



Mecanismo de acción de la insulina. (Revisión)

Freddy González-Mujica ¹.

¹Médico. Cirujano. PhD. en Bioquímica Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela
freddygonzalezmujica@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 19 de Junio del 2017 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

La insulina es una hormona polipeptídica, anabolizante que ejerce un efecto pleotrópico, el cual es mediado por un receptor (IR) de membrana con actividad de tirosina quinasa. IR es un tetrámero, $\alpha_2\beta_2$, el cual presenta una estructura modular; un dominio extracelular formado por la totalidad de las subunidades α , las cuales están glicosiladas, y una pequeña proporción de la subunidades β , esta última se continua con un segmento incluido en la membrana plasmática seguido luego por el dominio citoplasmático. En el dominio extracelular se encuentran los sitios de unión a la insulina y en el dominio citoplasmático radica la actividad de tirosina quinasa. Cuando IR se une al ligando se promueve la autofosforilación del receptor y la fosforilación de substratos específicos de IR (IRS por sus siglas en inglés) iniciándose redes de señalización. Se postula la existencia de tres “nódulos” críticos en la señalización intracelular de la insulina a saber: IR e IRS, la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K por sus siglas en inglés) y la proteína quinasa B (AKT/PKB por sus siglas en inglés). Luego de la autofosforilación de IR y la fosforilación de IRS se generan tres diferentes vías de señalización: La de Raf/Ras/MEK/ MAPK, la de PI3K y la alterna que involucra CAP-APS-Cbl-TC10-aPKC; las dos últimas vías están relacionadas con la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4 por sus siglas en inglés) del citosol a la membrana plasmática con el consecuente incremento de la captación de glucosa por músculo y tejido adiposo. La primera vía está relacionada con la

regulación de la expresión genética. También se discute algunos aspectos de la finalización de la señal de la insulina tales como la defosforilación de IR e IRS por tirosina fosfatasas y su fosforilación en serinas/treoninas, defosforilación de otras quinasas fosforiladas en serina/treonina, la hidrólisis del fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3 por sus siglas en inglés) y por último la internalización y degradación de IR e insulina.

PALABRAS CLAVE: insulina, receptor de la insulina, substratos del receptor de insulina, fosfatidilinositol 3 quinasa, GLUT4

MECHANISM OF ACTION OF INSULIN (REVIEW)

SUMMARY

Insulin is a polypeptidic, anabolic hormone that exerts a pleotropic effect, which is mediated by a membrane receptor (IR) with tyrosine kinase activity. IR is a tetramer, $\alpha_2\beta_2$, which has a modular structure; an extracellular domain consists of all α subunits, which are glycosylated and a small proportion of β subunits, the latter being continued with a segment included in the plasma membrane followed by the cytoplasmic domain. In the extracellular domain are the sites of insulin binding and in the cytoplasmic domain lies the activity of tyrosine kinase. When IR binds to the ligand, the receptor is auto phosphorylated and it phosphorylates the IR-specific substrates (IRS) initiating signaling networks. The existences of three critical "nodules" in the intracellular signaling of insulin are postulated, namely: IR and IRS, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT / PKB). After auto phosphorylation of IR and phosphorylation of IRS, three different signaling pathways are generated: The Raf / Ras / MEK / MAPK, the PI3K and the alternative, involving CAP-APS-Cbl-TC10-aPKC, the last two pathways are related to the translocation of the glucose transporter 4 (GLUT4) from the cytosol to the plasma membrane with the consequent increase of glucose uptake by muscle and adipose tissue. The first pathway is related to the regulation of genetic expression. We also discuss some aspects of the end of the insulin signal such as the dephosphorylation of IR and IRS by tyrosine phosphatases and their serine/threonine phosphorylation, dephosphorylation of other serine/threonine phosphorylated kinases, hydrolysis of phosphatidylinositol 3 phosphate (PIP3) and finally the internalization and degradation of IR and insulin.

KEY WORDS: insulin, insulin receptor, insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3 kinase, GLUT4.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INSULINA. (REVISIÓN)

INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica anabólica producida por las células β de los islotes pancreáticos, la cual juega un papel primordial en la regulación del metabolismo. Aun cuando ha sido visualizada como una hormona relacionada con la homeostasis del metabolismo de la glucosa, en la actualidad se sabe que ejerce un amplio efecto pleotrópico. Un sistema de señalización similar al de la insulina existe en todos los metazoarios y regula

mecanismos tales como la reproducción y las expectativas de vida ⁽¹⁾.

El concepto de que la insulina actúa promoviendo el paso de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células blanco (en lugar de actuar sobre enzimas específicas del metabolismo intermediario) fue establecido por Levine y colaboradores⁽²⁾ quienes demostraron que la insulina incrementa considerablemente la distribución de la galactosa en los perros eviscerados y nefrectomizados desde un 46 % a un 75 % del peso corporal, valor el cual es muy cercano al contenido de agua del organismo. A partir de esos resultados, postularon la siguiente hipótesis de trabajo: “La Insulina actúa sobre la membrana celular de algunos tejidos (músculo esquelético, entre otros) de tal manera que se facilita la transferencia de las hexosas (quizás de otras sustancias también) desde el líquido extracelular al interior de la célula. El destino intracelular de la hexosa depende de la disponibilidad de la célula de vías metabólicas para su transformación. En el caso de la glucosa, la deposición de glucógeno y su transformación en grasas depende de la velocidad de su entrada a las células”.

Un avance importante fue el concepto de que la insulina actúa sobre un receptor de membrana, el cual fue primero caracterizado por métodos isotópicos y después bioquímicamente, estableciéndose su estructura subunitario y su naturaleza glicoproteica. Estos primeros estudios han sido revisados por De Meyts⁽³⁾.

Luego de la demostración ⁽⁴⁾ de que asociado al receptor de la insulina existe una actividad de tirosina quinasa (transferencia del fosfato γ del ATP a una tirosina en un sustrato proteico) varios grupos demostraron que el receptor de la insulina tiene actividad de tirosina quinasa y de que entre sus sustratos se encuentra el receptor en sí mismo. Posteriormente el receptor fue clonado ^(5,6).

Una vez que la insulina se une al receptor, activando su autofosforilación, éste recluta una serie de proteínas con lo cual se propaga corriente abajo la señal. Entre las proteínas reclutadas se encuentran: las proteínas sustratos del receptor de insulina (proteínas IRS, por sus siglas en inglés), proteínas Shc (proteína codificada por el gen *SHC* y tiene relación con la apoptosis y la resistencia a drogas de las células de mamíferos. Su sobre expresión está asociada a carcinogénesis y metástasis) y las proteínas SH2B1 y 2 (proteínas adaptadora para varios miembros de la familia de receptores de tirosina quinasa); las dos primeras (proteínas IRS y Shc) contienen dominios que unen fosfotirosina (PTB por sus siglas en inglés) y las dos últimas (SH2B1 y 2) poseen dominios de homología Src (dominios de unión presentes en la oncoproteína Src). La activación de estas proteínas condiciona la respuesta metabólica y/o genética de la célula. En las siguientes secciones discutiremos las características del receptor de insulina (IR por sus siglas en inglés), la secuencia de señalización que condiciona la respuestas tanto metabólica como genética. Dado su importancia, destacaremos los aspectos relacionados con la translocación a la membrana plasmática del transportador de glucosa GLUT 4 a partir de vesículas intracelulares. Por último discutiremos la finalización de la acción de la insulina.

