muestras a una caja de crio-preservación y se almacenaron en un freezer a -20°C para su conservación hasta el momento de ser utilizadas.

4.3 Western Blot

Con las muestras ya preparadas correctamente a partir de los tejidos extirpados en primera instancia, la última etapa de la experiencia consistió en el análisis de las muestras en cuestión mediante la técnica de Western Blot.

A modo de descripción general del proceso, el mismo se caracteriza por cuatro pasos bien delimitados que se explicarán a continuación y que luego serán profundizados de manera individual. Primero, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con el fin de separar las proteínas de las muestras por su peso molecular (la carga se homogeniza utilizando SDS). Segundo, se transfieren las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa para su posterior incubación con anticuerpos específicos que nos permitirán reconocer estructuras de interés. Tercero, se procede a incubar las membranas con anticuerpos específicos para aquellas proteínas que representen un interés para nuestro trabajo. Cuarto y último, mediante el agregado de un sustrato se inducirá la generación de una señal quimioluminiscente que luego podrá ser capturada en una placa radiográfica para su observación y posterior análisis.

4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los geles empleados en la etapa experimental se elaboraron con una composición particular, con el fin de contar con un una región inferior o “running” del 7,5% y una región superior o “stacking” del 4% (ver **Tabla I**, ver **Tabla II**).

TABLA I: Composición del “Stacking”

Stacking (4 %)	
Agua destilada	6 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	2,6 ml
SDS 10 %	100 ul
Acrilamida 30 %	1,3 ml
Persulfato 10 %	100 ul
TEMED	15 ul
Volumen total	10 ml

TABLA II: Composición del “Running”

Running (7,5 %)	
Agua destilada	3,8 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2 ml
SDS 10 %	80 ul
Acrilamida 30 %	2 ml
Persulfato 10 %	70 ul
TEMED	7 ul
Volumen total	8 ml

La totalidad del proceso (armado, corrida y desarmado; **Fig. 7**) se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

Preparación del sistema

1. Se limpian los cristales del equipo usando guantes para evitar que los dedos dejen residuos.
2. Se arman los “sándwich” agregando al vidrio con muesca hacia adentro.
3. Se sujeta los laterales de los vidrios con los broches.

Preparación del gel

1. Se realiza la preparación de dos geles en el porcentaje que corresponda a la muestra.
2. Realizamos la mezcla de gel en un tubo para geles. Bien limpio.
3. Primero el agua, los demás reactivos y por último el Temed y Persulfato.
4. Con ayuda de una micropipeta agregamos a los cristales la mezcla hasta $\frac{3}{4}$ de los mismos o hasta la parte superior del plástico verde. Dejamos el último cuarto para el Stacking.
5. Inmediatamente con ayuda de una piseta, agregamos por uno de los extremos suavemente agua bidestilada, para favorecer la correcta polimerización.

Preparación del stacking

1. Una vez polimerizado el gel se prepara el stacking de composición descrita, recordando que el Temed y el Persulfato de amonio inician la polimerización del stacking por lo que se agregan rápidamente.

2. Se retira el agua bidestilada agregando rápidamente el stacking
3. Se coloca el peine con las calles procurando que no queden burbujas en las mismas.
4. Se deja polimerizar.

Corrida electroforética

1. Se Toma el "Sándwich", procurando no perturbar al mismo gel.
2. Debemos observar que no queden burbujas en la parte inferior del gel porque podría intervenir en la corrida.
3. Ubicamos los geles con la muesca hacia el interior y los ajustamos con las placas de acrílico. Deben quedar herméticamente ajustados.
4. Cubrimos con buffer frío la cámara interna y luego en la cámara externa. El buffer de la cámara interna se suele reutilizar ya que quedaría más limpio que el de la cámara externa, siempre corroborar que los buffer no tengan muchas impurezas o usar buffer nuevo.
5. Retiramos el peine y sembramos las muestras utilizando una jeringa Hamilton.
6. Cubrimos la cuba con la tapa y conectamos el sistema a la fuente. Seteamos la fuente para que el Stacking corra a 100 volt constantes, hasta que las bandas pasen el stacking y lleguen al gel. Aproximadamente por 30 min.
7. Dejamos correr el gel a 150 volt constantes hasta perder el frente de corrida.

Desarmado

1. Se detiene la fuente, sacamos la tapa de la cuba.
2. Recuperamos el buffer de la cámara interna, para ser reutilizado y el de la cámara externa por separado
3. Desarmamos el sistema.
4. Con ayuda de una espátula despegamos los cristales y separamos el gel del cristal simple sin muesca.
5. Eliminamos el stacking.
6. Hacemos una marquita cortando la esquina del extremo superior de la calle 1 para reconocer el orden de las calles.

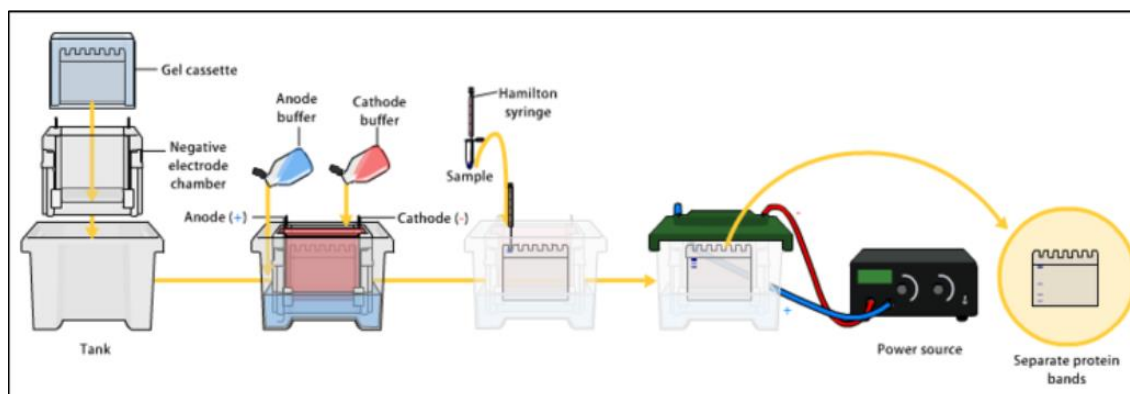


Figura 7. Esquema general de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se disponen los “cassette” en los soportes y se colocan en la cuba. Se adiciona buffer de corrida, tanto de cámara externa como de interna. Una vez sumergidos los geles se procede a sembrar mediante jeringa Hamilton®. Completa la siembra se cierra el equipo y se conecta a la fuente. Se deja correr hasta divisar la “caída” del frente de corrida. (Fuente: Bensaccount, SDS-PAGE_Electrophoresis.png, Wikimedia commons, 2009. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png>)

Debido al número total de muestras, se decidió utilizar peines de 15 calles donde se incluyeron las muestras en cuestión además de un marcador de peso molecular y un control positivo. El control positivo empleado consiste en una muestra de hígado de un animal estimulado con insulina en una experiencia previa del grupo de investigación. Dicho control genera una banda intensa y una cantidad de señal considerable que permiten realizar comparaciones contra el resto de las muestras. La siembra se realizó de manera equivalente tanto para las muestras de tejido adiposo como para las de tejido cardíaco. Se dispusieron 4 calles para cada condición, otras 2 calles se reservaron para el marcador y el control positivo y la decimoquinta calle se dejó vacía (**Fig. 8**).

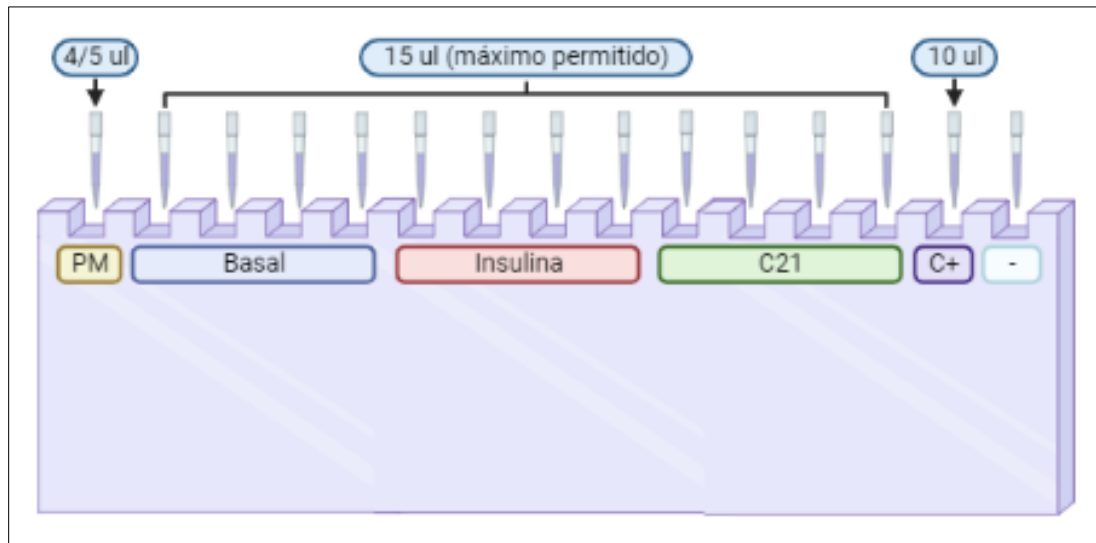


Figura 8. Esquema general para la siembra en gel de poliacrilamida con volúmenes empleados. Se utilizaron peines de 15 calles. En la primer calle se sembraron 4/5 ul del marcador de peso molecular. A partir de la segunda calle, se dispusieron 4 calles contiguas para cada una de las condiciones de estudio (Basal, Insulina y C21), sembrando 15 ul en cada una de las 12 calles. En la calle 14 se sembraron 10 ul del control positivo, mientras que la calle 15 permaneció vacía. (Fuente: de mi autoría, diseñado en BioRender)

4.3.2 Transferencia

Para este trabajo se seleccionó un método de transferencia semi seca (**Fig. 9**) dado que se determinó que se obtenían mejores resultados que con su contraparte húmeda. Se detalla a continuación el protocolo utilizado tanto para el armado y desarmado del sistema como para la transferencia en sí. El mismo consiste en los siguientes pasos:

Transferencia Semi-Seca

1. Se cortan las membranas (aproximadamente 9cm x 5cm, 1 por gel) y se activan pasándolas 15 seg por MetOH y luego las lavándolas con agua bidestilada. Se dejan en agitación con buffer de transferencia. Cortamos una de las puntas para indicar la calle 1.
2. Se debe sumergir los papeles de filtro previamente en buffer de transferencia para que estén húmedas antes de armar el "sándwich" de transferencia.
3. Se toma el cassette

4. Se coloca dos papeles de filtro. Sobre este se posiciona la membrana mojando con buffer.
5. Se agrega el gel (que siempre debe estar húmedo) encima de la membrana haciendo que coincidan los lados con las muescas.
6. Por encima se agregan dos papeles de filtro.
7. Con ayuda de un tubo se quitan las burbujas, amasando el “sándwich”, cuidando que no se desplace el gel de la membrana.
8. Se cierra el cassette ubicando peso sobre este mismo.
9. Ubicamos el cassette de manera que el lado de la membrana quede sobre el positivo (rojo) y el gel sobre el electrodo negativo (negro). Las proteínas están cargadas negativamente por lo que migraran hacia el polo positivo donde estará la membrana.

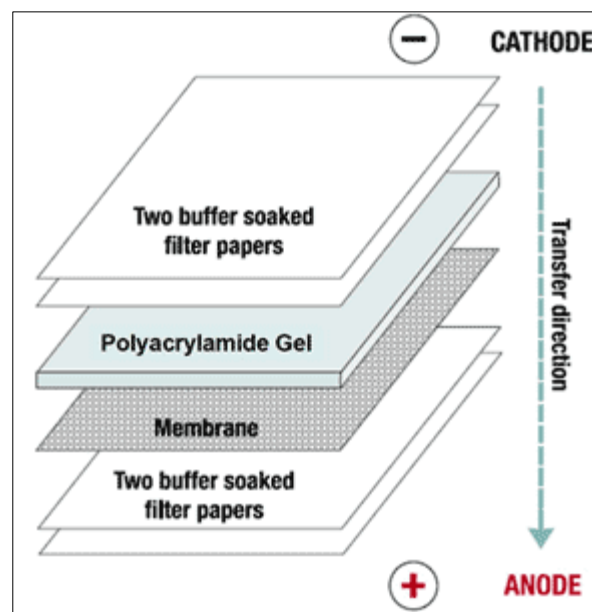


Figura 9. Proceso de armado del equipo de transferencia. El sistema cuenta con un cátodo (-) y un ánodo (+). Sobre el lado del ánodo, se coloca la membrana por encima de dos papeles de filtro. El gel se posiciona a su vez sobre la membrana. Esto es fundamental ya que las proteínas cargadas negativamente por acción del SDS tenderán a migrar al polo positivo. De esta forma se transferirán correctamente del gel a la membrana. Por último, se colocan otros dos papeles de filtro sobre el gel, se cierra el sistema y se conecta a la fuente. (Fuente: Bio-Resource, 2011. <<http://technologyinscience.blogspot.com/2011/12/western-blot-protein-immunoblot.html#.YxFbRHbMLIU>>).

10. Se conecta el sistema a la fuente (Bio-Rad Laboratories), verificando que el cable rojo se una al electrodo positivo (ánodo) y el negro al negativo (cátodo).

11. Setear para que se realice la transferencia a 0,1 A por membrana (2 membranas máximo por sistema, 0,2 A totales) variando el Voltaje durante 1 h 30 min (aumentar el V hasta que llegue el límite de 0,1 A por membrana. Controlar que el Amperaje no caiga, de hacerlo aumentar el voltaje).

Desarmado de ``Sándwich``

1. Se prepara el rojo Ponceau
2. Se abre el sándwich
3. Se descartan los geles. Los papeles de filtro se lavan con agua destilada y se dejan sobre servilleta blanca para su reutilización.
4. Se visualiza los marcadores de peso molecular y se marcan con lapicera.
5. Se lavan las membranas levemente con agua destilada y se colocan en contenedores de acrílico. Se realiza el agregado de Ponceau durante 30 segundos aproximadamente para visualizar las proteínas.
6. Se retira y se lava el Ponceau con agua destilada.

Utilizando como referencia las proteínas visualizadas gracias al rojo Ponceau, las membranas fueron cortadas para su incubación diferencial con el objetivo de observar diferentes proteínas de interés. Se realizaron los cortes correspondientes para la identificación de: Akt, pAkt, Erk, pErk, IR y pIR. Los pesos moleculares característicos (**ver Tabla III**) para cada una de las proteínas se utilizaron como referencia para realizar dichos cortes.

Tabla III: Pesos moleculares característicos para cada una de las proteínas en estudio

Proteína	Peso molecular (KDa)
IR	95
pIR	96
Akt	60
pAkt 473	60
Erk	42/44
pErk	42/44

El perfil de corrida de las proteínas no solo depende de su peso molecular sino también del porcentaje del gel utilizado (**Fig. 10**). Cuanto mayor el porcentaje, mayor el entramado. De esta manera, la composición del gel puede variarse según el nivel de resolución buscado.

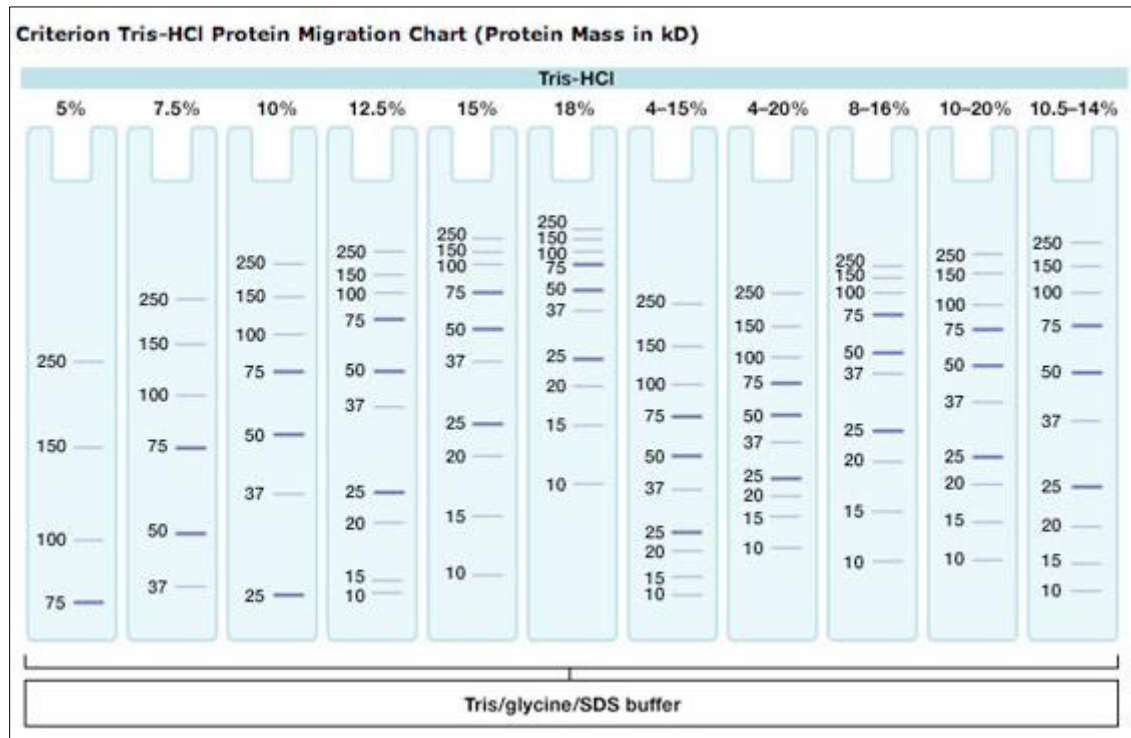


Figura 10. Perfil de corrida de proteínas según sus pesos moleculares y la composición del gel utilizado. La composición del gel determina su entramado. Dicho entramado influirá en la capacidad de migración de las proteínas sembradas según su peso molecular. Cuanto mayor le porcentaje, mejor resolución a bajos pesos moleculares. Cuanto menor el porcentaje, mejor resolución a altos pesos moleculares. Los pesos moleculares están expresados en kilodaltons (kD). (Fuente: Bio-rad, Criterion™ Tris-HCL Gels. <https://www.bio-rad.com/es-ar/life-science-research/overlay/criterion-gel-migration-charts?ID=Tris-HCl-gels_0921120807605>).

Las membranas resultantes se colocaron en nuevos contenedores de acrílico de menor tamaño para su bloqueo y posterior incubación con anticuerpos.

Bloqueo

1. Una vez concluida la transferencia se desarma el "sándwich", cuidadosamente, con la pinza tomando la membrana.
2. Se ubica la misma en una caja acrílica, con la cara que estuvo en contacto con el gel hacia arriba.

3. Se agrega la solución de bloqueo BSA 3% TBS-T 0.1% y se deja actuar durante 2 hs a temperatura ambiente y agitación. Se debe cuidar que la solución cubra completamente la membrana.

El bloqueo permite que los anticuerpos agregados en pasos posteriores solo se unan específicamente a las proteínas de interés, evitando las uniones inespecíficas que llevarían finalmente a la detección de señal no deseada.

4.3.3 Incubación con anticuerpos

Se realizaron dos incubaciones por separado. En primer lugar, con anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés y, en segundo lugar, con un anticuerpo secundario inespecífico acoplado a una peroxidasa, el cual interactuara con los anticuerpos primarios previamente adicionados. Por lo general los anticuerpos primarios son agregados en diluciones 1:1.000 o 1:2.000, mientras que el anticuerpo secundario se adiciona en una dilución de 1:20.000. Según el anticuerpo primario empleado la dilución puede ser menor (1:200 o 1:500), con el fin de asegurar un mejor resultado a una mayor concentración. A continuación, se detalla el protocolo utilizado para la incubación con ambos anticuerpos:

Anticuerpo primario

1. Se retira la solución de bloqueo.
2. Se realiza la incubación del anticuerpo primario (**ver Tabla IV**) overnight en la cámara fría y con un shaker.

Tabla IV: Dilución empleada para cada anticuerpo primario

Anticuerpo 1°	Dilución
IR	1:200
pIR	1:200
Akt	1:500
pAkt 473	1:1000
Erk	1:2000
pErk	1:2000

Lavados (primera tanda)

1. Se guardan los anticuerpos primarios actualizando la cantidad de usos.

2. Se realizan 3 lavados con TBST 0,1% en agitación y a temperatura ambiente. La duración de los mismos es de 10 minutos cada uno (30 min totales de lavado).

Anticuerpo secundario

1. Se agrega el anticuerpo secundario (**ver Tabla V**) que corresponda a cada anticuerpo primario. En este caso se empleó el mismo anticuerpo para todas las membranas.

Tabla V: Dilución empleada para el anticuerpo secundario

Anticuerpo 2°	Dilución
Anti-rabbit IgG – Cell signaling – 7074S	1:20.000

2. Se realiza la incubación del anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente y en shaker.

Lavados (segunda tanda)

1. Se recupera el anticuerpo secundario actualizando la cantidad de usos.
2. Se realizan 3 lavados con TBST 0,1% en agitación y a temperatura ambiente. La duración de los mismos es de 10 minutos (30 min totales de lavado).

En este momento las membranas ya se encuentran en condiciones para la última etapa de la técnica de WB que consiste en el revelado de las membranas.

4.3.4 Revelado

Para la etapa de revelado se utilizó el kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (**Anexo C**). El mismo cuenta con un sustrato específico para la HRP (Horse Radish Peroxidase) acoplada al anticuerpo secundario. Mediante la adición de este sustrato se obtiene una reacción quimioluminiscente (**Fig. 11**) que puede ser detectada por medio de la implementación de films de detección de quimioluminiscencia Amersham Hyperfilm. El siguiente protocolo corresponde a los pasos seguidos durante esta instancia:

Protocolo de revelado

1. Realizar varios lavados con agua destilada.

2. Una vez en cámara oscura mezclar el ECL: 1 ml del frasco grande y 25 ul del frasco chico. Generalmente, se calculan 300 ul por membrana de la solución combinada. En base a ese cálculo y al número de membranas a revelar, se prepara cantidad suficiente de dicha solución. La solución puede prepararse fuera del cuarto oscuro en un ambiente no tan luminoso y en un contenedor color caramelo. De cualquiera de las dos formas se busca reducir el “bleaching”.
3. Actuar con rapidez una vez preparado el ECL porque el efecto comienza a sufrir agotamiento. Bañar las membranas con ECL por 5 minutos. Cada 1 minuto tomar nuevamente el ECL de la placa y verterlo nuevamente sobre cada membrana.
4. Pasados los 5 minutos, dejar secar las membranas sobre servilleta blanca. Una vez secas, colocarlas en bolsas plásticas transparentes de 9 x 3 cm aproximadamente.
5. En oscuridad (luz roja) cortar films de detección de quimioluminiscencia de 9 x 2 cm para cada membrana. En todo momento debe evitarse exponer los films a la luz ya que se produciría el velado del film, lo que lo dejaría inutilizable.
6. Colocar en el lado blanco del chasis el film de detección.
7. Colocar la membrana encima de la placa y cerrar chasis.
8. Tanto membrana como film deben estar correctamente rotulados para hacerlos coincidir entre si e identificar fácilmente la calle 1 luego en el film.
9. Se expone el film durante un rango de tiempo considerando la efectividad del anticuerpo y la concentración de proteína. Los tiempos pueden ir desde 10 segundos hasta 1 hora.
10. Sacar membrana y obtener el film.
11. Colocar el film en solución de revelado hasta que se ven todas las bandas (no sobreexponer a la solución de revelado para evitar que se oscurezca el film).
12. Pasar a agua destilada unos minutos.
13. Pasar a solución fijadora.

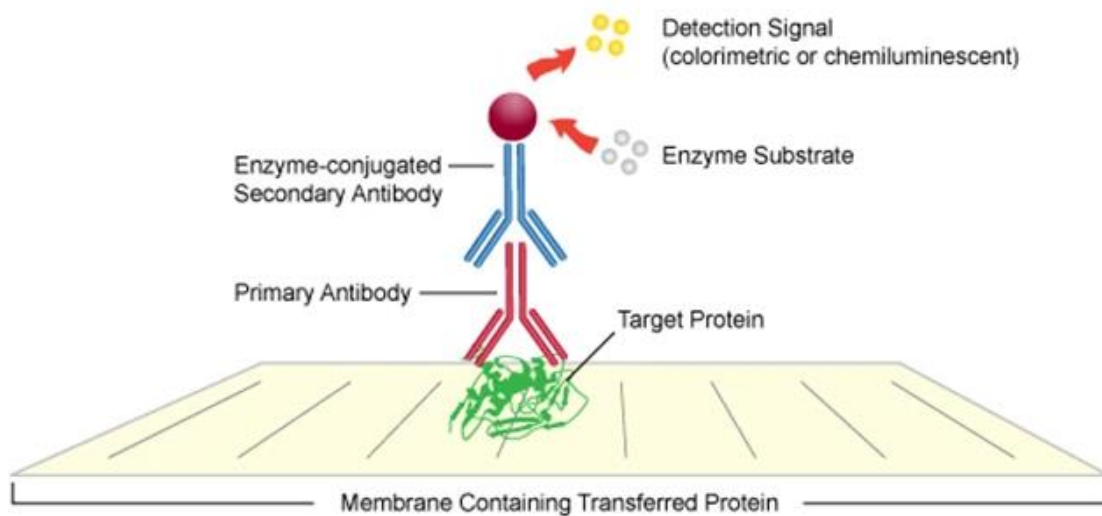


Figura 11. Proceso de detección de proteínas. El anticuerpo primario (rojo) se une en primera instancia a la proteína objetivo. El anticuerpo secundario (azul) se une al primario en un paso posterior. El anticuerpo secundario tiene acoplada una enzima (HRP, Horse Radish Peroxidase). Mediante la adición de un sustrato compatible con la enzima (Luminol) se genera una reacción quimioluminiscente, señal que puede ser detectada utilizando placas radiográficas. (Fuente: Bina Bhandari, Microbe Online, 2022. <<https://microbeonline.com/western-blot-technique-principle-procedures-advantages-and-disadvantages/>>)