RECEPTOR DE INSULINA

El genoma humano codifica 55 receptores con actividad de tirosina quinasa los cuales se agrupan en 19 subfamilias dependiendo de su estructura y características funcionales, en general están constituidos por un monómero el cual se dimeriza al unirse al ligando. La subfamilia del receptor de la insulina comprende: el receptor de la insulina (IR por sus siglas en inglés), el cual une insulina; el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, el cual une los factores de crecimiento similares a la insulina I y II y el receptor huérfano relacionado con el receptor de la insulina, el cual no posee ligando conocido. Los miembros de esta subfamilia existen como dímeros aun en ausencia de ligando ⁽⁷⁾.

El IR tiene una estructura modular y es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 19p13.2, el mismo posee 22 exones (secuencias del ADN o preARNm que codifican secuencia de aminoácidos en la proteína) y 21 intrones (secuencias del ADN o preARNm no codificantes). El exón 11, que codifica un segmento de 12 aminoácidos, puede ser alternativamente eliminado (splicing: eliminación de intrones y unión de exones) generando 2 isoformas del IR, a saber la isoforma A donde no se expresa el exón 11 y la isoforma B en la cual se expresa el exón 11, las cuales difieren discretamente en su afinidad por la insulina y su expresión en los tejidos, la isoforma A se encuentra en los tejidos fetales y la B en el hígado. Los IR son sintetizados como un proreceptor el cual es procesado por una enzima proteolítica del tipo de las furinas para formar las subunidades α y β , la subunidad α es abundantemente glicosilada, se forman los enlaces disulfuro y adquieren la estructura tridimensional⁽⁸⁾. El receptor de insulina es un heterotetramero constituido por 2 subunidades α y 2 β ($\alpha_2\beta_2$). Las dos subunidades α son extracelulares y las dos subunidades β comienzan en la región extracelular, luego atraviesan la membrana plasmática y terminan en la región intracelular. Las 2 subunidades α están, altamente glicosiladas, unidas por 2 enlaces disulfuro (probablemente 4) y cada subunidad α se une a una subunidad β por un enlace disulfuro. Uno de los sitios de unión de la insulina está ubicado en las subunidades α y el otro en la interacción de las subunidades $\alpha\beta$; la porción citoplasmática de la subunidad β contiene el dominio de tirosina quinasa ⁽⁹⁾.

Las subunidades α están constituidas desde su extremo amino terminal por: un dominio rico en el aminoácido leucina (L1), seguido por un dominio rico en cisteína (C), luego un segundo dominio rico en leucina (L2), a continuación un dominio completo de fibronectina tipo III (F1), seguido de un dominio incompleto de fibronectina tipo III (F2) para terminar en un largo segmento carboxilo terminal (dominio inserto, ID por sus siglas en inglés) (Figura 1)⁽¹⁰⁾.

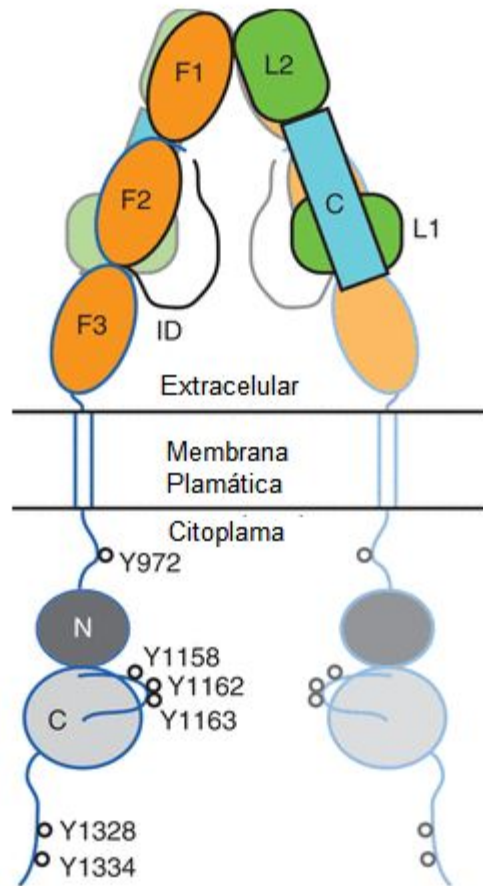


Figura 1. Estructura esquemática del receptor de Insulina. Las subunidades α , están ubicadas en la porción extracelular (en el esquema delineadas en negro) y constituidas por: un dominio rico en leucina (L1) luego un dominio rico en cisteína (C) seguido por otro dominio rico en leucina (L2) a continuación esta un dominio completo de fibronectina III (F1) seguido por uno incompleto de fibronectina III (F2) finalizando en un largo segmento carboxilo terminal (ID). La subunidad β se encuentra tanto en la parte extracelular como en el citoplasma y está delineada en azul, comienza con un corto dominio amino terminal (no se muestra en el esquema), seguido por el complemento del dominio de fibronectina III F2, a continuación se encuentra un dominio completo de fibronectina III (F3), luego está el segmento α helicoidal transmembranoso. En la parte citoplasmática de la subunidad β se encuentran la porción yuxtamembranosa seguida por el dominio de tirosina quinasa formado por los lóbulos N y C, en el cual se destaca el asa activadora, por último está en extremo carboxilo terminal. Se destacan las tirosinas (Y) que son autofosforiladas por el receptor.

Las subunidades β comienzan por un corto segmento amino terminal seguido por la porción final del dominio F2 de fibronectina tipo III seguido por un tercer dominio completo de fibronectina tipo III (F3) el cual se continua con el segmento de transmembrana, se piensa que el mismo adopta un configuración α helicoidal. La porción citoplasmática de la subunidad β está constituida por una porción yuxtamembranosa de unos 30 aminoácidos seguido del dominio de tirosina quinasa de unos 300 aminoácidos en el cual se describen dos lóbulos designados N y C, por último se encuentra la región carboxilo terminal de unos 70

aminoácidos (Figura 1)⁽¹⁰⁾.