4.4 Tinción con azul de Coomassie

Dentro de la técnica de Western blot, existen dos factores que resulta indispensable controlar para asegurar una comparación confiable entre la cantidad de proteínas presentes en diferentes muestras. Estos dos factores en cuestión son la eficiencia en la transferencia y la cantidad de proteína total cargada en cada calle al momento de realizar la corrida electroforética. Para esto último es que se requiere la implementación de lo que se conoce como un control de carga. Comúnmente el control de carga se realiza mediante la utilización de proteínas “housekeeping”, las cuales presentan la característica (a veces solo supuesta) de contar con una expresión constante. Algunas proteínas generalmente empleadas como control de carga son la actina, la β -tubulina y GAPDH. Esta opción presenta ciertos inconvenientes como, por ejemplo: la expresión de la proteína control puede diferir entre las diversas muestras, las variaciones en la eficiencia de la transferencia no son detectadas eficazmente, para proteínas poco abundantes el gel puede estar sobrecargado con respecto a la proteína control, etc. De esta manera, se han establecido alternativas a la utilización de estas proteínas como control de carga,

por ejemplo, recurriendo a una tinción con azul de Coomassie tradicional (Welinder y Ekblad, 2011). Dicho método fue el que se utilizó en este trabajo en contraposición a la utilización de actina como proteína control que se venía aplicando. Para esto, una vez que el revelado estaba completo y las membranas ya no eran requeridas, se procedió a teñir las mismas con el azul de Coomassie mediante el siguiente protocolo:

1. Hidratar las membranas enjuagando las mismas con agua destilada (es recomendable, aunque se puede trabajar con las membranas secas).
2. Colocar boca abajo (donde transfirieron las proteínas) en un contenedor de acrílico. Agregar el colorante asegurándose de cubrir por completo cada membrana.
3. Dejar actuar por un lapso de tiempo que puede ir desde los 15 minutos hasta overnight (el tiempo de exposición dependerá de las muestras).
4. Pasado el tiempo de exposición, retirar las membranas y colocarlas en otro contenedor previamente cargado con decolorante. Agitar por unos minutos hasta que se aprecie un claro contraste entre las bandas y el fondo.
5. Enjuagar con agua corriente y dejar secar.

Una vez secas las membranas deben escanearse antes de transcurridos 2 días.

4.5 Expresión de los resultados y análisis estadístico de datos

Una vez efectuado el revelado, las placas resultantes en conjunto con las membranas teñidas con Coomassie se escanearon para contar con una imagen digitalizada de las mismas. Mediante el programa Gel-Pro Analyzer (versión 4.0.00.001; ©1996-2000 Media Cybernetics, L.P.) se midió la densidad óptica de las bandas visualizadas tanto en las placas como en las membranas, obteniendo los valores de densidad total. Estos valores recibieron un tratamiento previo al análisis estadístico de los mismos. Los valores de densidad total de cada placa fueron relativizados contra el valor de la media de dicho parámetro para las muestras estimuladas con insulina. El mismo procedimiento se llevó a cabo para las membranas teñidas. Posteriormente se relativizaron los valores de cada placa con los de su membrana correspondiente. Finalmente se calculó el ratio entre proteína fosforilada y proteína total para cada una de las proteínas de interés. Este ratio representa de manera más convincente las variaciones reales en la

fosforilación de una proteína. Los datos resultantes fueron transferidos a un software destinado al análisis estadístico de los mismos.

Los resultados provenientes de la medición de los niveles de fosforilación in vivo de las proteínas analizadas mediante WB se representaron como un porcentaje de las muestras estimuladas con insulina, considerando que el 100% del estímulo siempre estará reservado para estas muestras en particular. A su vez, estos resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (mean \pm SEM). Las diferencias entre las 3 condiciones de estudio se analizaron mediante ANOVA unidireccional. Posteriormente se aplicó el test de Tukey para la comparación entre los valores correspondientes a cada condición. El software empleado para el análisis estadístico fue GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.). Se utilizaron valores de significancia de $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

5. Resultados

5.1 Tratamiento de ratones C57BL/6 con C21

Con el objetivo de estudiar los efectos desencadenados por el agonismo inducido del receptor AT₂ y favorecer la comprensión sobre el papel que el mismo ostenta en la modulación de la vía de señalización de la insulina, se procedió a analizar el grado de activación (fosforilación) in vivo de ciertos nodos esenciales de la vía en cuestión (IR o Insulin Receptor, Akt y ERK1/2) en los tejidos seleccionados para este trabajo. El grado de actividad de cada uno de los componentes de señalización se determinó evaluando el nivel de fosforilación de diversos residuos característicos para cada uno de ellos. Los residuos son: Serina 473 (S473) para Akt; Treonina 202 y Tirosina 204 (T202 e Y204) para ERK1/2 y Tirosina (Y) para IR.

5.1.1 Efecto del tratamiento con C21 sobre la señalización de la insulina en tejido adiposo

En primera instancia se puede apreciar que el estímulo agudo con insulina produjo un aumento significativo en el nivel de fosforilación de los 3 componentes de señalización estudiados en este tejido (**Figura 12, A-C**). Cabe destacar que, para la representación de los valores obtenidos en los gráficos de barras, se tomó como referencia en todos los casos el valor de la media de los estimulados con insulina. Esto se corresponde con la previa suposición de que el 100% del estímulo siempre se encontrara en las muestras estimuladas con insulina, lo que representa la condición ideal.

La administración de C21 desencadenó un aumento en los niveles de fosforilación de 2 de los 3 componentes de señalización estudiados, siendo los mismos Akt y ERK1/2. Para el caso de Akt, el incremento en la actividad es significativamente mayor que en condiciones basales, pero a su vez es significativamente menor que para las muestras estimuladas con insulina (**Figura 12 A**; $P < 0,05$). Sorpresivamente, para el caso de ERK1/2 el incremento de la actividad superó significativamente tanto a las muestras correspondientes a la condición basal ($P < 0,01$) como a las estimuladas con insulina (**Figura 12 B**; $P < 0,05$). Por último y respecto al componente de señalización faltante IR, el tratamiento con C21 no parece generar una

variación significativa en la actividad respecto del nivel de actividad observado en condiciones basales, siendo el grado de fosforilación en ambos casos significativamente menor en relación a las muestras estimuladas con insulina (**Figura 12 C**; $P < 0,01$).

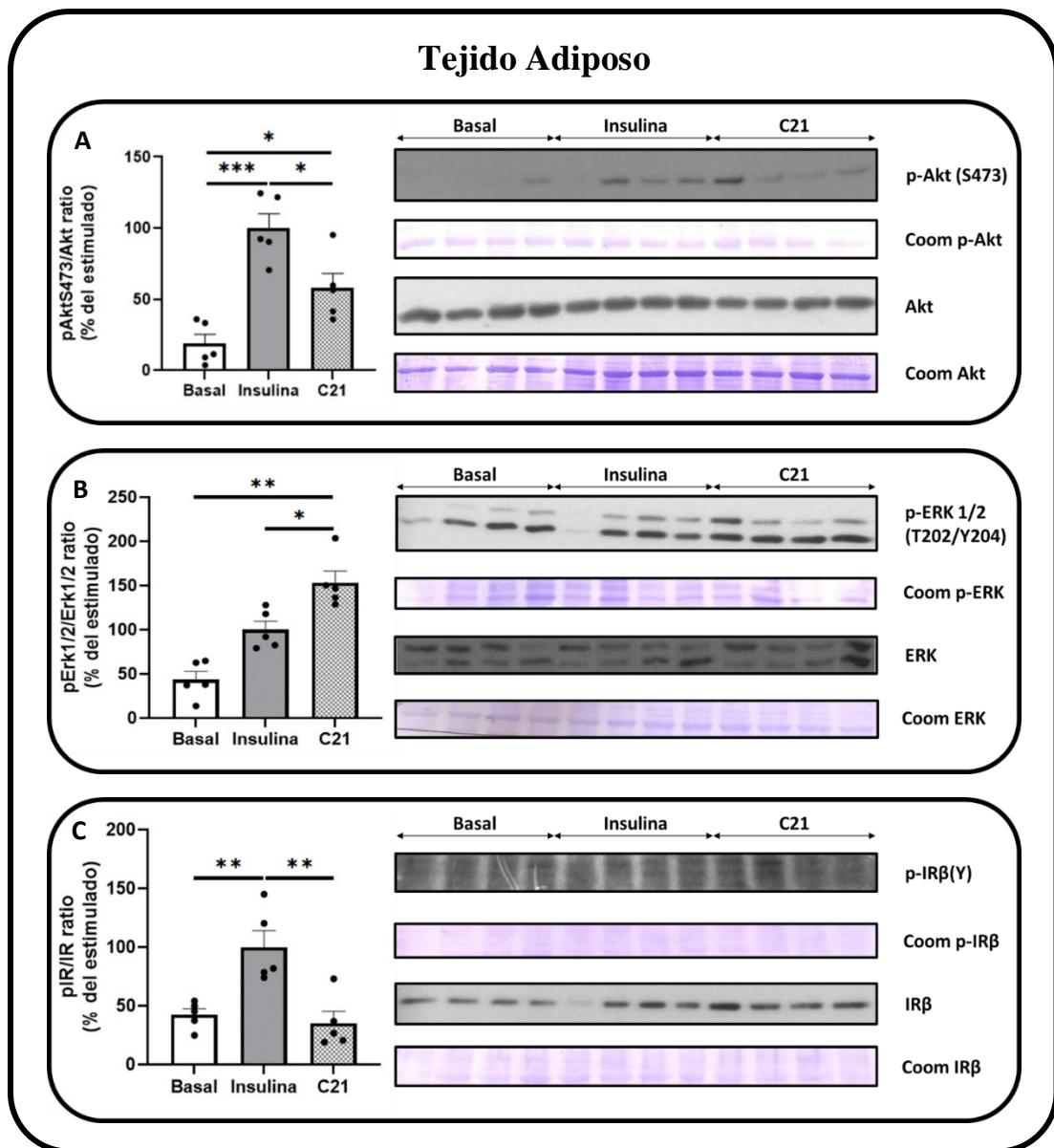


Figura 12. Estudio del efecto del tratamiento con C21 sobre el nivel de fosforilación de Akt (A), ERK1/2 (B) e IR (C) en el tejido adiposo de ratones C57BL/6. Contraste con muestras en condiciones basales y de estimulación con insulina. Anticuerpos fosfo-específicos fueron utilizados para detectar el nivel de fosforilación en residuos S473 de Akt, residuos T202 e Y204 de ERK1/2 y residuos Y de IR, en extractos totales de tejido. Los gráficos de barras representan la cuantificación de la fosforilación de los diferentes componentes de señalización en relación a la abundancia de sus respectivas proteínas totales. Los valores están presentados como la media \pm EE y se encuentran expresados como % de la media de los estimulados con insulina. Como referencia de control de carga en los geles de poli-acrilamida se determinó el total de proteína cargada mediante tinción con Azul de Coomassie (Coom). La significancia estadística fue analizada por ANOVA unidireccional seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples; $n = 5$ para todos los casos. [(*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$; (***) $P < 0,001$].

5.1.2 Efecto del tratamiento con C21 sobre la señalización de la insulina en músculo cardíaco

Nuevamente, y en consonancia con lo descrito en la sección previamente presentada, la estimulación aguda con insulina demostró generar un incremento significativo en la actividad de todos los componentes de señalización en observación, para todas las muestras pertenecientes a aquellos ratones asignados a esta condición de estudio (**Figura 13, A-C**). Al igual que para el tejido adiposo, a la hora de representar los datos obtenidos a partir de la práctica experimental, se mantuvo constante la aplicación de la suposición que asignaba el 100% del estímulo a aquellas muestras de ratones que fueron estimulados con insulina. De esta manera, todos los valores expuestos se presentan como un porcentaje de la media de los estimulados (de ahí que la barra perteneciente a la condición “Insulina” tenga su límite máximo en el valor $y = 100$).

A diferencia de lo observado anteriormente con el tejido adiposo, en este caso los resultados obtenidos son considerablemente menos divergentes. En primer lugar, podemos apreciar que, para los 3 componentes de señalización analizados, el grado de fosforilación en las muestras correspondientes a ratones estimulados con insulina es significativamente mayor que los niveles de actividad alcanzados bajo las otras dos condiciones de estudio (“Basal” y “C21”). Tanto para Akt (**Figura 13 A**) como para IR (**Figura 13 C**), la diferencia significativa observada en el nivel de fosforilación es sustentada por un $P < 0,001$; mientras que para ERK1/2 este valor pasa a ser de $P < 0,01$ (**Figura 13 B**). En segundo lugar (y finalizando este apartado), es importante mencionar que para ninguno de los 3 componentes de señalización resultó modificado de manera significativa el nivel de fosforilación al comparar las muestras pertenecientes a ratones inyectados con solución fisiológica (condición “Basal”) con las pertenecientes a ratones inyectados con el agonista (condición “C21”).