Dado que el receptor comprende porciones extra e intracelulares, incluyendo un segmento que atraviesa la membrana plasmática y que posee una gran cantidad de carbohidratos, ha sido difícil realizar estudios cristalográficos de la molécula completa, en consecuencia los estudios tridimensionales han estado confinados a los dominios intra y extracelulares. La estructura del dominio extracelular muestra una conformación de simetría doble antiparalela (el extremo amino terminal de una subunidad α se aproxima y empaqueta al extremo carboxilo terminal de la otra subunidad α) de una "V" invertida, los dominios F1, F2 y F3 están dirigidas como un tallo lineal desde la membrana plasmática hacia afuera y los dominios L1, C y L2 de nuevo hacia la membrana plasmática; así mismo los dominios L1, C y L2 de un monómero $\alpha\beta$ se empaquetan contra las dominios F1, F2 y F3 del otro monómero⁽¹¹⁾ (Figura 1).

Se describen dos sitios de unión del receptor a la insulina: el sitio 1 está formado por el primer dominio rico en leucina (L1) de una subunidad α y los 16 aminoácidos finales del extremo carboxilo terminal del dominio ID de la otra subunidad α . Se piensa que el sitio 2 de unión a la insulina involucra las asas de los dominios de fibronectina III, F1 y F2 de las subunidades $\alpha\beta$ de la otra mitad del receptor; el sitio 1 se considera el más importante de los sitios de unión de la insulina a su receptor⁽¹²⁾.

El análisis cristalográfico de la porción citoplasmática de la subunidad β ha sido realizado en varios estados de fosforilación y en presencia y ausencia de sustratos (Mg^{++} ATP y proteínas). El lóbulo amino terminal N, presenta cinco cadenas de lámina plegada (configuración β) y una porción α helicoidal; por otro lado el lóbulo carboxilo terminal C principalmente tiene una estructura α helicoidal⁽¹³⁾. La actividad de tirosina quinasa, del IR, está regulada por el estado de fosforilación del asa de activación presente en el lóbulo C la cual comienza con el tripeptido ¹¹⁵⁰aspartico-fenilalanina-glicina y se extiende hasta la prolina 1170, en la misma se encuentran tres sitios de autofosforilación, las tirosinas: 1158; 1162 y 1163 las cuales son fosforiladas en *trans* cuando el dominio extracelular se une a la insulina (la unión de la insulina ocurre en un dímero $\alpha\beta$ y la fosforilación ocurre en el otro)⁽¹³⁾.

Aun cuando IR es un heterotetrámero ($\alpha_2\beta_2$) se piensa que el complejo de activación ocurre por la unión de una sola molécula de insulina asimétricamente al IR con una afinidad en el orden subnanomolar (0,2 nM), en consecuencia el cambio conformacional ocurre (o principalmente ocurre) en uno de los dímeros $\alpha\beta$. A concentraciones mayores de insulina se observa un efecto cooperativo negativo para la unión a los dos sitios equivalentes en IR⁽¹⁴⁾. Los dos sitios de unión a la insulina están opuestos cercanamente, sugiriendo que los cambios conformacionales inducidos por la unión de la hormona al IR sean relativamente sutiles⁽¹⁵⁾.

En ausencia de insulina, condición basal, la transfosforilación del dominio de tirosina quinasa está limitado por un mecanismo desconocido, la unión de la insulina al dominio extracelular induce una transición estructural en el receptor que facilita la transfosforilación del dominio citoplasmático de tirosina quinasa. Existen al menos dos posibles explicaciones para la condición basal: la primera postula que los dominios de tirosina quinasa están espacialmente

separados lo cual impide el proceso de transfosforilación, en la segunda, los dominios de tirosina quinasa se encuentran próximos espacialmente pero dispuestos de tal manera que se impide la transfosforilación, probablemente por la existencia de un dímero inhibitorio⁽¹⁶⁾.

En la condición basal y en la ausencia de Mg^{++} ATP el asa activadora adopta una configuración que ocluye el sitio de unión del ATP con lo cual se previene la autofosforilación de las tirosinas en cis, esto es debido a que la longitud del asa activadora es tal que no permite la unión simultánea del ATP y la tirosina a fosforilarse (Y1162) al sitio activo ⁽¹⁷⁾.

Se demostró que la primera tirosina en autofosforilarse, en el asa activadora, es la 1162 seguida por las tirosinas 1158 y 1163⁽¹⁸⁾. En la estructura cristalina, se ha podido observar que la tirosina 1162 de una subunidad $\alpha\beta$ de IR se encuentra unido al centro activo de la subunidad $\alpha\beta$ contralateral (en trans); esta configuración se adopta gracias a la fuerte unión del ATP lo cual fuerza al asa activadora a separarse no ocluyendo el sitio de unión del nucleótido ⁽¹⁹⁾.

Una vez que IR es transfosforilado en las tirosinas 1158; 1162 y 1163, el asa activadora es estabilizada en una conformación óptima para unir los substratos: Mg^{++} ATP y las tirosinas de las proteínas y para que ocurra la catálisis. Aun cuando la fosforilación de la tirosina 1163 es la más importante para la estabilización del asa activadora, la fosforilación de las tres tirosinas es importante para la unión a los substratos del receptor ⁽¹⁰⁾.

Además se fosforila una tirosina en la región yuxtamembranosa (Y 972) la cual es importante para la unión y activación de las proteínas substratos del IR (IRS por sus siglas en ingles) y de las proteínas Shc (son 3 proteínas de PM 46; 52 y 66 KDa que poseen en extremo amino terminal dominios de unión a fosfotirosina y en el extremo carboxilo terminal dominios SH2). Así mismo se fosforilan 2 tirosinas (Y1328 y Y1334) en la porción carboxilo terminal ⁽¹⁰⁾.

El mecanismo y la cinética de la unión de la insulina a su receptor ha sido ampliamente estudiado⁽³⁾, la misma es compleja y muestra cooperatividad negativa; solo una molécula de insulina se une al receptor con alta afinidad y la unión de otra molécula de insulina lo hace con baja afinidad probablemente por asimetría inducida por ligando.

En la insulina se describen 2 sitios de unión al receptor, el sitio 1 o "superficie de unión clásica" incluye aminoácidos de ambas cadenas, siendo los de la cadena A: A1 Gly, A5 Gln, A19 Tyr y A21 Asn y los residuos de la cadena B son: B12 Val, B16 Tyr, B24 Phe, B25 Phe y B26 Tyr. En sitio 2 están incluidos también aminoácidos de ambas cadenas: Ser A12, Leu A13, Glu A17, His B10, Glu B13 y Glu B17. En general se acepta que el sitio 1 de la insulina se une al sitio 1 de IR y el sitio 2 de la insulina se une al sitio 2 del receptor ⁽³⁾.

Aun cuando se ha progresado bastante en el conocimiento de la estructura de los dominios extracelular y citoplasmático del IR, en la actualidad no se disponen de estudios cristalográficos del receptor completo en la presencia y ausencia de insulina y en consecuencia no se dispone de información sobre como la unión del ligando al dominio extracelular condiciona la activación del dominio citoplasmático de tirosina quinasa⁽⁷⁾. Existe

controversia sobre el tipo de cambio conformacional que ocurre y si el incremento de la actividad de tirosina quinasa ocurre por activación o por eliminación de una actividad inhibitoria.

TRANSDUCCIÓN INTRACELULAR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Una vez que ocurre la unión a la insulina al IR el mismo se autofosforila en tres sitios en asa activadora (Y1158; Y1162 y Y1163) sin embargo las mismas no son responsables por la interacción con las proteínas con dominios SH2 (homologías Src 2) o dominios de unión a fosfotirosina (PTB por sus siglas en inglés) que funcionan como sustratos del receptor, por el contrario las mismas se unen a la tirosina fosforilada Y972 de la región yuxtamembranosa colocándolas en posición para su fosforilación y activación por el asa activadora. Estos sustratos son: una familia de proteínas sustratos del receptor de la insulina (IRS por sus siglas en inglés) en la cual existen 6 miembros y las proteínas adaptadoras Shc (proteínas con dominios de homología Src 2)⁽⁷⁾.

Para comprender mejor la transducción intracelular de la señalización de la insulina es adecuado postular la existencia de tres “nódulos críticos” a saber: el IR e IRS, la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K por sus siglas en inglés) y la proteína quinasa B (AKT/PKB por sus siglas en inglés)⁽²⁰⁾. Las características del IR fueron descritas en la sección precedente.

De las 6 proteínas IRS las 5 y 6 no tienen actividad de sustratos de IR⁽²¹⁾, de las cuatro restantes IRS 1 y 2 son las más importantes y alcanzan una distribución ubicua, IRS3 se encuentra en los adipocitos y el cerebro mientras que IRS4 se encuentra en las células embrionarias. IRS 1 y 2 y las proteínas adaptadoras Shc median efectos metabólicos de la insulina⁽²⁰⁾. Los IRS son proteínas que poseen en el extremo amino terminal un dominio de homología de pleckstrina (es un dominio de unos 120 aminoácidos que existe en una gama de proteínas relacionadas con la señalización intracelular y el citoesqueleto y tienen la capacidad de unirse a los fosfolípidos de la membrana plasmática) adyacente a un dominio de PTB el cual une a la tirosina fosforilada Y972 de la porción yuxtamembranosa del dominio citoplasmático de IR. Las regiones centrales y carboxilo terminales de las proteínas IRS poseen unas 20 tirosinas potencialmente fosforilables por el IR fosforilado. Luego de activados, por fosforilación, los IRS unen moléculas que contienen dominios SH2.

Del “nódulo” IR-IRS parten dos vías principales de señalización de la insulina, estas son: la vía de la PI3K (una quinasa de fosfolípidos)/AKT (PKB)⁽²²⁾ y la vía de Raf/Ras/MEK/ MAPK (proteína quinasa activado por mitógeno también conocida como quinasa regulada por señales extracelulares, ERK por sus siglas en inglés)⁽²³⁾. La vía de la PI3K es responsable de la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina y está conectado exclusivamente a IRS, por otro lado, la vía de la MAPK parte de ambos IRS y Shc y está relacionada con la regulación de la expresión genética y con la cooperación entre PI3K y el control del crecimiento (mitogénesis) y diferenciación celular⁽²⁰⁾.

Vía de la Fosfatidilinositol 3 quinasa.

La activación de la vía de la PI3K, se inicia con la unión de los 2 dominios de SH2 presentes en la subunidad reguladora (p85) de la enzima a los IRS 1 y/o 2 fosforilados por IR, con lo cual se activa la subunidad catalítica (p110) la cual fosforila al fosfatidilinositol 4; 5 bisfosfato generando fosfatidilinositol-3; 4; 5 trifosfato (PIP3), este fosfolípido actúa como segundo mensajero, se une por medio de un dominio de homología de pleckstrina a la proteína quinasa dependiente de fosfoinositol (PDK por sus siglas en inglés) activándola. Por su parte PDK fosforila y activa a AKT/PBK ⁽²⁰⁾ (Figura 2).

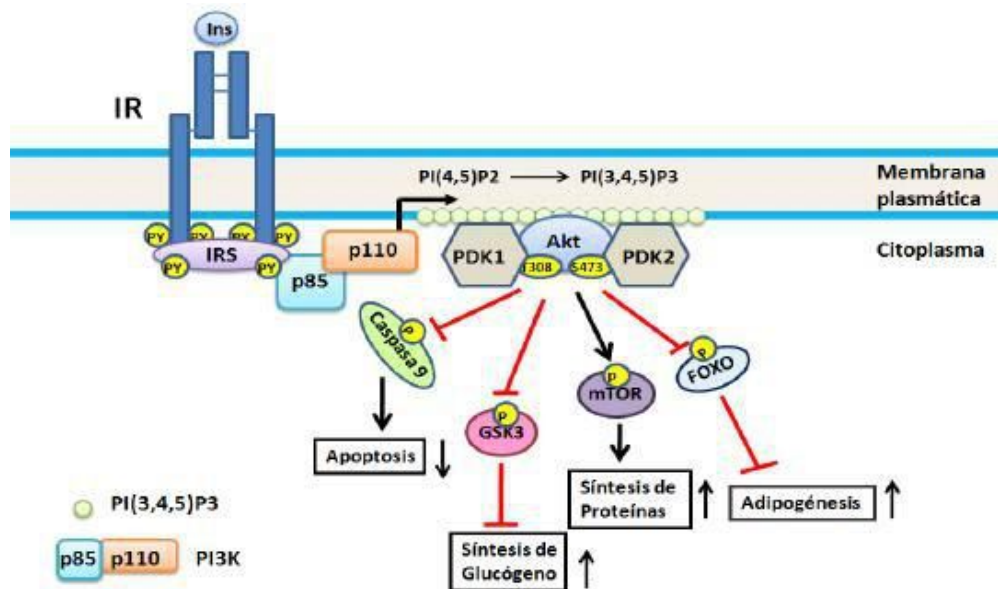


Figura 2. Vía de PI3K. Se inicia por la unión de la subunidad reguladora (p85) de la PI3K a los IRS fosforilados con lo cual se activa la subunidad catalítica (110), esta a su vez fosforila a PIP2 transformándolo en PIP3, este último actuando como segundo mensajero activa a PDK la cual fosforila a AKT/PBK. En el esquema se representan cuatro de los substratos de AKT/PBK: caspasa 9, GSK3, mTOR y Fox0; no se incluye AS160 ya que ésta será objeto de consideración aparte. Para detalles ver el texto.