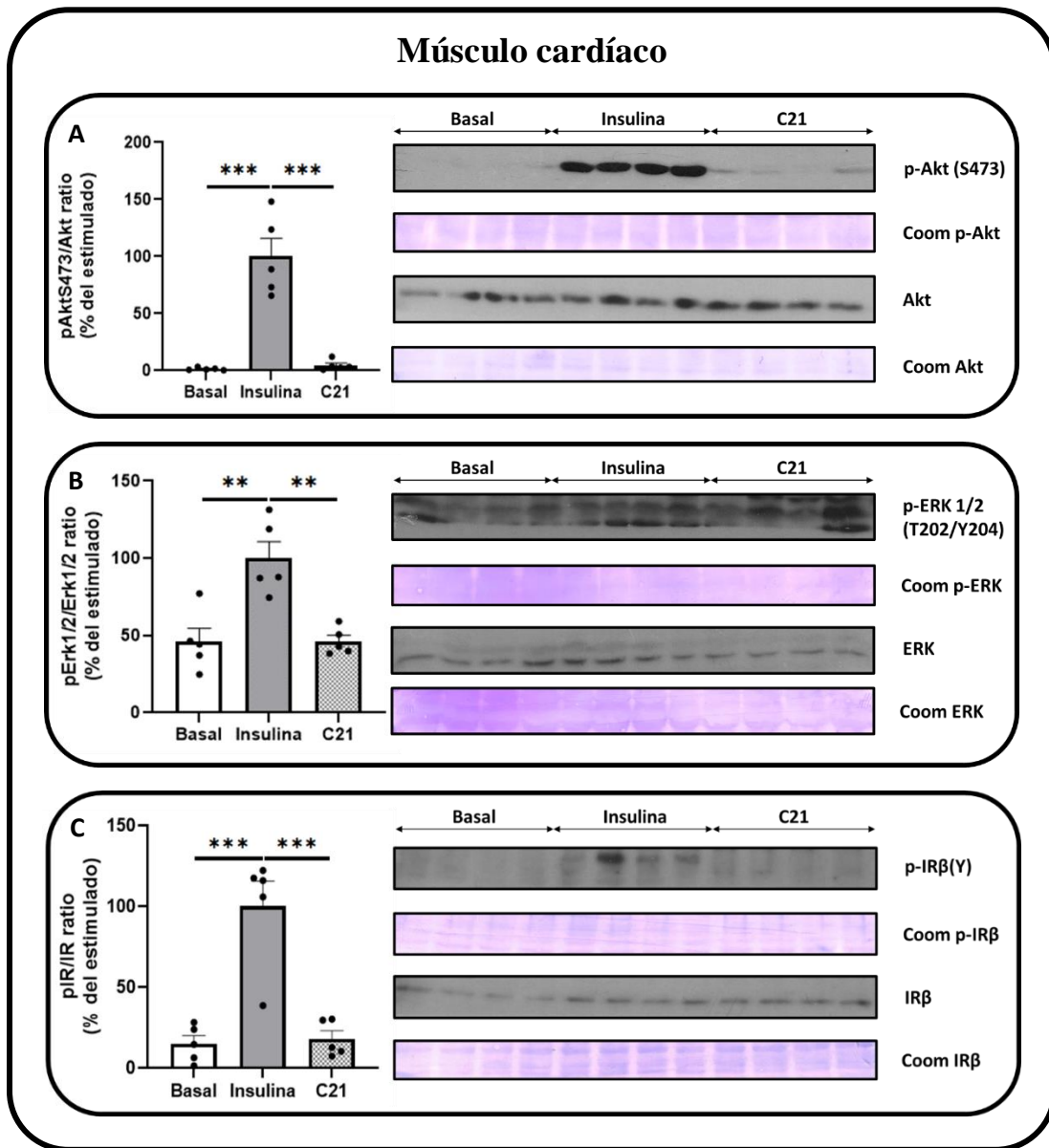


Figura 13. Estudio del efecto del tratamiento con C21 sobre el nivel de fosforilación de Akt (A), ERK1/2 (B) e IR (C) en músculo cardíaco de ratones C57BL/6. Contraste con muestras en condiciones basales y de estimulación con insulina. Anticuerpos fosfo-específicos fueron utilizados para detectar el nivel de fosforilación en residuos S473 de Akt, residuos T202 e Y204 de ERK1/2 y residuos Y de IR, en extractos totales de tejido. Los gráficos de barras representan la cuantificación de la fosforilación de los diferentes componentes de señalización en relación a la abundancia de sus respectivas proteínas totales. Los valores están presentados como la media \pm EE y se encuentran expresados como % de la media de los estimulados con insulina. Como referencia de control de carga en los geles de poliacrilamida se determinó el total de proteína cargada mediante tinción con Azul de Coomassie (Coom). La significancia estadística fue analizada por ANOVA unidireccional seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples; n = 5 para todos los casos. [(**) P < 0,01; (***) P < 0,001].

6. Discusión de resultados

6.1 Consideraciones generales sobre el tema de estudio: recopilación de conceptos en base al conocimiento desarrollado hasta el momento

A lo largo de este trabajo se hizo hincapié en reiteradas ocasiones sobre el impacto de la Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) a nivel global. Esta patología representa la causa de muerte de millones de personas anualmente alrededor del mundo, así como también un gasto en salud considerablemente elevado. Se determinó que un estado de resistencia a la acción de la insulina en el organismo es un indicador claro de un futuro desarrollo de DMT2, además de considerarse uno de los factores de riesgo más comunes identificado en la condición conocida como síndrome metabólico (DeFronzo, 2009). Para poner un freno al avance pronosticado de esta enfermedad es necesario, entre otras cosas, avanzar en el conocimiento minucioso de los componentes que forman parte de la vía de señalización de la insulina, como así también dilucidar aquellos nexos existentes entre dicha vía y otros sistemas que puedan participar en el desarrollo de ciertas patologías. Un claro ejemplo de esto es el ya mencionado sistema renina-angiotensina. Múltiples trabajos han demostrado que las alteraciones existentes en este sistema en particular actúan como un factor determinante en el desarrollo de insulinoresistencia (Henriksen, 2007; Perkins y Davis, 2008; Sarzani *et al.*, 2008). De igual manera se ha descrito que la elevación crónica de la hormona Angiotensina II (Ang II) modula de manera negativa las acciones metabólicas de la insulina (Rao, 1994; Richey *et al.*, 1999; Ogihara *et al.*, 2002). Es así que se ha llegado a la conclusión de que la actividad desregulada del SRA tan característica en patologías tanto cardíacas como metabólicas pareciera tener cierta incidencia en el desarrollo de una condición de resistencia a la acción de la insulina (Sowers, 2004). Estos efectos contraproducentes están mediados en su mayoría por el receptor AT₁ cuyo accionar se asocia a una gran variedad de patologías, entre las cuales se ha incluido en el último tiempo a la insulinoresistencia y su consecuente transición a la DMT2 (Paulis *et al.*, 2016). Mas aun, se ha descubierto que el bloqueo selectivo de estos receptores desencadena efectos beneficiosos sobre la acción de la insulina (Shiuchi *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que la hormona Ang II tiene afinidad tanto por el receptor AT₁ como por su contraparte, el receptor AT₂, se ha demostrado que ante el bloque del primero la Ang II libre puede unirse al

segundo, amplificando los efectos metabólicos beneficiosos antes mencionados (Paulis *et al.*, 2016). Previamente en este documento fue descripta la naturaleza antagónica propia del receptor AT₂ con respecto al receptor AT₁, haciendo énfasis en que su activación origina una serie de respuestas que se oponen a las acciones mediadas por el receptor AT₁ (de Gasparo *et al.*, 2000), promoviendo la vasodilatación, la diferenciación celular y efectos antiinflamatorios, por mencionar algunas de ellas (Horiuchi *et al.*, 1999; Carey, 2013). Trasladando estos conceptos al plano específico del metabolismo, en los últimos años innumerables fuentes han demostrado experimentalmente que la estimulación del receptor AT₂ promueve múltiples beneficios *in vivo* en modelos animales de patologías tales como la diabetes, resistencia a la insulina o alteraciones en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Ohshima *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013; Shum *et al.*, 2013). Lamentablemente, y a pesar de todo lo expuesto, existen aspectos que hasta el día de hoy permanecen como grandes incógnitas, sobre todo en lo relacionado a los mecanismos moleculares que participan en la interacción entre el receptor AT₂ y la señalización de la insulina o aquellos tejidos donde efectivamente este receptor modula la acción de la hormona en cuestión. Justamente estudiar el papel del receptor AT₂ en la modulación de las acciones de la insulina y los mecanismos involucrados en esta interacción fueron las ideas principales que conformaron el eje a partir del cual fue concebido este proyecto.

6.2 Efectos generados por el agonismo farmacológico del receptor AT₂

Estudios recientes han demostrado como el agonismo farmacológico crónico del receptor AT₂ empleando C21 genera en ratones C57BL/6 una serie de efectos metabólicos benéficos, tales como la disminución de la glucemia en ayunas, el incremento de la tolerancia a la glucosa y el incremento de la sensibilidad a la insulina (Quiroga *et al.*, 2018). Estas observaciones evidencian el rol fundamental que el receptor AT₂ ostenta en la modulación de los niveles de glucemia en condiciones fisiológicas. Esta notable mejoría en torno al metabolismo de la glucosa se ha asociado a una serie de factores, tales como: el incremento en la actividad tanto de Akt como de ERK1/2 en condiciones basales en el hígado, un aumento de la fosforilación de Akt en tejido adiposo y una inhibición de la activación de ERK1/2 en musculo esquelético y en tejido adiposo. Parte de estos resultados sustentan la teoría de que el

tejido adiposo juega un papel crucial en lo que al agonismo del receptor AT₂ se refiere, posiblemente mediando muchos de los efectos positivos inducidos por el tratamiento con C21.

Numerosos trabajos previamente publicados han descrito un significativo incremento en la sensibilidad a la acción de la insulina tras el tratamiento con C21 en una variedad de modelos de roedores insulinoresistentes y de DMT2 (Ohshima *et al.*, 2012; Shum *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Castoldi *et al.*, 2014).

Se ha establecido que la elevación crónica de la hormona Ang II influye de manera negativa en el accionar de la insulina, atenuando la actividad de Akt a través del receptor AT₁ y con la colaboración de la enzima ERK1/2 (Dunner *et al.*, 2013). En consonancia con estos descubrimientos, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que en el tejido adiposo de ratones C57BL/6, el tratamiento con C21 incrementó los niveles de fosforilación de Akt en condiciones basales. Si bien este incremento no llega a equipararse con los niveles alcanzados en presencia de insulina, es evidente que existe una tendencia hacia la estimulación de este nodo de señalización cuyo origen se encuentra en el agonismo selectivo del receptor AT₂. En respuesta a la insulina, esta potenciación de Akt resulta aumentada considerablemente y, por lo general, viene acompañada de una inhibición del componente ERK1/2, el cual participa en la atenuación de Akt (Than *et al.*, 2017). Esta sobre activación de Akt inducida por la insulina en el tejido adiposo contribuiría en gran medida a la capacidad del C21 para mejorar la absorción de glucosa en el tejido en cuestión (Ohshima *et al.*, 2012). Por otra parte, y contrario a lo esperado, el tratamiento con C21 resultó en el incremento de los niveles de fosforilación basales de ERK1/2 en el tejido adiposo. Situaciones similares han sido descritas en otros trabajos y se atribuye principalmente a una acción directa del C21 sobre las células del tejido. En estos trabajos en cuestión se observó que en algunos casos la incubación con el fármaco o su administración estimulan la fosforilación de ERK1/2, existiendo la posibilidad de que una estimulación prolongada del receptor AT₂ genere un aumento en los niveles de fosforilación basales de ERK1/2 (Quiroga *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2004; Kaschina *et al.*, 2008). En contraste con lo indicado para el caso de Akt, se hizo mención a que la presencia de insulina induce una disminución en la actividad de ERK1/2, consistente con el incremento en la actividad de la primera. Diversos estudios han concluido que este proceso de desfosforilación de ERK1/2

involucra la participación de fosfatasas específicas de residuos Tyr y Ser/Thr (Roskoski, 2012). De hecho, uno de los primeros eventos asociados a la activación del receptor AT₂ fue la activación de fosfatasas, entre las que destaca MKP-1, enzima con un rol destacado en la regulación de la actividad de ERK1/2 (Guimond y Gallo-Payet, 2012; Carey, 2017). Esto explica la capacidad del C21 para inhibir la fosforilación de ERK1/2 al interactuar con el receptor AT₂.