AKT/PBK, son una familia de proteína quinasa de serina/treonina que poseen un dominio de homología de pleckstrina lo cual permite su reclutamiento a la membrana plasmática para unirse a PIP3. Los substratos más importantes del "nódulo" AKT/PBK son:

- El blanco de la rapamicina en los mamíferos (mTOR por sus siglas en inglés) involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas ⁽²⁴⁾. mTOR es una proteína quinasa de serina/treonina que actúa como sensor de nutrientes y que funciona como la subunidad catalítica de 2 complejos estructuralmente distintos mTORC1 y mTORC2. mTOR estimula la síntesis de proteínas por fosforilación del factor de iniciación eucariota E4 que une a la proteína 1 y por fosforilación de la proteína ribosomal p70 S6 quinasa ⁽²⁴⁾.
- La quinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3 por sus siglas en inglés) involucrada en la regulación de la síntesis de glucógeno ²⁵. La GSK3 es una quinasa de serina/treonina que inhibe por fosforilación a la glucógeno sintasa. La GSK3 es inhibida por fosforilación por AKT/

PKB con lo cual se estimula la síntesis de glucógeno.

- La familia 0 de los factores de transcripción “cabeza de tenedores” (FoxO por sus siglas en inglés) y en particular FoxO1 el cual está involucrado en la regulación de los genes gluconeogénicos y adipogénicos ⁽²⁶⁾. FoxO1 es un factor de transcripción que en ausencia de insulina se traslada al núcleo y estimula la expresión de genes tales como el de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa, una enzima clave en la neoglucogénesis, así como el de la ciclina atípica G2 la cual bloquea el ciclo celular, FoxO1 es inhibido por la insulina y aparentemente juega un papel muy importante en la mitogénesis inducida por insulina ⁽²⁷⁾. FoxO1 es secuestrado en el citoplasma por la fosforilación por AKT/PKB y en consecuencia no estimula la transcripción de los genes antes citados.

- La proteína AS160 (substrato de AKT/PKB de 160 KDa) involucrada en el transporte de glucosa⁽²⁸⁾, en vista del papel muy importante que juega en la homeostasis de glucosa será discutido con algún detalle más adelante.

- Fosforila y activa a la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS por sus siglas en inglés) la cual produce la molécula vasodilatadora y anti-inflamatoria óxido nítrico (NO) estableciéndose una conexión potencial entre la resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares ⁽²⁹⁾.

- Fosforila directamente la proteínas caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto la supervivencia celular.

Vía de Raf/Ras/MEK/ MAPK.

Una segunda rama esencial de la señalización de la insulina la constituye la vía de Raf/Ras/ MEK/ MAPK (Figura 3), la cual es independiente de PI3K y de AKT/PKB. Ambos, IR activado y las proteínas IRS activadas poseen sitios de unión a proteínas que contienen dominios SH2 tales como Grb2 (proteína adaptadora que une al factor de crecimiento 2, está relacionada con la transducción de señales celulares) y Shc (Son 3 proteínas de PM 46; 52 y 66KDal que poseen en el extremo amino terminal dominios de unión a fosfotirosina, PBT, y en el extremo carboxilo terminal dominios SH2). El extremo carboxilo terminal de Grb2 une proteínas como Gab-1 (es uno de los substratos de las proteínas IRS) y en el extremo amino terminal une proteínas ricas en prolina tales como “hijo de los sin siete” (SOS por sus siglas en inglés) la cual funciona como un intercambiador de nucleótidos de guanina para Ras (proteínas de bajo peso molecular que unen nucleótidos de guanina, controlan diferentes fenómenos: integridad del citoesqueleto; proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular y la apoptosis). SOS permiten la conversión de Ras asociado a la membrana plasmática de la forma inactiva unido a GDP a la forma activa unido a GTP. Ras-GTP activa a la proteína quinasa de serina/ treonina denominada Raf, la cual estimula por fosforilación, en serina/treonina, su blanco corriente abajo MEK1 y 2 (este acrónimo deriva de MAP quinasa, ERK y Kinasa), estos a su vez fosforilan (en serina/treonina) y activan a las MAP quinasas (proteína quinasa activada por mitógeno) la cual activa por fosforilación a ERK1 y 2 (quinasa regulada por señal extracelular). La activación de ERK1 y 2 juega un papel directo en la proliferación y diferenciación celular regulando la expresión de genes y eventos extranucleares tales como la organización del

citoesqueleto mediante la fosforilación y activación de blancos en el núcleo y el citoplasma (23).

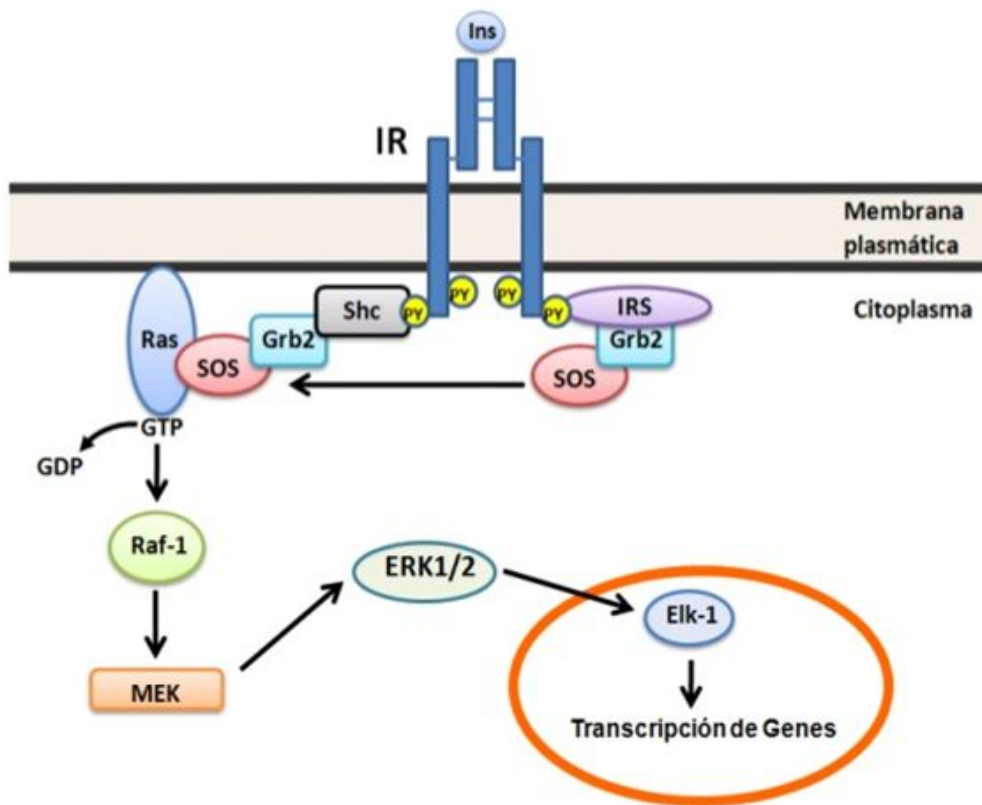


Figura 3. Vía de Raf/Ras/MEK/ MAPK. Esta vía se inicia con la interacción de IR e IRS activados con las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc, ésta última une SOS que actúa como un intercambiador de nucleótidos de guanina en la proteína de bajo peso molecular Ras. Ras-GTP fosforila y activa a la proteína quinasa Raf, ésta a vez fosforila a MEK, la cual activa por fosforilación a ERK 1 y 2 que modifican eventos nucleares y citoplasmáticos. Para detalles ver el texto.

Translocación del GLUT 4 regulado por la insulina.

El efecto clásico de la acción de la insulina es la entrada de la glucosa a las células del tejido adiposo, al músculo esquelético y cardíaco⁽²⁾. La entrada de glucosa al músculo esquelético es el evento más importante mediado por la insulina que previene la hiperglicemia postprandial; éste ocurre gracias a la translocación, desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática, del transportador de glucosa 4 (GLUT4) por un mecanismo que aún no está completamente claro⁽³⁰⁾.

El GLUT4 es una de las 13 isoformas de transportadores de glucosa, los cuales poseen 12 dominios transmembranosos y que se expresa abundantemente en los tejidos adiposo y muscular. Los GLUTs transportan monosacáridos por un mecanismo independiente de ATP y sin el requerimiento de sodio; el GLUT4 tiene la característica distintiva de encontrarse en vesículas intracelulares (GSVs por sus siglas en inglés) en el estado no estimulado las cuales

son redistribuidas a la membrana plasmática por efectos de la insulina o por otros estímulos como el ejercicio muscular ⁽³¹⁾.

En las células adiposas y musculares, no estimuladas por la insulina, aproximadamente entre un 3-10 % de los GLUT4 se encuentran en la membrana plasmática y más del 90 % está en compartimientos intracelulares (GSV). La estimulación por insulina incrementa considerablemente la exocitosis de GLUT4 a la membrana plasmática reduciendo mínimamente la endocitosis⁽³²⁾. Concomitantemente ocurre una redistribución de las GSV, de una forma cónica alrededor del núcleo a la de un anillo⁽³⁰⁾. La fusión de las GSV a la membrana plasmática requiere de unas proteínas de membrana asociadas a vesículas (VAMP2 por sus siglas en inglés) las cuales pertenecen a la familia de las SNARE (proteínas que median la fusión de vesículas a sus membranas blancas).

La principal vía involucrada en la translocación de las GSVs es la PI3K – PDK – AKT/PBK, (Figura 4) ésta última fosforila uno de sus substrato AS160 la cual es una proteína que modula la actividad de GTPasa de la proteína de bajo peso molecular Rab. Cuando AS160 no está fosforilado y es activa estimula la actividad de GTPasa de Rab generándose Rab-GDP el cual es inactivo y se bloquea la exocitosis de GLUT4. Por el contrario la fosforilación de AS160, por AKT/PBK, la inactiva con lo cual predomina Rab-GTP incrementándose el tráfico de vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática. En mutantes de AS160 se inhibe la translocación estimulada por insulina de GLUT4⁽²⁸⁾ lo cual sugiere que funciona como un regulador negativo que es inhibido por la insulina por medio de AKT/PBK. Así mismo en ratones “*knockdown*” (que no expresan una proteína) para AS160 se incrementa la cantidad basal de GLUT4 en la membrana plasmática lo cual es consistente con la función de retención de GLUT4 en GSVs intracelulares por AS160 que es liberado por la estimulación por insulina ⁽³³⁾.

La proteína quinasa C atípica (aPKC por sus siglas en inglés) requiere de PIP3 y fosforilación por PDK pero no está relacionada AKT/PKB; está involucrada en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y la captación de glucosa por los tejidos adiposo y muscular ³⁴. También se ha relacionado con la regulación de la síntesis de lípidos en el hígado por incremento de la expresión de la proteína que une el elemento regulador de los esteroides ⁽³⁵⁾.

En los últimos años se ha descrito una vía independiente de PI3K, que involucra CAP (proteína activada por catabolito la cual une AMPc) y APS (proteína adaptadora con dominios de pleckstrina y SH2 y es substrato del IR) que interactúa con c-Cbl (proteína que une ubiquitina, está relacionada con la señalización de ubiquitinización y degradación de proteínas. Posee un dominio que une tirosina fosforilada) en la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa estimulada por la insulina (Figura 4). Cbl es fosforilado en tirosinas por IR y en consecuencia recluta APS y CAP; posteriormente se une al complejo CrkII (proteínas adaptadoras que unen varios tipos de proteínas fosforiladas en tirosina además de poseer dominios SH2), esta a su vez interactúa con un factor liberador de nucleótidos de guanina (C3G) el cual se comporta como un factor intercambiador de la proteína de bajo peso molecular que une GTP, TC10 que activaría la aPKC (ζ/λ) con el consecuente incremento de la translocación de GSV ⁽³⁶⁾. Finalmente la estimulación de TC10 afecta la dinámica de la actina y la translocación de GLUT

4 a la membrana plasmática ⁽³⁶⁾.

Se requiere de un citoesqueleto con una actina dinámica para la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y el incremento de la captación de glucosa ⁽³⁷⁾, en las células musculares la remodelación de los filamentos de actina requiere de PI3K pero no de AKT/PBK⁽³⁸⁾. Se pudiera postular que la remodelación de la actina promovida por la insulina provee de una plataforma física para la migración de las vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática, ayudada por motores proteicos ⁽³⁹⁾.