En condiciones fisiológicas, la insulina actúa en el corazón regulando la utilización de la glucosa como el sustrato energético primario, promoviendo la captación de dicho sustrato y su aprovechamiento mediante el proceso de glucólisis. A su vez, induce una serie de efectos positivos como el aumento en la contracción de los cardiomiocitos (Maier *et al.*, 1999; von Lewinski *et al.*, 2005; Teshima *et al.*, 2000), la estimulación de la angiogénesis (Walsh, 2006; O'Neill y Abel, 2005), la supresión de la apoptosis (Duronio, 2008), entre otros. Se ha establecido que la insulina actúa de manera directa sobre el músculo cardíaco y su acción está mediada por el nodo de señalización PKB/Akt (Bertrand *et al.*, 2008). En condiciones patológicas, como podría ser ante un diagnóstico de DMT2, isquemia miocárdica o hipertrofia cardíaca, tanto la vía de señalización de esta hormona como su accionar se ven considerablemente alterados. En la iniciación y posterior progresión de enfermedades cardiovasculares como las mencionadas participa activamente el sistema renina-angiotensina, principalmente a través de las acciones mediadas por el receptor AT₁ (de Gasparo *et al.*, 2000). Oportunamente, para las acciones inducidas por el receptor AT₁ existe un accionar diametralmente opuesto mediado por el receptor AT₂, el cual se presenta pobremente expresado en el tejido sano, pero altamente expresado en el tejido dañado. Este receptor despliega una serie de medidas que tienen como fin la protección y la preservación del tejido afectado, mediando procesos anti-inflamatorios, anti-oxidativos y anti-apoptóticos (Lauer *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2012; Oishi *et al.*, 2003; Hardwick *et al.*, 2015). Esta serie de efectos benéficos promovidos por el receptor AT₂ pueden ser potenciados estimulando farmacológicamente dicho receptor de manera selectiva, por ejemplo, mediante el agonista C21 (Kaschina *et al.*, 2008). En relación a la acción del C21 en el tejido cardíaco, los resultados obtenidos en este trabajo denotan unos niveles de fosforilación invariables respecto al estado basal tras el tratamiento con C21, tanto para el caso de Akt como para el caso de ERK1/2. A priori, y comparando con

lo observado en el tejido adiposo, se podría suponer que estos resultados exponen una falencia en la capacidad del receptor AT₂ para modular las acciones de la insulina en el tejido cardiaco. Teniendo en cuenta que se ha demostrado en múltiples trabajos que la respuesta inducida por la acción del C21 es tejido-específica, sería incorrecto considerar esta suposición como válida. Esta variabilidad observada puede estar sujeta a la relación existente entre el receptor AT₁ y el receptor AT₂. Como ya fue mencionado anteriormente en este apartado, el receptor AT₂ ve incrementada su expresión ante un daño tisular en comparación con los niveles de expresión mínimos fundamentales apreciados en el tejido sano (Lee *et al.*, 2008). La preponderancia del receptor AT₁ en un tejido en particular puede llevar a una disparidad en el equilibrio natural entre ambos. Teniendo en cuenta que este estudio se realizó con animales sanos, una presencia disminuida de receptores AT₂ en el tejido cardiaco podría explicar los resultados obtenidos. Se han documentado resultados similares en otros trabajos, aunque bajo parámetros de estudio modificados. En uno de ellos, se utilizaron ratas Sprague-Dawley las cuales fueron sometidas a 3 protocolos diferentes de estimulación prolongada mediante la administración de diferentes soluciones, incluyendo el C21. Al finalizar el estímulo los animales fueron sacrificados y los niveles de fosforilación de Akt se analizaron mediante WB. Se observó que los niveles de fosforilación de Akt presentaban una tendencia positiva (incremento) pero sin alcanzar la significancia estadística (Yan *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que en mucha de la bibliografía consultada los tratamientos con C21 suelen ser crónicos o por periodos prolongados de tiempo, el corto periodo de exposición a dicho compuesto que se realizó en este trabajo podría ser otra de las causas que explicaría los resultados apreciados.

6.3 Observaciones respecto a la modulación de la vía de señalización de la insulina inducida por el receptor AT₂

Finalizando con esta sección, podemos determinar que los resultados obtenidos a través de la práctica experimental, los cuales han sido debidamente expuestos en este documento, sustentan la idea de que el receptor AT₂ ejerce un efecto modulador sobre la acción de la insulina.

En lo concerniente al tejido adiposo, se aprecia un efecto posterior al tratamiento con el C21 tanto en Akt como en ERK1/2. Sería recomendable la implementación de ensayos complementarios donde se adicione una condición extra que conlleve el suministro de C21 e insulina en conjunto, tal y como se puede encontrar en otros trabajos estrechamente relacionados. Lógicamente se esperaría que, en conjunto con la insulina, la tendencia al incremento en la fosforilación de Akt se viera potenciada. De igual manera, se esperaría que el aumento basal inesperado (pero fundamentado) en los niveles de fosforilación de ERK1/2 decreciera. Tanto los resultados descriptos como los previstos han sido expuestos anteriormente en trabajos afines, solo que en condiciones de tratamiento crónico con C21. Considerando que en el caso de este trabajo el estímulo con C21 se realizó de manera aguda y durante un corto periodo de tiempo, los resultados que aquí se presentan expanden las nociones sobre el agonismo del receptor AT₂ y su acción moduladora bajo nuevos parámetros de estudio.

En lo que respecta al tejido cardiaco, los resultados obtenidos requieren un análisis particular. Para empezar, es importante destacar que, si bien se han realizado una gran cantidad de proyectos de investigación que involucran el estudio de la acción del C21 en el musculo cardiaco, la realidad es que estos estudios se han enfocado principalmente en la faceta “protectora” del fármaco ante afecciones cardiacas de diversa índole. Indirectamente, esto ha provocado que, en cierta forma, se relegue el estudio de las acciones del C21 a nivel metabólico en este tejido. Visto de esta manera, los resultados de este trabajo complementan un área de investigación que ha comenzado a valorarse en el último tiempo. Particularmente dentro de este proyecto, se pudo determinar que un tratamiento agudo con C21 no parece, al menos en principio, inducir cambios en los niveles de fosforilación basales de Akt y ERK1/2, ambos componentes fundamentales en la vía de señalización de la insulina. En el apartado 6.2 ya se ha hecho alusión a los factores que podrían estar influyendo en la generación de estos resultados, como una menor presencia de receptores AT₂ en el tejido en relación a la cantidad de receptores AT₁, o un escaso lapso de exposición al fármaco. Al igual que para el tejido adiposo, en este caso se podrían recomendar ensayos complementarios. No solo agregar una condición que implique la administración de insulina y C21 en conjunto, sino también la modificación de los parámetros del estudio, reemplazando el tratamiento agudo con C21 por uno crónico.

Es importante destacar un concepto que resulta de sumo interés. En reiteradas oportunidades se ha mencionado que, en condiciones normales, el receptor AT₂ se expresa en niveles bajos (Jones *et al.*, 2008; Padia y Carey, 2013; Carey, 2017), viéndose aumentada su expresión en condiciones anómalas. Pese a esto, tanto en trabajos previamente publicados como en este mismo documento, se ha demostrado que el tratamiento con C21, mediante el agonismo del receptor AT₂, presenta una acción de modulación sobre ciertos componentes de la vía de señalización de la insulina en ratones sanos. Esta afirmación evidencia que, incluso en condiciones normales, el receptor AT₂ es funcional y cuenta con la capacidad de participar en la respuesta metabólica. Si tenemos en cuenta que el C21 presenta una afinidad por el receptor AT₂ 25000 veces mayor que por el AT₁ (Wan *et al.*, 2004), estaríamos en lo correcto al asumir que cualquier acción desencadenada sobre la vía de señalización de la insulina por medio del tratamiento con C21 estará inducida específicamente por el receptor AT₂.

En definitiva, si bien a priori los resultados relacionados con el tejido cardiaco se perciben poco conclusivos, los mismos marcan el punto de partida para un estudio más minucioso de la acción del tratamiento con C21 en este tejido, su interacción con el receptor AT₂ y la influencia generada por este último sobre la señalización de la insulina. Comprender los mecanismos involucrados en el metabolismo cardiaco es de vital importancia en el proceso de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Por otro lado, los resultados observados en el tejido adiposo no solo demuestran la potencialidad del C21, sino que además confirman la relevancia que en múltiples ocasiones se le ha adjudicado al tejido adiposo blanco en la homeostasis de la glucosa. Es a partir de la tendencia apreciada en estos últimos resultados, y respaldado por trabajos previamente publicados por investigadores del IQUIFIB, que se hace posible confirmar la hipótesis planteada al principio de este documento, la cual establecía que el receptor AT₂ modula positivamente las acciones de la insulina.

7. Conclusiones

En base al análisis realizado de los resultados descriptos en el presente documento se exponen a continuación una serie de conclusiones:

- 1) En el tejido adiposo, el tratamiento agudo *in vivo* de ratones C57BL/6 con un agonista del receptor AT₂ (C21) dio lugar a:
 - a. Un incremento significativo en los niveles de fosforilación basales de Akt.
 - b. Un incremento significativo en los niveles de fosforilación basales de ERK1/2.
- 2) En el tejido cardíaco, el tratamiento agudo *in vivo* de ratones C57BL/6 con un agonista del receptor AT₂ (C21) no indujo cambios considerables en los niveles de fosforilación tanto de Akt como de ERK1/2.
- 3) El tratamiento agudo *in vivo* de ratones C57BL/6 con un agonista del receptor AT₂ (C21) demostró tener un efecto tejido-específico, apreciable a partir de la disparidad entre los resultados obtenidos en cada uno de los tejidos estudiados.
- 4) Incluso en un estado fisiológico (normal), el receptor AT₂ se encuentra funcional y tiene capacidad de acción.

Esta tesis se retroalimenta de una serie de trabajos que la precedieron y que fueron desarrollados por el plantel del Laboratorio de Endocrinología Molecular del IQUIFIB. Así mismo, los resultados que en la misma se expresan tienen como fin complementar la información que hasta el día de hoy se ha podido recopilar en lo que respecta al accionar del receptor AT₂. Cada nuevo hallazgo en materia de este receptor ratifica el potencial existente detrás de la aplicación de su agonismo como una alternativa terapéutica para el tratamiento de condiciones como el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

8. Bibliografía

8.1 Artículos científicos (Papers)

- ABDALLA S, LOTHER H, ABDEL-TAWAB AM, QUITTERER U. The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001;276:39721–39726. doi: 10.1074/jbc.M105253200
- ALESSI DR, JAMES SR, DOWNES CP, HOLMES AB, GAFFNEY PR, REESE CB, COHEN P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase, which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Curr Biol* 7:261–269.
- ALLEN, A. M., J. ZHUO, and F. A. MENDELSON. 1999. Localization of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:S23–S29.
- ARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098–1101.
- BERTRAND L, HORMAN S, BEAULOYE C, VANOVERSHELDE JL. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 2008;79:238–48.
- BOOZ, G. W., and K. M. BAKER. 1996. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 28:635–640.
- CAREY, R. M. (2013). Newly Discovered Components and Actions of the Renin Angiotensin System. *Hypertension*, 62(5), 818-822. doi:doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01111
- CAREY, R. M. (2017). Update on angiotensin AT₂ receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 26(2), 91-96. doi:10.1097/mnh.0000000000000304
- CASTOLDI, G., DI GIOIA, C. R., BOMBARDI, C., MAESTRONI, S., CARLETTI, R., STECKELINGS, U. M., . . . Stella, A. (2014). Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 307(10), F1123-1131. doi:10.1152/ajprenal.00247.2014.
- CHAI, W., W. WANG, J. LIU, E. J. BARRETT, R. M. CAREY, W. CAO, et al. 2010. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors regulate basal skeletal muscle microvascular volume and glucose use. *Hypertension* 55:523–530.

- CHAI, W., W. WANG, Z. DONG, W. CAO, and Z. LIU. 2011. Angiotensin II receptors modulate muscle microvascular and metabolic responses to insulin in vivo. *Diabetes* 60:2939–2946.
- CHO H, MU J, KIM JK, THORVALDSEN JL, CHU Q, CRENSHAW EB III, KAESTNER KH, BARTOLOMEI MS, SHULMAN GI, BIRNBAUM MJ. 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB b). *Science* 292: 1728–1731.
- DE GASPARO, M., CATT, K. J., INAGAMI, T., WRIGHT, J. W., & UNGER, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52(3), 415-472.
- DUNNER, N., QUEZADA, C., BERNDT, F. A., CANOVAS, J., & ROJAS, C. V. (2013). Angiotensin II signaling in human preadipose cells: participation of ERK1,2-dependent modulation of Akt. *PLoS One*, 8(10), e75440. doi:10.1371/journal.pone.0075440
- DURONIO V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008;415:333–44.
- EVANS JL, MADDUX BA, GOLDFINE ID. 2005. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 7: 1040–1052.
- FAVRE, G. A., V. L. ESNAULT, and E. Van OBERGHEN. 2015. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensinaldosterone system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308: E435–E449.
- FERRARIO, C. M., S. AHMAD, S. NAGATA, S. W. SIMINGTON, and J. VARAGIC, J. KON, et al. 2014. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin. Sci.* 126:461–469.
- FOLLI, F., C. R. KAHN, H. HANSEN, J. L. BOUCHIE, and E. P. FEENE. 1997. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J. Clin. Invest.* 100:2158–2169.
- FORRESTER, S. J., BOOZ, G. W., SIGMUND, C. D., COFFMAN, T. M., KAWAI, T., RIZZO, V., ... EGUCHI, S. (2018). Angiotensin II signal transduction: An update

on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98, 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038>. 2017

- GUIMOND, M.-O., & GALLO-PAYET, N. (2012). How does angiotensin AT₂ receptor activation help neuronal differentiation and improve neuronal pathological situations? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 164-164. doi:10.3389/fendo.2012.00164.
- HAEUSLER RA, MCGRAW TE, ACCILI D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 31–44, 2018. doi:10.1038/nrm.2017.89.
- HARDWICK JC, RYAN SE, POWERS EN, SOUTHERLAND EM, ARDELL JL. Angiotensin receptors alter myocardial infarction-induced remodeling of the guinea pig cardiac plexus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015;309:R179-188. doi:10.1152/ajpregu.00004.2015.
- HENRIKSEN, E. J. (2007). Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(3), R974-980. doi:10.1152/ajpregu.00147.2007
- HORIUCHI, M., HAYASHIDA, W., AKISHITA, M., TAMURA, K., DAVIET, L., LEHTONEN, J. Y., & DZAU, V. J. (1999). Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT₁ and AT₂ receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res*, 84(8), 876-882. doi:10.1161/01.res.84.8.876.
- HUBBARD SR. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008946, 2013. doi:10.1101/cshperspect.a008946.
- JONES, E. S., VINH, A., MCCARTHY, C. A., GASPARI, T. A., & WIDDOP, R. E. (2008). AT₂ receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*, 120(3), 292-316. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.08.009
- KAHN SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 3–19, 2003. doi:10.1007/s00125-002-1009-0.
- KAHN SE, HULL RL, UTZSCHNEIDER KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840–846, 2006. doi:10.1038/nature05482.

- KARNIK SS, UNAL H, KEMP JR, TIRUPULA KC, EGUCHI S, VANDERHEYDEN PM, THOMAS WG. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacol Rev* 67:754–819, 2015. doi:10.1124/pr.114.010454.
- KASCHINA, E., GRZESIAK, A., LI, J., FORYST-LUDWIG, A., TIMM, M., ROMPE, F., . . . STECKELINGS, U. M. (2008). Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*, 118(24), 2523-2532. doi:10.1161/circulationaha.108.784868
- KASUGA M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116: 1756–1760, 2006. doi:10.1172/JCI29189.
- LAUER D, SLAVIC S, SOMMERFELD M, THÖNE-REINEKE C, SHARKOVSKA Y, HALLBERG A, et al. Angiotensin type 2 receptor stimulation ameliorates left ventricular fibrosis and dysfunction via regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1/matrix metalloproteinase 9 axis and transforming growth factor β 1 in the rat heart. *Hypertension* 2014;63:e60-67. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02522.
- LEE, J. H., XIA, S., & RAGOLIA, L. (2008). Upregulation of AT2 receptor and iNOS impairs angiotensin II-induced contraction without endothelium influence in young normotensive diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(1), R144-154. doi:10.1152/ajpregu.00191.2008
- LEMARIE, C. A., and E. L. SCHIFFRIN. 2010. The angiotensin II type 2 receptor in cardio-vascular disease. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone Syst.* 11:19–31.
- LEUNG, K. K., J. LIANG, S. ZHAO, W. Y. CHAN, and P. S. LEUNG. 2014. Angiotensin II type 2 receptor regulates the development of pancreatic endocrine cells in mouse embryos. *Dev. Dyn.* 243:415–427.
- LILLIOJA S, MOTT DM, SPRAUL M, FERRARO R, FOLEY JE, RAVUSSIN E, KNOWLER WC, BENNETT PH, BOGARDUS C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl JMed* 329: 1988–1992, 1993. doi:10.1056/NEJM199312303292703.

- MAIER S, AULBACH F, SIMM A, LANGE V, LANGENFELD H, BEHRE H, et al. Stimulation of L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes by insulin. *Cardiovasc Res* 1999;44:390–7.
- MENKE A, CASAGRANDE S, GEISS L, COWIE CC. Relevance of and trends in diabetes among adults in the United States, 1988–2012. *JAMA* 314: 1021–1029, 2015. doi:10.1001/jama.2015.10029
- MIYATA, N., F. PARK, X. F. LI, and A. W. JR COWLEY. 1999. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 277:F437–F446.
- MUÑOZ, M. C., ARGENTINO, D. P., DOMINICI, F. P., TURYN, D., & TOBLLI, J. E. (2006). Irbesartan restores the in-vivo insulin signaling pathway leading to Akt activation in obese Zucker rats. *J Hypertens*, 24(8), 1607-1617. doi:10.1097/01.hjh.0000239297.63377.3f.
- MUNOZ, M. C., GIANI, J. F., DOMINICI, F. P., TURYN, D., & TOBLLI, J. E. (2009). Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats. *Journal of Hypertension*, 27, 2409–2420. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3283310e1b>.
- MUNOZ, M. C., V. BURGHI, J. G. MIQUET, I. A. CERVINO, D. T. QUIROGA, L. MAZZIOTTA, et al. 2017. Chronic blockade of the AT2 receptor with PD123319 impairs insulin signaling in C57BL/6 mice. *Peptides* 88:37–45.
- NAG, S., M. A. KHAN, P. SAMUEL, Q. ALI, and T. HUSSAIN. 2015. Chronic angiotensin AT2R activation prevents high-fat diet-induced adiposity and obesity in female mice independent of estrogen. *Metabolism* 64:814–825.
- NAMSOLLECK, P., C. RECARTI, S. FOULQUIER, U. M. STECKELINGS, and T. UNGER. 2014. AT2 receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr. Hypertens. Rep.* 16:416.
- OGIHARA, T., ASANO, T., ANDO, K., CHIBA, Y., SAKODA, H., ANAI, M., ... FUJITA, T. (2002). Angiotensin II-Induced Insulin Resistance Is Associated With Enhanced Insulin Signaling. *Hypertension*, 40(6), 872–879. doi:10.1161/01.hyp.0000040262.48405.a8

- OHSHIMA, K., MOGI, M., JING, F., IWANAMI, J., TSUKUDA, K., MIN, L. J., . . . HORIUCHI, M. (2012). Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mice with PPAR γ activation. *PLoS One*, 7(11), e48387. doi:10.1371/journal.pone.0048387
- OISHI Y, OZONO R, YANO Y, TERANISHI Y, AKISHITA M, HORIUCHI M, et al. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension* 2003;41:814–8. doi:10.1161/01.HYP.0000048340.53100.43.
- O’NEILL BT, ABEL ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest* 2005;115:2059–64
- OSBORN O, OLEFSKY JM. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 18: 363–374.
- OZONO, R., Z. Q. WANG, A. F. MOORE, T. INAGAMI, H. M.SIRAGY, and R. M. CAREY. 1997. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30:1238–1246.
- PADIA, S. H., & CAREY, R. M. (2013). AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch*, 465(1), 99-110. doi:10.1007/s00424-012-1146-3
- PAULIS, L., FOULQUIER, S., NAMSOLLECK, P., RECARTI, C., STECKELINGS, U. M., & UNGER, T. (2016). Combined Angiotensin Receptor Modulation in the Management of Cardio-Metabolic Disorders. *Drugs*, 76(1), 1-12. doi:10.1007/s40265-015-0509-4
- PERKINS, J. M., & DAVIS, S. N. (2008). The renin–angiotensin–aldosterone system: a pivotal role in insulin sensitivity and glycemic control. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 15(2), 147–152. doi:10.1097/med.0b013e3282f7026f
- QI Y, LI H, SHENOY V, LI Q, WONG F, ZHANG L, et al. Moderate cardiac-selective overexpression of angiotensin II type 2 receptor protects cardiac functions from ischaemic injury. *Exp Physiol* 2012;97:89–101. doi:10.1113/expphysiol.2011.060673.
- QUIROGA DT, MUÑOZ MC, GIL C, PFFEIFER M, TOBLLI JE, STECKELINGS UM, GIANI JF. DOMINICI FP. (2018). Chronic administration of the angiotensin type

2 receptor agonist C21 improves insulin sensitivity in C57BL/6 mice. *Physiol Rep* 6(16) e13824

- RAO, R. H. (1994). Effects of Angiotensin II on Insulin Sensitivity and Fasting Glucose Metabolism in Rats. *American Journal of Hypertension*, 7(7_Pt_1), 655–660. doi:10.1093/ajh/7.7.655
- RICHEY, J. M., ADER, M., MOORE, D., & BERGMAN, R. N. (1999). Angiotensin II induces insulin resistance independent of changes in interstitial insulin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 277(5), E920–E926. doi:10.1152/ajpendo.1999.277.5.e920.
- RODRIGUEZ, R., MINAS, J. N., VAZQUEZ-MEDINA, J. P., NAKANO, D., PARKES, D. G., NISHIYAMA, A., ... Ortiz, R. M. (2018). Chronic AT1 blockade improves glucose homeostasis in obese OLETF rats. *The Journal of Endocrinology*, 237, 271–284. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0678>.
- ROSKOSKI, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66(2), 105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- SANTOS, R. A. S., OUDIT, G. Y., VERANO-BRAGA, T., CANTA, G., STECKELINGS, U. M., & BADER, M. (2019). The renin–angiotensin system: Going beyond the classical paradigms. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 316, H958–H970. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2018>.
- SARZANI R, SALVI F, DESSI-FULGHERI P, RAPPELLI A: Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J Hypertens* 26: 831-843, 2008.
- SCHULTZE SM, JENSEN J, HEMMINGS BA, TSCHOPP O, NIESSEN M. 2011. Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem* 117: 70–77.
- SCHWARTZ SS, EPSTEIN S, CORKEY BE, GRANT SFA, GAVIN Iii JR, AGUILAR RB, HERMAN ME. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends Endocrinol Metab* 28: 645–655, 2017. doi:10.1016/j.tem.2017.05.005.

- SHAO, C., ZUCKER, I. H., & GAO, L. (2013). Angiotensin type 2 receptor in pancreatic islets of adult rats: a novel insulinotropic mediator. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305(10), E1281-1291. doi:10.1152/ajpendo.00286.2013
- SHAO, C., YU, L., & GAO, L. (2014). Activation of angiotensin type 2 receptors partially ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male rats by islet protection. *Endocrinology*, 155(3), 793-804. doi:10.1210/en.2013-1601
- SHIUCHI, T., IWAI, M., LI, H.-S., WU, L., MIN, L.-J., LI, J.-M., . . . HORIUCHI, M. (2004). Angiotensin II Type-1 Receptor Blocker Valsartan Enhances Insulin Sensitivity in Skeletal Muscles of Diabetic Mice. *Hypertension*, 43(5), 1003-1010. doi:doi:10.1161/01.HYP.0000125142.41703.64
- SHUM, M., PINARD, S., GUIMOND, M.-O., LABBÉ, S. M., ROBERGE, C., BAILLARGEON, J.-P., . . . GALLO-PAYET, N. (2013). Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304(2), E197-E210. doi:10.1152/ajpendo.00149.2012
- SOWERS, J. R. (2004). Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(5), H1597-1602. doi:10.1152/ajpheart.00026.2004
- TANIGUCHI CM, EMANUELLI B, KAHN CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85–96, 2006. doi:10.1038/nrm1837.
- TERUEL T, HERNANDEZ R, LORENZO M. 2001. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50: 2563–2571.
- TESHIMA Y, TAKAHASHI N, SAIKAWA T, HARA M, YASUNAGA S, HIDAKA S, et al. Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine sensitive Ca²⁺ channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:655–64.
- THAN, A., XU, S., LI, R., LEOW, M.-S., SUN, L., & CHEN, P. (2017). Angiotensin type 2 receptor activation promotes browning of white adipose tissue and brown

adipogenesis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 17022.
doi:10.1038/sigtrans.2017.22

- VON LEWINSKI D, BRUNS S, WALTHER S, KÖGLER H, PIESKE B. Insulin causes [Ca²⁺]_i-dependent and [Ca²⁺]_i-independent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circulation* 2005;111:2588–95
- WALSH K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* 2006;113:2032–4.
- WAN, Y., WALLINDER, C., PLOUFFE, B., BEAUDRY, H., MAHALINGAM, A. K., WU, X., . . . ALTERMAN, M. (2004). Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem*, 47(24), 5995-6008. doi:10.1021/jm049715t
- WANG, Z. Q., A. F. MOORE, R. OZONO, H. M. SIRAGY, and R. M. CAREY. 1998. Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT₂) receptor protein in rat heart. *Hypertension* 32:78–83.
- WANG, L., WANG, Y., LI, X. Y., & LEUNG, P. S. (2017). Angiotensin II Type 2 Receptor Activation With Compound 21 Augments Islet Function and Regeneration in Streptozotocin-Induced Neonatal Rats and Human Pancreatic Progenitor Cells. *Pancreas*, 46(3), 395-404. doi:10.1097/mpa.0000000000000754
- WARRAM JH, MARTIN BC, KROLEWSKI AS, SOELDNER JS, KAHN CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 113: 909–915, 1990. doi:10.7326/0003-4819-113-12-909.
- WELINDER, C., & EKBLAD, L. (2011). Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1416–1419. doi:10.1021/pr1011476
- YAN, F., YUAN, Z., WANG, N., CAREY, R. M., AYLOR, K. W., CHEN, L., ... LIU, Z. (2017). Direct Activation of Angiotensin II Type 2 Receptors Enhances Muscle Microvascular Perfusion, Oxygenation, and Insulin Delivery in Male Rats. *Endocrinology*, 159(2), 685–695. doi:10.1210/en.2017-00585
- ZIMMET P, ALBERTI KGMM, SHAW J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782–787, 2001. doi:10.1038/414782a

- ZISMAN A, PERONI OD, ABEL ED, MICHAEL MD, MAUVAIS-JARVIS F, LOWELL BB, WOJTASZEWSKI JF, HIRSHMAN MF, VIRKAMAKI A, GOODYEAR LJ, et al. 2000. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6:924–928.