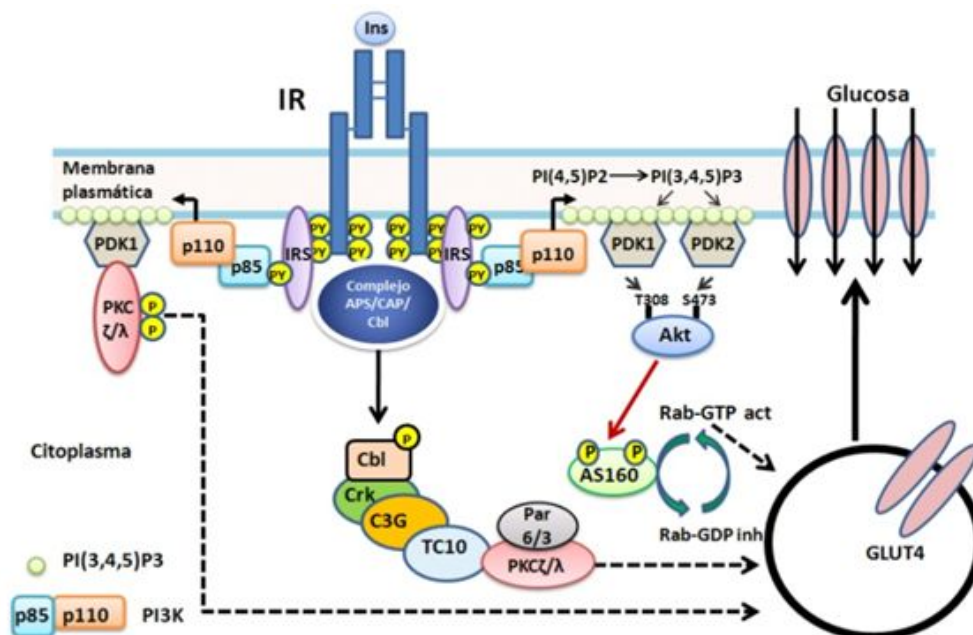


Figura 4. Exocitosis de GLUT4. La insulina promueve la translocación de GLUT4 desde las GSV a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a la proteína G de bajo peso molecular Rab las cuales participan en el tráfico de GSV. AS160 estimula la hidrólisis de GTP generando Rab-GDP el cual es inactivo, inhibiendo el tráfico de vesículas. Cuando AS160 es fosforilado por AKT/PBK se inhibe, incrementándose Rab-GTP y se incrementa el tráfico de vesículas. Por otra parte PDK fosforila la aPKC (ζ/λ) la cual incrementa la translocación de GSV. Se ha postulado una vía alterna que parte de IR el cual activaría a las proteínas APS-CAP-Cbl y estas activarían a la proteína G de bajo peso molecular TC10 que activaría aPKC (ζ/λ) la cual incrementa la translocación de GSV.

El ejercicio muscular también estimula la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática través de un mecanismo no mediado por la insulina y que no depende de PI3K, pero sí de la fosforilación de AS160 por la AMPK (quinasa dependiente de AMP)⁽³¹⁾, la cual funciona como un sensor metabólico muy importante, se activa alóstericamente por aumento de la concentración intracelular de AMP (disminución concomitante de ATP) y por fosforilación por quinasas como la proteína quinasa quinasa β dependiente de calcio/calmodulina ⁽⁴⁰⁾.

FINALIZACIÓN DE LA SEÑAL Y MECANISMOS DE RETROALIMENTACIÓN NEGATIVOS

La activación de proteína quinasas por la insulina está sujeta a la acción opuesta de proteína fosfatasas y de mecanismos de retroalimentación negativos, el balance adecuado entre ambos procesos garantiza una apropiada sensibilidad a la insulina y su alteración condiciona resistencia a la acción de la hormona. A continuación pasaremos revista a los mecanismos más importantes de control negativo:

- Fosforilación de serinas en IRS. La fosforilación en algunas serinas específicas, promovida por la estimulación por insulina, de IRS condicionan que los mismos no sean reconocidos por IR y/o que no puedan unirse a la subunidad reguladora de PI3K (p85) o aún más que se promueva su degradación⁽⁴¹⁾ (Figura 5).

- Fosfatasa de fosfotirosinas o fosfoserinas/treoninas. La actividad de proteína fosfatasas que actúen sobre tirosinas fosforiladas como la 1B (PTP1B por sus siglas en inglés) atenúan la respuesta a la insulina por promover la defosforilación de IR y de los IRS⁽⁴²⁾. Otro punto de control negativo lo constituye la defosforilación e inactivación de AKT/PBK y aPKC por proteína fosfatasas de serina/treonina 2A⁽⁴³⁾ (Figura 5).

- Fosfatasas de lípidos. La fosfatidilinositol-3; 4; 5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN por sus siglas en inglés) es una enzima que hidroliza a PIP3 (3; 4; 5) a PIP2 (4; 5) y la fosfatasa de fosfoinositol que contiene dominio SH2 (SHIP2 por sus siglas en inglés) la cual hidroliza PIP3 (3; 4; 5) a PIP2 (3; 4). La activación de estas enzimas reducen la cantidad de PIP3 con lo cual se reduce la actividad de AKT/PKB y aPKC disminuyendo los efectos de la insulina⁽⁴⁴⁾.

- Endocitosis del receptor. IR unido a la insulina es internalizado por endocitosis mediada por clatrina para ser reciclados o degradado en los lisosomas⁽⁴⁵⁾ (Figura 5).

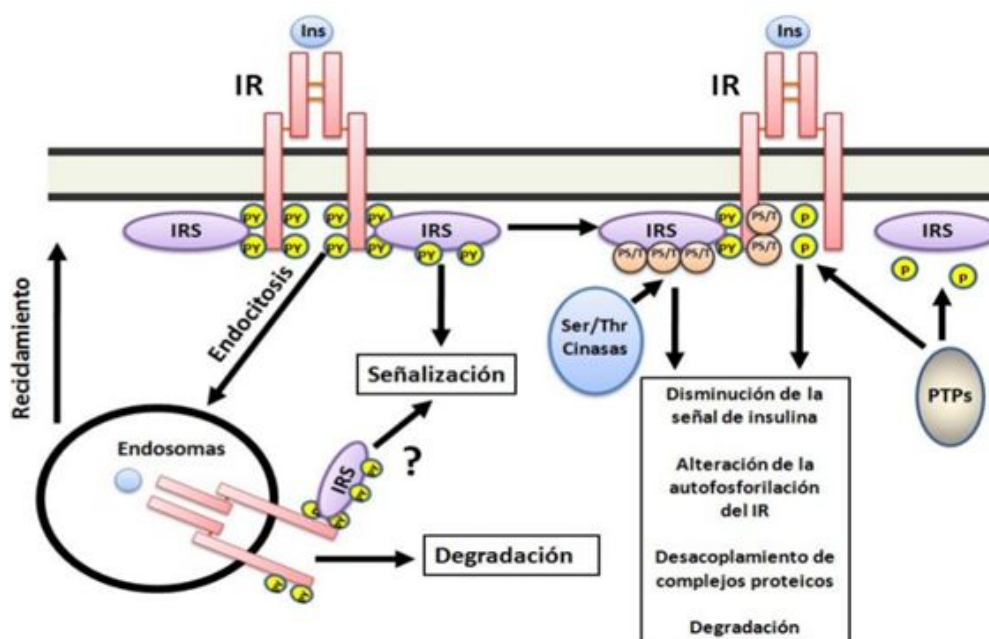


Figura 5. Mecanismos de regulación de la señal de insulina. La acción de la insulina es modulada por diferentes mecanismos entre los destacan: la actividad de proteína fosfatasa de tirosina (PTP) que defosforilan residuos de tirosina tanto en IR como en IRS inactivándolos; fosforilación en serinas/treoninas en IR y en IRS con lo cual son menos activos y la internalización de IR unido o no a la insulina para reciclarlo o degradarlo.