8.2 Libros

- ALBERTS, B. et al: *Molecular biology of the cell*, 6th ed, Garland Science, 2014, 1464 p., ISBN: 0815345240, 978-0815345244
- BALZARINI, M. G. et al: *Estadística y biometría*; 1ª ed. Córdoba: Editorial Brujas, 2012. 400 p. ISBN: 987-5913014, 978-9875913011
- BROWN, T.: *Genomes 3*, 3rd ed. Garland Pub, 2006. 600 p. ISBN: 0815341385, 9780815341383
- BRUICE, Paula Y.: *Organic chemistry*, 5th ed. Pearson Education, Inc., 2007. 1448 p. ISBN: 0131963163, 978-9702607915
- COOPER, G.: *The cell: a molecular approach*, 8th ed. Sinauer Associates, Inc., 2018. 816 p. ISBN: 1605357073, 978-1605357072
- CURTIS, H. et al: *Biología*; 8ª ed. Buenos Aires: Panamericana, 2021. 1372 p. ISBN: 9789500696678
- DEVORE, Jay L.: *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*; 4ª ed. México, D.F.: International Thomson, 1998. 712 p. ISBN: 9687529482
- DI RIENZO, J. A. et al: *Estadística para las ciencias agropecuarias*; 7ª ed. Córdoba: Editorial Brujas, 2008. 372 p. ISBN: 978-9875911123
- KELLY REECE, Jane B. et al: *Campbell biology*, 11th ed, Pearson, 2016, 1488 p., ISBN: 0134093410, 978-0134093413
- KINDT, Thomas J. et al: *Kuby immunology*, 6th ed. W. H. Freeman & Company, 2006. 574 p. ISBN: 1429202114, 978-1429202114
- LEWIN, B.: *Genes VII*, 1st ed. Oxford University Press, 1999. 990 p. ISBN: 019879276X, 978-0198792765

- LODISH, H. et al: Molecular cell biology, 9th ed, W. H. Freeman, 2021, 1264 p., ISBN: 1319208525, 978-1319208523
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES: Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed, National Academies Press, 2011, 246 p., ISBN: 0309154006, 978-0309154000
- NELSON, David L.; COX, Michael M.: Lehninger principles of biochemistry, 5th ed. W.H. Freeman, 2008. 1100 p. ISBN: 9780716771081, 978-0716771081.
- WALPOLE, Ronald E. y MYERS, Raymond H. y MYERS, Sharon L: Probabilidad y estadística para ingenieros; 6a ed. México, D.F.: Pearson Educación, 1999. 739 p. ISBN: 9701702646

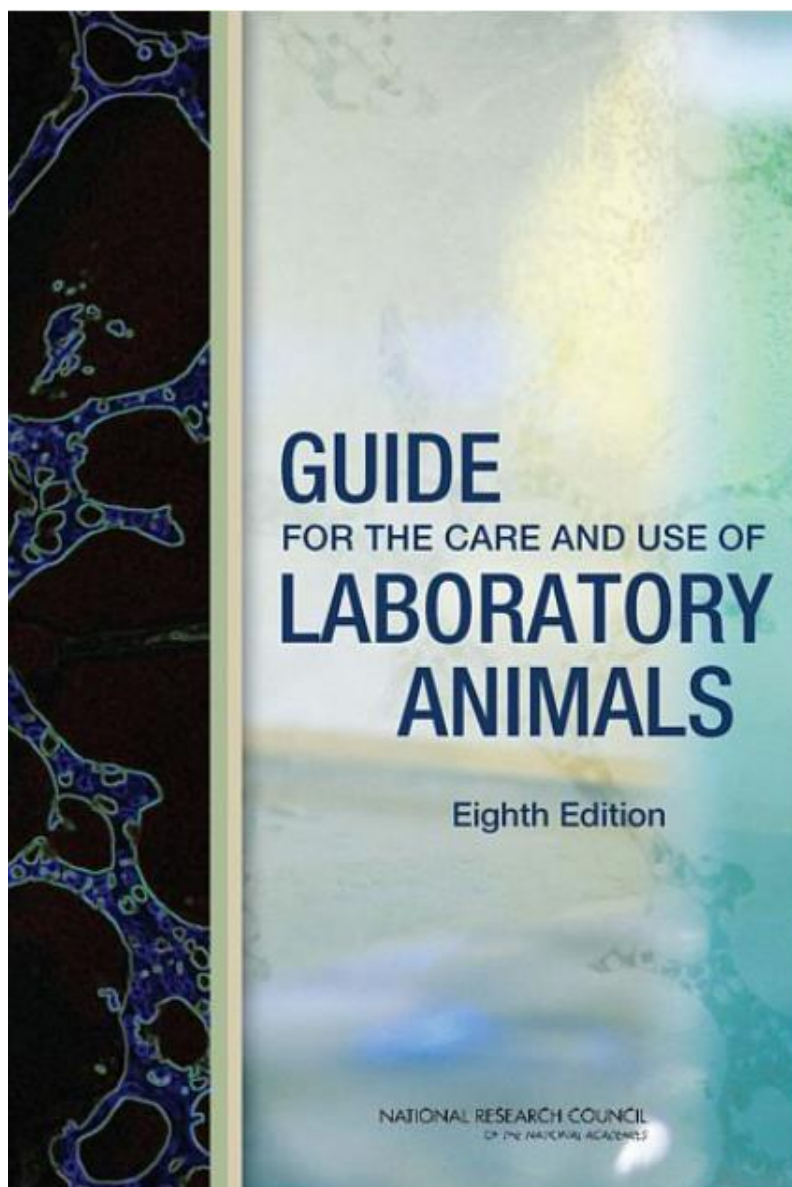
8.3 Sitios web

- BIORENDER [en línea] © 2022
<<https://biorender.com/>>
- FEDERACIÓN ARGENTINA DE DIABETES [en línea] © 2017
<<https://www.fad.org.ar/>>
- GRAPHPAD BY DOTMATICS [en línea] © 2022
<<https://www.graphpad.com/>>
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION [en línea] © 2022
<<https://www.idf.org/>>
 - IDF DIABETES ATLAS [en línea] © 2022
<<https://diabetesatlas.org/>>
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION [en línea]
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>
 - PUBMED® [en línea]
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>
- NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES [en línea]
<<https://www.niddk.nih.gov/>>

- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH [en línea]
<<https://www.nih.gov/>>
- RESEARCHGATE [en línea] © 2008-2022
< <https://www.researchgate.net/>>
- SCIENCEDIRECT BY ELSEVIER [en línea] © 2022
<<https://www.sciencedirect.com/>>
- SCIMAGO JOURNAL & COUNTRY RANK [en línea] © 2007-2022
<<https://www.scimagojr.com/journalrank.php>>
- SOCIEDAD ARGENTINA DE DIABETES [en línea]
<<http://diabetes.org.ar/2020/>>
- THERMOFISHER SCIENTIFIC [en línea]
<<https://www.thermofisher.com/ar/es/home.html>>

9. Anexos

9.1 Anexo A: Guide for the care and use of laboratory animals



Por razones de optimización del espacio de este documento, a continuación, se provee un enlace a partir del cual es posible acceder a una versión digital del manual, mismo que fue empleado para asegurar una correcta manipulación de los animales requeridos para este trabajo.

https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals_prepub.pdf

9.2 Anexo B: Pierce™ BCA Protein Assay Kit – User Guide

thermo scientific

USER GUIDE

Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Catalog Numbers 23225 and 23227

Doc. Part No. 2161296 Pub. No. MAN0011430 Rev. B.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit is a detergent-compatible formulation based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu²⁺ to Cu⁺ by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu⁺) using a unique reagent containing bicinchoninic acid (see reference 1 on page 4). The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562 nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20–2000 µg/mL). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA (see reference 2 on page 4). Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups (see reference 2 on page 4). Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknowns before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is required, it is advisable to select a protein standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see "Related products" on page 3) may be used when assaying immunoglobulin samples.

Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1 mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10–25 µL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is 1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

Note: For peptide sample concentration measurements, use the Thermo Scientific™ Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay or the Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit (see Related Thermo Scientific™ Products).

Preparation of standards and working reagent (required for both assay procedures)

Preparation of diluted albumin (BSA) standards

Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the samples.

Use the following table as a guide to prepare a set of protein standards. Each 1 mL ampule of 2 mg/mL Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in the table. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

Table 1 Preparation of diluted albumin (BSA) standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20–2,000 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank
Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5–250 µg/mL)			
Vial	Volume of Diluent (µL)	Volume and Source of BSA (µL)	Final BSA Concentration (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

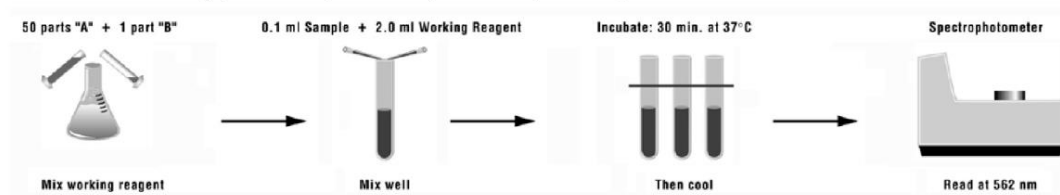
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Preparation of the BCA working reagent (WR)

- Use the following formula to determine the total volume of WR required:
 $(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$
 Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:
 $(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2 \text{ mL}) = 48 \text{ mL WR required}$
Note: 2.0 mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200 μL of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.
- Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50 mL of Reagent A with 1 mL of Reagent B.
Note: When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

Procedure summary (test-tube procedure, standard protocol)



Test-tube procedure (sample to WR ratio = 1:20)

- Pipette 0.1 mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
- Add 2.0 mL of the WR to each tube and mix well.
- Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
 - Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
 - RT Protocol: RT for 2 hours (working range = 20–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
 - Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5–250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**Note:**
 - Increasing the incubation time or temperature increases the net 562 nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
 - Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.
- Cool all tubes to RT.
- With the spectrophotometer set to 562 nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water, then measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.
Note: Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562 nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.
- Subtract the average 562 nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562 nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.
- Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Microplate procedure (sample to WR ratio = 1:8)

- Pipette 25 μL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (For example, Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).
Note: If sample size is limited, 10 μL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case is limited to 125–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Add 200 μL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
- Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.
- Cool plate to RT. Measure the absorbance at or near 562 nm on a plate reader.
Note:
 - Wavelengths from 540–590 nm have been used successfully with this method.
 - Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562 nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.
 - Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562 nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.

5. Subtract the average 562 nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562 nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562 nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Note: If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve provides more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

Related products

Cat. NO.	Product
15041	Pierce™ 96-Well Plates, 100/pkg.
15075	Reagent Reservoirs, 200/pkg.
15036	Sealing Tape for 96-Well Plates, 100/pkg.
23209	Albumin Standard Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA)
23208	Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set, 7 × 3.5mL
23212	Bovine Gamma Globulin Standard, 2mg/mL, 10 × 1mL ampules
23213	Pre-Diluted Protein Assay Standards, (BGG) Set, 7 × 3.5mL aliquots
23246	Pierce™ Detergent Compatible (Bradford)™ Assay Kit
23235	Pierce™ Micro BCA™ Protein Assay Kit
23290	Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay
23275	Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay
23236	Coomassie Plus™ (Bradford)™ Assay Kit
23215	Compat-Able™ Protein Assay Preparation Reagent Set
23250	Pierce™ BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible

Additional information

A. Please visit our website for additional information including the following items:

- Tech Tip: Eliminate interfering substances from samples for BCA Protein Assay

B. Alternative Total Protein Assay Reagents

If interference by a reducing substance or metal-chelating substance contained in the sample cannot be overcome, try the Thermo Scientific™ Coomassie Plus™ (Bradford)™ Assay Kit (Product No. 23236), which is less sensitive to such substances.