En las vesículas endocíticas, puede ocurrir el inicio de la degradación de la hormona gracias a la participación de una enzima específica que degrada insulina (IDE por sus siglas en inglés) o ser transferida intacta a otros organelos intracelulares como el núcleo, el aparato de Golgi, el citosol, entre otros ⁽⁴⁶⁾ o su liberación de la célula intacta por diacitosis o retroendocitosis ⁽⁴⁶⁾. La degradación de la insulina se puede considerar como un mecanismo de terminar su acción.

Conclusiones

Se ha progresado mucho en el conocimiento de la estructura y el mecanismo de IR; faltan estudios cristalográficos del receptor en su conjunto y el conocimiento del mecanismo implicado en la transfosforilación del dominio citoplasmático de IR luego de la unión a la insulina.

Los nódulos más relevantes de la red de señalización intracelular de la insulina han sido aclarados, aun cuando faltan algunos aspectos críticos de los mismos en particular en lo relacionado con la exocitosis de las vesículas que contienen el GLUT4.

Una mejor comprensión del mecanismo de acción de la insulina posiblemente facilite el desarrollo de nuevos fármacos, útiles en el tratamiento de la diabetes, más eficientes y con menores efectos indeseables.

REFERENCIAS

1. White MF. Longevity. Mapping the path to a longer life. *Nature* 524:170-171, 2015.
2. Levine R, Goldstein M, Klein S and Huddelston B. 1949. The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated and nephrectomized dogs. *J Biol Chem* 179:985-986.
3. De Meyts P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays* 26:1351-1362.
4. Petruzzelli LM, Ganguly S, Smith CJ, Cobb MH, Rubin CS and Rosen OM. 1982. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6792-6796.
5. Ebina Y, Ellis L, Jamagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou J-H, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, Roth RA and Rutter WJ. 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40:747-758.

6. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzelli LM, Dull TJ, Gray A, Coussens L, Liao YC, Tsubokawa M, Mason A, Seeburg PH, Grunfeld C, Rosen M and Ramachandran J. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313:765-761.
7. De Meyts P. 2016. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.
8. De Meyts P and Whittaker J. 2002 Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Disc* 1: 769-783.
9. Sparrow LG, McKern NM, Gorman JJ, Strike PM, Robinson CP, Bentley JD, Ward CW. 1997. The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J Biol Chem* 272: 29460-29467.
10. Hubbard SR. 2013. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1; 5 (3) 2013.
11. Smith BJ, Huang K, Kong G, Chan SJ, Nakagawa S, Menting JG, Hu SQ, Whittaker J, Steiner DF, Katsoyannis PG, Warda CW, Weissb MA, and Lawrence MC. 2010. Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proc Natl Acad Sci* 107: 6771-6776.
12. Whittaker L, Hao C, Fu W, Whittaker J. 2008. High-affinity insulin binding: Insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry* 47: 12900-12909.
13. Hubbard SR. 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* 16: 5572-5581.
14. De Meyts P. 2008. The insulin receptor: A prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* 33: 376-384.
15. Ward CW and Lawrence MC. 2012. Similar but different: Ligand-induced activation of the insulin and epidermal growth factor receptor families. *Curr Opin Struct Biol* 22: 360-366.
16. Li S, Covino ND, Stein EG, Till JH, Hubbard SR. 2003. Structural and biochemical evidence for an autoinhibitory role for tyrosine 984 in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem* 278: 26007-26014.
17. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372: 746-754.
18. Wei L, Hubbard SR, Hendrickson WA, Ellis L. 1995. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* 270: 8122-8130.
19. Wu J, Li W, Craddock BP, Foreman KW, Mulvihill MJ, Ji QS, Miller WT, Hubbard SR. 2008. Small-molecule inhibition and activation-loop trans-phosphorylation of the IGF1 receptor. *EMBO J* 27: 1985-1994.

20. Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96.
21. Versteyhe S, Blanquart C, Hampe C, Mahmood S, Christoff N, De Meyts P, Gray SG and Issad T. 2010. IRS-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol Med Rep* 3:189-193.
22. Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
23. Avruch J. 2007. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773:1150-1160.
24. Harris TE and Lawrence JC Jr. 2003. TOR signaling. *Sci. STKE* 2003, RE 15.
25. Cohen P. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:767-776.
26. Accili D and Arden KC. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation and transformation. *Cell* 117:421-426.
27. Svendsen AM, Winge SB, Zimmermann M, Lindvig AB, Warzecha CB, Sajid W, Horne MC and De Meyts P. 2014. Downregulation of cyclin G2 by insulin, IGF-I (insulin-like growth factor 1) and X10 (Asp B10 insulin): role in mitogenesis. *Biochem J* 457:69-77.
28. Sano H, Kane S, Sano E, Miiner CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW and Lienhard GE. 2003. Insulin-stimulated phosphorylation of Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278:14599-14602.
29. Yu Q, Gao F and Ma XL 2011. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 89: 516-524
30. Thong FSL, Dugani CB and Klip A. 2005. Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology* 20: 271-284.
31. Huang S and Czech MP. . 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5:237-252
32. Satoh S, Nishimura H, Clark AE, Kozka IJ, Vannucci SJ, Simpson IA, Quon MJ, Cushman SW, and Holman GD. 1993. Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J Biol Chem* 268: 17820-17829.
33. Egue L, Lee A, Chavez JA, Miinea CP, Kane S, Lienhard GE, and McGraw, TE. 2005. Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab*; 2: 263-272
34. Farese R. V. 2002. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin resistant states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E1-E11.
35. Farese R V, Sajan MP. and Standaert ML. 2005. Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 350-353.
36. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, and Saltiel AR. 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-

dependent activation of TC10. *Nature* 410: 944-948.

37. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, and Klip A. 2001. Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin Invest* 108: 371-381.

38. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, and Klip A. 1999. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myotubes. *Mol Cell Biol* 19: 4008-4018.

39. Kanzaki M and Pessin JE. 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J Biol Chem* 276: 42436-42444.

40. González-Mujica F. 2016. Drogas antidiabéticas diferentes de la insulina. Mecanismos de acción. *Vitae*. Abril-Junio N° 66. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=124&n=5316>.

41. Gual P, Marchand-Brustel Y, and Tanti JF. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87: 99-109.

42. Galic S, Hauser C, Kahn BB, Haj FG, Neel BG, Tonks NK, and Tiganis T. 2005. Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP. *Mol Cell Biol* 25: 819-829.

43. Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, and Olefsky JM. 2004. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 24: 8778-8789.

44. Ono H, Katagiri H, Funaki M, Anai M, Inukai K, Fukushima Y, Sakoda H, Ogihara T, Onishi Y, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, and Asano T. 2001. Regulation of phosphoinositide metabolism, Akt phosphorylation, and glucose transport by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 15: 1411-1422.

45. Carpentier JL. 1994. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Diabetologia* 37 Suppl 2: S117-S124

46. Duckworth WC, Bennett RG and Hamel FG. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*. 19: 608-624.