C. Cleaning and Re-using Glassware

Exercise care when re-using glassware. All glassware must be cleaned and given a thorough final rinse with ultrapure water.

D. Response characteristics for different proteins

Each of the commonly used total protein assay methods exhibits some degree of varying response toward different proteins. These differences relate to amino acid sequence, pI, structure and the presence of certain side chains or prosthetic groups that can dramatically alter the protein's color response. Most protein assay methods use BSA or immunoglobulin (IgG) as the standard against which the concentration of protein in the sample is determined (Figure 1). However, if great accuracy is required, prepare the standard curve from a pure sample of the target protein.

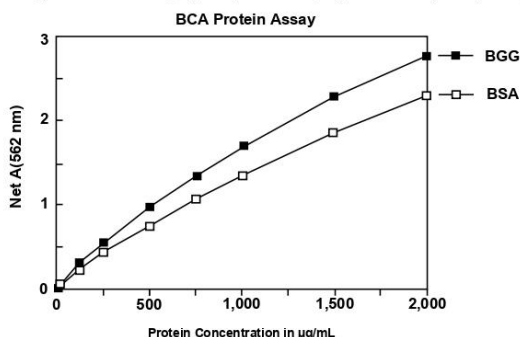


Fig. 1 Typical color response curves for BSA and BGG using the standard test tube protocol (37°C/30-minute incubation).

Typical protein-to-protein variation in color response is listed in Table 2. All proteins were tested at 1000 µg/mL using the 30-minute/37°C Test Tube Protocol. The average net color response for BSA was normalized to 1.00 and the average net color response of the other proteins is expressed as a ratio to the response of BSA.

Table 2 Protein-to-protein variation. Absorbance ratios (562 nm) for proteins relative to BSA using the standard test tube protocol.

Protein Tested	Ratio = (Avg "test" net Abs.) / (avg. BSA net Abs.)	Ratio
Albumin, bovine serum		1.00
Aldolase, rabbit muscle		0.85
α-Chymotrypsinogen, bovine		1.14
Cytochrome C, horse heart		0.83
Gamma globulin, bovine		1.11
IgG, bovine		1.21
IgG, human		1.09
IgG, mouse		1.18
IgG, rabbit		1.12
IgG, sheep		1.17
Insulin, bovine pancreas		1.08
Myoglobin, horse heart		0.74
Ovalbumin		0.93
Transferrin, human		0.89
Average Ratio		1.02
Standard Deviation		0.15
Coefficient of Variation		14.7%

Cited references

1. Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
2. Wiechelman, K., et al. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**:231-7.
3. Kessler, R. and Fanestil, D. (1986). Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **159**:138-42.
4. Brown, R., et al. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* **180**:136-9.

Product references

- Adilakshami, T. and Laine, R.O. (2002). Ribosomal protein S25 mRNA partners with MIF-1 and La to provide a p53-mediated mechanism for survival or death. *J Biol Chem* **277**:4147-51.
- Fischer, T., et al. (1999). Clathrin-coated vesicles bearing GAIP possess GTPase-activating protein activity in vitro. *Proc Nat Acad Sci* **96**:6722-7.
- Prozialeck, W.C., et al. (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequester β-catenin in human cervical epithelial cells. *Infection and Immunity* **70**:2605-13.
- Roberts, K.P., et al. (2002). A comparative analysis of expression and processing of the rat epididymal fluid and sperm-bound forms of proteins D and E. *Biology of Reproduction* **67**:525-33.

Troubleshooting and FAQs

Visit our online FAQ database for tips and tricks for conducting your experiment, troubleshooting information, and FAQs. The online FAQ database is frequently updated to ensure accurate and thorough content.

- For troubleshooting information and FAQs for this product: <https://www.thermofisher.com/bcafaqs>
- To browse the database and search using keywords: [thermofisher.com/faqs](https://www.thermofisher.com/faqs)

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion



Thermo Fisher Scientific | 3747 N. Meridian Road | Rockford, Illinois 61101 USA
For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Revision history: Pub. No. MAN0011430

Revision	Date	Description
B.0	30 January 2020	Moved troubleshooting content to thermofisher.com .
A.0	17 October 2015	Baseline for revision.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

30 January 2020

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Versión digitalizada en https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados.

9.3 Anexo C: Pierce™ ECL Western Blotting Substrate – User Guide

Pierce™ ECL Western Blotting Substrate
Thermo SCIENTIFIC

USER GUIDE
Pub. No. MAN0011536 Rev. B.0

Contents and storage

Component	Cat. No. 32109 (for 400 cm ²)	Cat. No. 32209 (for 2,500 cm ²)	Cat. No. 32106 (for 5,000 cm ²)
Detection Reagent 1, Peroxide Solution	25 mL	125 mL	250 mL
Detection Reagent 2, Luminol Enhancer Solution	25 mL	125 mL	250 mL

Storage: Store at 2–8°C.

Product description

Thermo Scientific™ Pierce™ ECL Western Blotting Substrate is an enhanced luminol-based chemiluminescent substrate for the detection of horseradish peroxidase (HRP) on immunoblots. Pierce™ ECL Western Blotting Substrate enables the detection of picogram amounts of antigen. This reaction produces a prolonged chemiluminescence which can be visualized on X-ray film or an imaging system. Optimal signal intensity and duration can be attained with appropriate primary and secondary antibody dilutions (see Table 1).

Required materials

- Western blot membrane
- X-ray film or CCD imaging system (e.g., Invitrogen™ iBright™ western blot imaging systems)
- Rotary or rocking platform shaker

Online resources

- Visit thermofisher.com/chemisubstrates for additional information and protocols.
- For support, visit thermofisher.com/support.

Table 1. Recommended antibody concentration

Primary antibody dilution (from a 1 mg/mL stock)	Secondary antibody dilution (from a 1 mg/mL stock)
1:100–1:5,000 or 0.2–10 µg/mL	1:1,000–1:15,000 or 0.07–1.0 µg/mL

Important guidelines

- Optimize your western blot procedure for best results. Variables include sample amount, gel type, transfer method, membrane type, blocking reagent, wash buffer, primary and secondary antibody concentrations, and incubation times.
- Use a sufficient volume of all solutions to ensure that membranes do not dry out.
- Use a shaking or rocking platform during incubation steps for optimal results.
- Do not use sodium azide in buffers, because it inhibits HRP.
- Always wear gloves or use clean, plastic forceps. Metallic devices (e.g., scissors) must have no visible signs of rust, which may cause speckling and/or high background.
- The substrate Working Solution is stable for 1 hour at room temperature. Avoid exposure to the sun or other intense light. Short-term exposure to lab lighting is okay.

Important licensing information

This product may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of this product, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Disclaimer: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.










Manufacturer: Life Technologies | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1.800.955.6288

©2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Perform western detection using Pierce™ ECL Western Blotting Substrate

Step		Action
1		Wash membrane After protein transfer, remove the blot from the transfer apparatus and wash the membrane in deionized water for 5 minutes using agitation to remove all transfer buffer.
2		Block membrane Block nonspecific sites with Blocking Reagent (e.g., StartingBlock™ (PBS) Blocking Buffer, Cat. No. 37538) for 30–60 minutes at room temperature with shaking. Alternatively, block overnight at 2–8°C without shaking.
3		Add primary antibody Incubate the membrane with primary antibody solution (0.2–10 µg/mL or follow manufacturer's recommended dilution) containing 10% blocking solution with continuous rocking for 1 hour. If desired, incubate the blot overnight at 2–8°C.
4		Wash membrane a. Wash the membrane for 10 minutes using agitation with Tris-buffered saline (TBS), phosphate-buffered saline (PBS), or other physiological wash buffer containing 0.05% Tween 20 detergent. b. Repeat wash step 2 more times. c. Proceed to next step, or if using an enzyme-conjugated HRP primary antibody, proceed to Step 6.
5		Add secondary antibody Incubate blot with the secondary antibody HRP-conjugate working dilution (0.07–1.0 µg/mL or 1:1,000–1:15,000, from a 1 mg/mL stock solution) for 30 minutes to 1 hour at room temperature using shaking.
6		Wash membrane Wash the membrane 6 times for 5 minutes each in wash buffer to remove any unbound secondary antibody conjugate. It is crucial to thoroughly wash the membrane after incubation with the HRP enzyme conjugate.
7		Prepare substrate Prepare the substrate working solution by mixing equal parts of Detection Reagent 1 and Detection Reagent 2 (e.g., for a mini blot mix 5 mL Detection Reagent 1 with 5 mL Detection Reagent 2). Use a sufficient volume to ensure that the blot is completely wetted with the substrate and the blot does not become dry (0.1 mL/cm ²). Note: The working solution is stable for up to 1 hour at room temperature.
8		Develop substrate Incubate the membrane with the substrate working solution for 1 minute.
9		Image membrane a. Remove blot from working solution and place it in a plastic sheet protector or clear plastic wrap. b. Use an absorbent tissue to remove excess liquid and carefully press out any bubbles from between the blot and the membrane protector. c. Image the blot using an imaging system or X-ray film.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Troubleshooting

Observation	Cause	Solution
Reverse image on film (i.e., white bands with a black background)	Too much HRP in the system.	Further dilute the HRP-conjugate (see guidelines in Table 1).
Membrane has brown or yellow bands		
Blot glows in the darkroom		
Signal duration is less than 8 hours		
Weak or no signal	Too much HRP in the system depleted the substrate and caused the signal to fade quickly.	Further dilute the HRP-conjugate (see guidelines in Table 1).
	Insufficient quantities of antigen or antibody.	Increase amount of antibody or antigen.
		Use SuperSignal™ Western Blot Enhancer [Cat. No. 46640].
	Inefficient protein transfer.	Optimize transfer conditions.
Reduction of HRP or substrate activity.	Test the activity of the system. ^[1]	
High background	Too much HRP in the system.	Further dilute the HRP-conjugate (see guidelines in Table 1).
	Inadequate blocking.	Optimize blocking conditions.
	Inappropriate blocking reagent.	Try a different blocking reagent.
	Inadequate washing.	Increase length, number or volume of washes.
	Film has been overexposed.	Decrease exposure time or use Pierce Background Eliminator [Cat No. 21065].
	Concentration of antigen or antibody is too high.	Decrease amount of antigen or antibody.
	Poor antibody specificity.	Use SuperSignal™ Western Blot Enhancer [Cat. No. 46640].
Spots within the protein bands	Inefficient protein transfer.	Optimize transfer conditions.
	Unevenly hydrated membrane.	Perform manufacturer's recommendations for hydrating membrane properly.
	Bubble between the film and the membrane.	Remove bubbles before exposing blot to film.

[1] To test the activity of the system in the darkroom, prepare 1-2 mL of the SuperSignal™ Substrate Working Solution in a clear test tube. With the lights turned off, add 1 µL undiluted HRP-conjugate to the Working Solution. The solution should immediately emit a blue light that will fade over the next several minutes. If no light emission is evident, test another source of HRP to determine the root cause.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

-3-

Troubleshooting

Observation	Cause	Solution
Speckled background on film	Aggregate formation in the HRP-conjugate.	Filter conjugate through a 0.2 µm filter.
Nonspecific bands	Too much HRP in the system.	Further dilute the HRP-conjugate (see guidelines in Table 1).
	SDS caused nonspecific binding to protein bands.	Do not use SDS during the Western blot procedure.
	Poor antibody specificity.	Use SuperSignal™ Western Blot Enhancer [Cat. No. 46640].
	Insufficient blocking.	Increase blocking time or use different blocking reagent.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

-4-

Choosing the right substrate for your application

Thermo Scientific™ Substrate	Choose when...	Sensitivity	Signal Duration (hours)	Recommended Antibody Dilutions (From 1 mg/mL stock)
Pierce™ ECL	Detecting protein targets that are in high abundance and the sample is abundant.	Low picogram	1 to 2	1°: 1:1,000 2°: 1:1,000-1:15,000
SuperSignal™ West Pico PLUS	Performing routine western blot or setting up new procedures that need to be optimized.	Low picogram to high femtogram	Up to 24	1°: 1:1,000 2°: 1:20,000-1:100,000
SuperSignal™ West Dura	Performing quantitative western blots or if extended signal duration is necessary.	Mid-femtogram	24	1°: 1:5,000 2°: 1:50,000-1:250,000
SuperSignal™ West Atto	Detecting very low abundance protein targets, or if antibodies or sample volume is limited.	Low femtogram to high attogram	6	1°: 1:1,00-1:5,000 2°: 1:100,000-1:250,000

Related products

Product	URL
Western blot transfer devices and membranes	thermofisher.com/transfer
Blocking buffers, wash buffers and stripping buffers	thermofisher.com/westernbuffers
Enhanced chemiluminescence (ECL) kits	thermofisher.com/chemisubstrates
Western blot antibodies	thermofisher.com/antibodies
Western blot imaging and analysis	thermofisher.com/westernimaging

For support, visit thermofisher.com/support.
27 August 2021

-5-



Versión digitalizada en [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011536_Pierce ECL West Blot Subs UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011536_Pierce_ECL_West_Blot_Subst_UG.pdf) © 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados.