



# Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque

**Title in Spanish:** *Papel de la isoforma A del receptor de la insulina y del IGF-1R en el crecimiento de la placa aterosclerótica*

Almudena Gómez-Hernández<sup>1,2,3,\*</sup>, Nuria Beneit Redondo<sup>1,2,3</sup>, Liliana Perdomo Loaiza<sup>1,2,3</sup>, Óscar Escribano Illanes<sup>1,2,3</sup>, Sabela Díaz-Castroverde<sup>1,2,3</sup>, Manuel Benito de las Heras<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. <sup>2</sup>Instituto de Salud del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, España. <sup>3</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, España.

**ABSTRACT:** In this work, we have obtained new lines of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to demonstrate that IRA and IRA/IGF-1R might confer a proliferative and migratory advantage in response to insulin, IGF-2 or TNF- $\alpha$ . These results might be relevant due to in the early stages of atherosclerotic process; we have demonstrated that there is a significant increase of IRA and IGF-1R expression as well as higher formation of hybrid receptors in the aorta from two models of early atherosclerosis. Finally, anti-TNF- $\alpha$  treatment prevented vascular alterations.

**RESUMEN:** En este trabajo se han obtenido nuevas líneas de células de músculo liso vascular (VSMCs) que nos han permitido demostrar que la IRA e IRA/IGF-1R podrían conferirles una ventaja proliferativa y migratoria en respuesta a insulina, IGF-2 o TNF- $\alpha$ . Estos resultados podrían ser relevantes ya que en las fases iniciales del proceso aterogénico nosotros hemos demostrado que hay un aumento significativo de la expresión de la IRA e IGF-1R así como una mayor presencia de receptores híbridos en la aorta de dos modelos experimentales de aterosclerosis temprana. Y finalmente, como el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  previno las alteraciones vasculares.

\*Corresponding Author: algomezh@ucm.es

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Juan Abelló del Concurso Científico 2014 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 129-142

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

La insulina ejerce un gran número de acciones dependiendo de la fase del desarrollo, el grado de diferenciación o el tipo de célula estudiada. La selectividad en la señalización de la insulina es el resultado de la activación de forma específica de distintas vías de señalización (1) que comienzan con la activación del receptor de insulina (IR), su autofosforilación en la cadena  $\beta$  y la fosforilación de los sustratos del IR (IRSs) y posterior activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt, siendo crucial en las acciones de supervivencia y metabólicas de la insulina (2). Así, la insulina ejerce sus acciones a través de su receptor. Por splicing alternativo de 36 nucleótidos del exón 11 de las subunidades  $\alpha$  del IR, se generan dos isoformas: IRA (que pierde dicho exón) y la IRB (que tiene incluido el exón 11) (3). La relativa abundancia de una u otra isoforma del IR es específica de tejido y de especies (4,5). Además, la expresión de las isoformas del IR está también regulada por el estado de desarrollo y la diferenciación celular. IRA es predominante en células fetales y tumorales, mientras que la IRB es principalmente expresada en células diferenciadas y dianas de la insulina (6, 7). Las dos

isoformas del IR tienen algunas propiedades diferenciales. Así, aunque ambas isoformas del IR muestran alta afinidad por la insulina, IRA exhibe mucho mayor ratio de internalización que IRB (8), afinidad intermedia por el factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF-2) y baja afinidad por IGF-1 (6). Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas, el perfil de expresión de ambas isoformas puede modificarse. En este sentido, se ha descrito que en células  $\beta$  pancreáticas de ratón, la IRA confiere una ventaja proliferativa en respuesta a insulina e IGF-1, aportando una posible explicación para la hiperplasia pancreática inducida por la resistencia primaria hepática a la insulina en el modelo iLIRKO (9). En una línea de células hematopoyéticas (32D) la IRA induce señales mitogénicas y antiapoptóticas en respuesta a IGF-2, mientras que la IRB es más efectiva induciendo la diferenciación (10). Además, la IRA además de estar aumentada su expresión en las células  $\beta$  durante la hiperplasia pancreática, se ha visto un aumento de la expresión de IRA (11, 12) y sus niveles correlacionados con el grado de desdiferenciación en células cancerosas de tiroides (13).

Los IGFs, IGF-1 e IGF-2, polipéptidos con homología

estructural a la proinsulina e insulina, son constituyentes habituales del plasma sanguíneo, donde circulan unidos a IGFs. Regulan procesos de proliferación y diferenciación en múltiples tipos celulares y son capaces de ejercer los efectos metabólicos característicos de la insulina, pero, a diferencia de ésta, son sintetizados por la mayoría de tejidos del organismo (14). Los efectos biológicos de los IGFs están mediados por receptores de membrana específicos. El receptor de IGF-1 (IGF-1R), homólogo al IR, es responsable de la señalización intracelular de IGF-1 e IGF-2 (15). IGF-2 se une también al IGF-2R, idéntico al receptor de manosa-6-fosfato que no presenta actividad señalizadora para el crecimiento celular, mientras que induce un efecto mitogénico a través de una interacción de alta afinidad con IRA (16). En células que co-expresan IR e IGF-1R, como es el caso de las VSMCs, es posible la formación de receptores híbridos IR/IGF-1R (17).

Por otro lado, el papel potencial de ambas isoformas del IR en la aterosclerosis temprana es completamente desconocido. Para poder estudiar el papel de las dos isoformas del IR (IRA e IRB) en la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular implicadas en las fases iniciales del proceso aterogénico, se han generado nuevas líneas celulares. Las primeras presentan el IR (WT VSMCs e IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs), otra línea celular que carece del IR (IR<sup>-/-</sup> VSMCs), y otras dos líneas celulares expresan la IRA (IRA VSMCs) o la IRB específicamente (IRB VSMCs). En estas líneas celulares, se han estudiado los ratios de proliferación y migración inducidos por la insulina, IGFs o citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ ) así como la asociación entre las isoformas del IR y receptores aterogénicos o con el receptor de IGF-1 (IGF-1R). Además, se ha estudiado la expresión de ambas isoformas del IR, IGF-1R y TNFR-1 (receptor de alta afinidad de TNF- $\alpha$ ) en dos modelos de daño vascular, como un modelo clásico de aterosclerosis (ApoE<sup>-/-</sup> sometido a dieta rica en grasa durante 18 semanas) y un segundo modelo de resistencia a la insulina vascular y disfunción vascular (BATIRKO de un año de edad) (18). Nuestros resultados parecen sugerir que la IRA, y no la IRB, confiere una ventaja proliferativa y migratoria a las VSMCs en respuesta a diversos estímulos proaterogénicos. Además, la IRA podría asociarse con IGF-1R favoreciendo las acciones aterogénicas de IGF-2 bajo condiciones inflamatorias.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Modelos experimentales

Los ratones macho fueron mantenidos en el animalario según los estándares de temperatura y los ciclos de luz recomendados. A los ratones ApoE<sup>-/-</sup> y sus controles wild-type se les administró una dieta rica en grasas (Western A04 + 21% kcal aportadas por los lípidos) durante 18 semanas desde la semana sexta. Los ratones se genotiparon por PCR a partir de 10-200ng del DNA extraído de la cola. Se sometió a una amplificación de 35 ciclos (30 segundos, 94°C; 40 segundos, 68°C; y 1 minuto, 72°C) en el

termociclador. Los tres primers utilizados fueron los siguientes: el oligonucleótido sentido, oIMR0180 (5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3') y los dos oligonucleótidos antisentidos, oIMR0181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3') y oIMR0182 (5'-GCCGCCCCGACTGCATCT-3'). Una banda de 155 pb se obtenía para el ratón WT y otra banda de 245 pb para el ratón ApoE<sup>-/-</sup>. El ratón BATIRKO y sus controles de 52 semanas recibían dieta estándar (A04, 3% de las calorías está aportada por la grasa). Además un grupo de animales BATIRKO se trataron con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  (MP6-XT22, Biolegend) (50  $\mu$ g/intraperitonealmente por animal) cada 3 días, durante 6 semanas. El genotipaje de los controles y de los animales BATIRKO se realizó como se ha descrito previamente (18).

Los ratones anestesiados con Avertin (250 mg/kg, ip) se perfundieron con suero salino desde el ventrículo izquierdo. Los arcos aórticos se incluyeron en OCT para inmunohistoquímica y la aorta torácica se congeló para valorar la expresión del mRNA de genes implicados en el proceso ateroesclerótico por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El estudio se ha realizado según los acuerdos con la normativa de la Unión Europea y ha sido previamente aprobado por el comité ético de nuestra institución.

### 2.2. Cultivos celulares

En primer lugar, se aislaron las arterias aórticas torácicas de 2 ratones macho IR<sup>LoxP/LoxP</sup> de 8 semanas de edad. Los ratones anestesiados (Avertin, 250 mg/kg, ip) fueron perfundidos con solución salina y las arterias aórticas se sometieron a digestión con colagenasa, seguidos de lavados y centrifugaciones para la obtención del cultivo primario de VSMCs. A partir de este cultivo primario se obtuvieron nuevas VSMCs de aorta de ratón con IR (IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs), sin IR (IR<sup>-/-</sup> VSMCs), y líneas celulares que expresan específicamente la isoforma A (IRA VSMCs) o la isoforma B (IRB VSMCs). Para ello, el cultivo primario de IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs fue transfectado por infección retroviral (partículas virales que contienen el vector retroviral pBabe codificando el antígeno largo T de SV40) y seleccionado con puomicina 1  $\mu$ g/mL durante 3 semanas. Las IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs inmortalizadas fueron infectadas con adenovirus que codifican la recombinasa Cre para obtener IR<sup>-/-</sup> VSMCs. Finalmente, las IR<sup>-/-</sup> VSMCs fueron transfectadas por infección retroviral (partículas virales que contienen el vector retroviral pBabe codificando las isoformas individuales del IR humano, IRA o IRB) y seleccionadas con higromicina 200  $\mu$ g/mL durante 2 semanas para obtener IRA VSMCs o IRB VSMCs, respectivamente.

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) a una temperatura de 37°C y una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron privadas de suero durante 4-5 horas para los experimentos de señalización o 18 horas para los ensayos de migración o de expresión de mRNA y

después incubadas con los correspondientes estímulos. En los experimentos de señalización de insulina, captación de glucosa y del mRNA, las células estaban en subconfluencia (70-80%).

### 2.3. Western Blot

Los estudios de Western blot se realizaron con los extractos totales de las VSMCs o de las arterias aortas como previamente se ha descrito (9). Los anticuerpos utilizados fueron anti-IR $\beta$  (Ab-4) de Oncogene, phospho-AKT (Ser473), AKT, p-p706K (Ser389), p70, pERK-1/-2 (S202/T204) y ERK de Cell Signalling, Glut-4, TNF-R1 y TNF-R2, de Santa Cruz Biotechnology, p53 de Millipore,  $\alpha$ - y  $\beta$ -actina y  $\alpha$ -tubulina anticuerpos de Sigma-Aldrich Corp. El anticuerpo frente a la isoforma B del IR (+exón 11) fue cedido generosamente por el Dr. Sesti y la Dr. Hribal.

### 2.4. Inmunoprecipitación

Para obtener el total de las células lisadas, se rasparon con PBS frío y se centrifugaron a 4000 x g, durante 10 min a 4°C, y a continuación el pellet se resuspendió en el buffer de lisis. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 x g for 10 min y se recogieron los sobrenadante. Para la inmunoprecipitación, 150-200  $\mu$ g de proteína se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Los inmunocomplejos se incubaron con la proteína A o G agarosa durante 4h, y finalmente, se sometieron a una electroforesis en geles PAGE-SDS.

Para la inmunoprecipitación con extractos de proteínas de arterias aortas, en el modelo ApoE<sup>-/-</sup> fue necesario reunir muestras aórticas de 5 ratones ApoE<sup>-/-</sup> y juntamos también otras 5 muestras de sus respectivos controles. Sin embargo, se pudieron utilizar muestras individuales de tres ratones por grupo en BATIRKO y controles de 52 semanas. 150  $\mu$ g de proteínas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-IRB. Los sobrenadantes se reinmunoprecipitaron nuevamente con el anticuerpo anti-IRB. Los sobrenadantes de esta segunda inmunoprecipitación se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-IR $\beta$  (que reconoce a las dos isoformas del IR). Así, los inmunocomplejos (sólo habría de IRA) se recogieron con la proteína A-agarosa y se sometieron a una electroforesis en geles PAGE-SDS. Finalmente, las membranas se incubaron con IGF-1R o con TNFR-1 para estudiar la posible asociación entre la IRA e IGF-1R o TNF-R1, respectivamente.

### 2.5. Aislamiento de membranas plasmáticas

Las VSMCs se resuspendieron en el buffer de homogeneizado (20 mM Tris:HCl pH 7.4, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1mM PMSF, 10mM  $\beta$ -Mercaptoetanol, 10 $\mu$ g/mL Aprotinina, 10 $\mu$ g/mL Leupeptina) y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Las suspensiones se homogeneizaron con un homogeneizador Douncer. A continuación, se centrifugaron a 1300 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se salvó como fracción nuclear. Así, el pellet se homogeneizó en el buffer + 1% triton-X-100 y se incubó durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron

a 14000 rpm durante 1 h y el sobrenadante se recogió como fracción citosólica. Se detectaron los niveles de Glut-4 por Western blot utilizando un anticuerpo anti-Glut-4 (Millipore) en las fracciones citosólicas y de membranas plasmática. Y se utilizaron como controles de carga del Western blot, la incubación Anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Santa Cruz Biotechnology) y anti-GSK3 $\beta$  (Cell Signalling) en las fracciones de membrana y citosólica, respectivamente.

### 2.6. Captación de glucosa

Las células con una confluencia del 80% fueron mantenidas en ausencia de suero durante 4-6h. Después, se estimularon con 10 o 100 nmol/L de insulina durante 30 minutos. La captación de glucosa se medía por incubación de las células con 2-desoxy-d-[1-3H]-glucosa durante los últimos 10 minutos por triplicado en seis experimentos independientes como previamente se ha descrito (9).

### 2.7. PCR y qRT-PCR

El RNA fue extraído de las arteria aortas y de las VSMCs por el método del TRizol (Invitrogen, Barcelona, España) y cuantificado su concentración por la medida de absorbancia a 260 nm. 20 ng de RNA fueron necesarios para la reacción de la transcriptasa inversa, durante 15 min a 25°C y 2h a 37°C, con el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se evaluaron la expresión de distintos genes implicados en el proceso ateroesclerótico en la arteria aorta así como la expresión de IRA, IRB, IGF-1R y TNFR-1 en la aorta y las VSMCs. Como control interno se utilizó la GAPDH. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador 7500 Real-Time PCR, y la cuantificación relativa con el software Prism 7000 system SDS software (Applied Biosystems). La expresión de los genes analizados por qRT-PCR se realizó según se ha descrito previamente (9). Así, RQ correspondería con  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [ $\Delta Ct = Ct$  (gen diana) -  $Ct$  (gen endógeno);  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  para una muestra -  $\Delta Ct$  para el control].

En la caracterización de las líneas celulares generadas para confirmar la reconstitución de las líneas IRA e IRB VSMCs, se realizó un RT-PCR a partir de 5  $\mu$ g del RNA total utilizando unos oligonucleótidos que reconocen el exón 11 del IR murino para IRLoxP<sup>+/+</sup> e IR<sup>-/-</sup> (primer 1: 5'-ATCAGAGTGAGTATGACGACTCGG-3' y primer 2, 5'-TCCTGACTTGTGGGCA CAATGGTA-3) o del exón 11 del IR humano para IRA e IRB VSMCs (primer 1, 5'-ACCAGAGTGAGTATGAGGATTCCG-3' y primer 2, 5'-TCCGACTCGTGGGCA CGCTGGTC-3'. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2%.

### 2.8. Estudios de proliferación por incorporación de BrdU

10<sup>4</sup> células en 1mL de medio completo fueron sembradas en cada pocillo en las placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se mantuvieron en ausencia de suero durante 5 horas y se estimularon con insulina, IGF-1, IGF-2, TNF- $\alpha$  u otros estímulos aterogénicos durante 24 horas. Después, el ratio de proliferación celular se evaluó

utilizando un kit de ELISA BrdU. La incubación con la solución de BrdU marcado fue de 18 h.

### 2.9. Ensayo de herida

La migración de las VSMCs fue evaluada mediante un ensayo de reparación o cierre de herida. Para este ensayo, las células se dejaron crecer hasta confluencia en DMEM suplementado con 10% de FBS. Tras 18 horas sin suero, se realizó una “herida” en la parte central de la placa de cultivo usando una punta de pipeta estéril y se lavaron las células varias veces con PBS 1X para asegurar la eliminación de todas las células levantadas y/o muertas. Las células, a excepción de las células control, se estimularon con insulina (10 nM), IGF-1 (10 nM), IGF-2 (10 nM), o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) y se incubaron durante 24 horas. La migración celular fue monitorizada en tres puntos de referencia seleccionados por visualización microscópica directa utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300); mediante una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon Digital Sight DSU2), se tomaron fotografías con un objetivo 10X a tiempo 0 (momento en que realizó la herida) y a las 6, 12 y 24 horas de incubación. Se empleó el programa TScratch para llevar a cabo la cuantificación de las tasas de cierre de herida, expresando los resultados como porcentaje de cierre a las 6, 12 o 24 horas respecto al tiempo 0.

### 2.10. Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como media  $\pm$  SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA seguido de un test de Bonferroni (Graph Pad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA). Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la aterosclerosis temprana

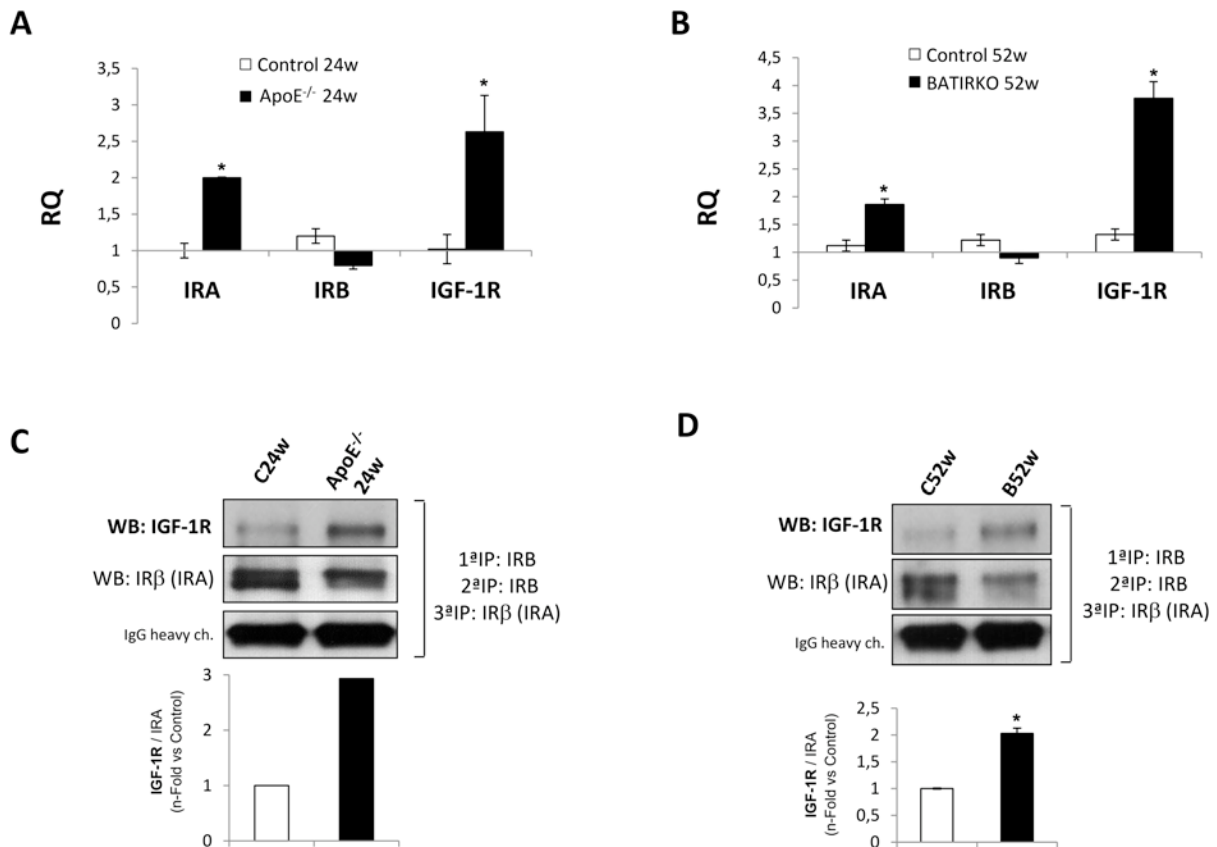
Uno de los principales objetivos de este trabajo es valorar si el perfil de expresión de las isoformas del IR podría modificarse en el proceso aterosclerótico al igual que ocurre en otras situaciones patológicas como en la hiperplasia pancreática o en procesos tumorales. Para ello, empleamos dos modelos animales que presentan distinto grado de daño vascular. El primero de ellos fue el ratón ApoE<sup>-/-</sup> como modelo de hipercolesterolemia que desarrolla aterosclerosis de forma espontánea o sometido a dieta grasa. El ratón ApoE<sup>-/-</sup> presentó un aumento significativo de los niveles de colesterol y de los triglicéridos sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa. El área de lesión en los arcos aórticos era del 48,9%, la acumulación lipídica en los arcos aórticos del

23,7% y una estenosis del 32,8% (datos no mostrados). Además, presentan un aumento significativo del infiltrado de macrófagos, del número de VSMCs y de la tinción frente a PCNA en los arcos aórticos. También se observó un aumento significativo de la expresión del mRNA de ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- $\alpha$  y PAI-1 así como de IRA (Figure 1A), sin cambios en la IRB, en la arteria aorta de ratones ApoE<sup>-/-</sup>.

El segundo de los modelos que se ha empleado ha sido el ratón BATIRKO de 52 semanas que muestra resistencia vascular a la insulina y disfunción vascular (18). Estos ratones tienen una severa lipoatrofia marrón, obesidad, hipoinsulinemia, moderada hiperglucemia en el ayuno, intolerancia a la glucosa sin resistencia global a la insulina debido a un defecto en la secreción de la insulina (18). Previamente se había demostrado que en la aorta del ratón BATIRKO de 52 semanas había un aumento significativo de la expresión de ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- $\alpha$  o PAI-1 así como un aumento significativo de la expresión de la IRA (Figura 1B). Además, se observó también una correlación significativa y positiva entre la expresión de la IRA y ET-1, o ICAM-1, o MCP-1, o TNF- $\alpha$  o PAI-1 tanto en la arteria aorta de ratones ApoE<sup>-/-</sup> como de ratones BATIRKO (datos no mostrados).

Además de observar un aumento significativo de la expresión de la isoforma A del IR en la aorta de los ratones ApoE<sup>-/-</sup> y BATIRKO de 52 semanas, se obtuvo un aumento significativo de la expresión de IGF-1R y una mayor formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R. Todo ello contribuyendo a la proliferación y migración de las VSMCs implicadas en las fases iniciales del crecimiento de la placa. Otros autores han descrito previamente que hay un aumento significativo del IGF-1R en las placas ateroscleróticas de un modelo experimental en conejos (19). Sin embargo, los niveles de IGF-1 e IGF-1R están disminuidos en placas ateroscleróticas avanzadas y podrían contribuir a la apoptosis de las VSMCs y favorecer la ruptura de la placa aterosclerótica (20, 21).

Un aumento significativo en la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en la arteria aorta de ApoE<sup>-/-</sup> y BATIRKO podría contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina vascular. La regulación de la expresión del IGF-1R podría impactar sobre la sensibilidad a la insulina. En este sentido, la disminución de la expresión de IGF-1R podría incrementar la fracción de receptores de insulina organizados en holoreceptores que podría conducir a aumentar la señalización de insulina y las propiedades anti-inflamatorias de la misma (22).



**Figura 1**

**Figura 1. Expresión de las isoformas del IR e IGF-1R y sus asociaciones en dos modelos experimentales de daño vascular.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de IRA, IRB and IGF-1R en la aorta del ratón ApoE<sup>-/-</sup> (A), BATIRKO (B) y sus respectivos controles. Geles representativos y sus cuantificaciones de la asociación de IRA con IGF-1R en la aorta del ratón ApoE<sup>-/-</sup> (C), BATIRKO (D) y sus respectivos controles. Grupo control de 24 semanas (C24w; n=5); grupo ApoE<sup>-/-</sup> de 24 semanas (ApoE<sup>-/-</sup> 24w; n=5); grupo control de 52 semanas (C52w; n=6); grupo BATIRKO de 52 semanas (B52w; n=5). \*p<0.05 vs. cada Control; †p<0.05 vs. grupo BATIRKO de 52 semanas.

### 3.2. Implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la proliferación de las VSMCs

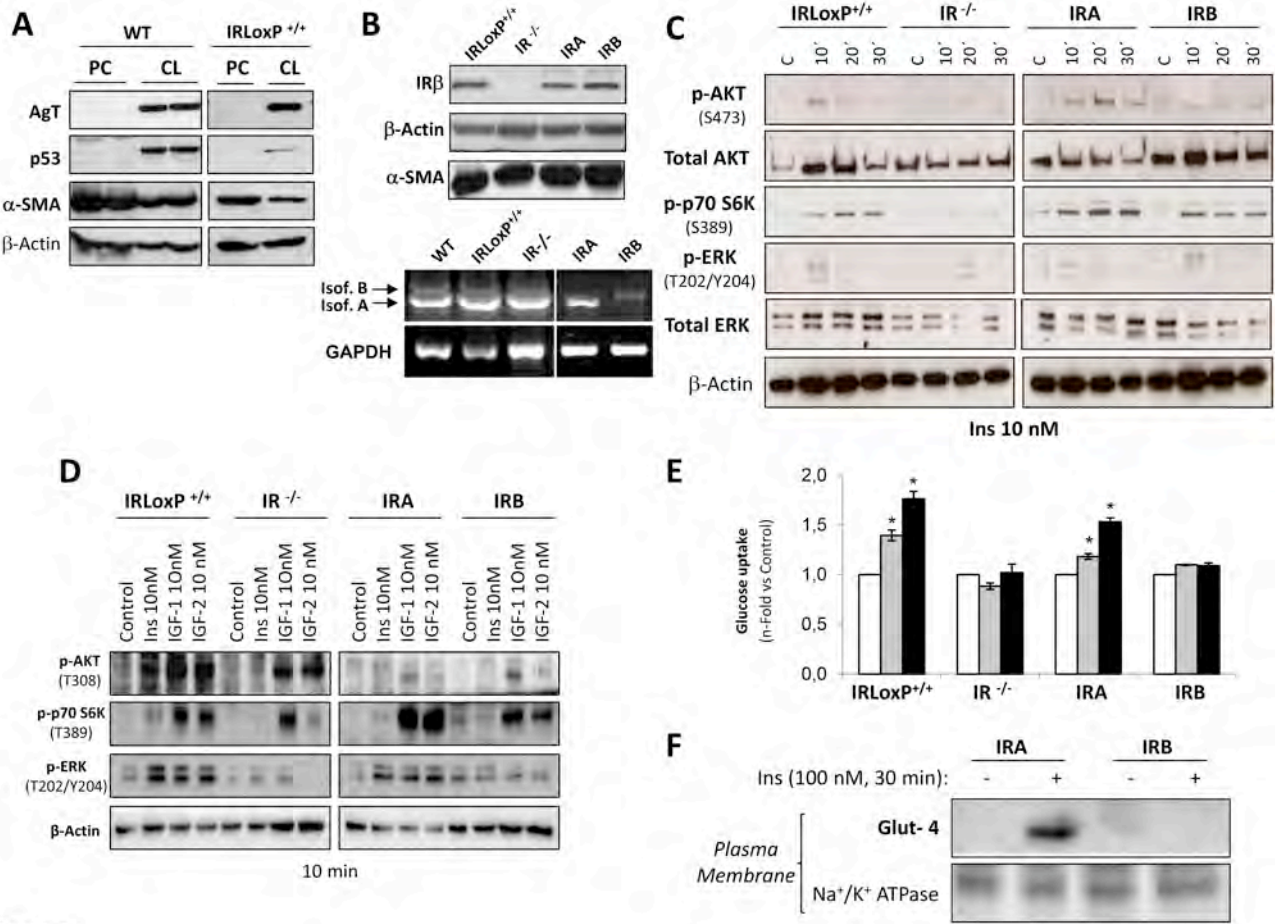
Para estudiar el papel de las isoformas del IR en la proliferación de las VSMCs, se generaron cuatro nuevas líneas celulares aórticas de VSMCs: contienen el IR (WT and IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs), que han perdido el IR (IR<sup>-/-</sup> VSMCs), y que expresan sólo la IRA (IRA VSMCs) o la IRB (IRB VSMCs). En primer lugar, se realizó el cultivo primario de WT o IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs de arterias aortas torácicas. Para comprobar que la inmortalización había funcionado realizamos un Western blot frente al AgT y p53 (Figura 2A). También se utilizó un marcador específico de VSMCs como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) para caracterizar las cuatro líneas (Figure 2B). A continuación, por Western blot frente al IR $\beta$ , comprobamos que la línea celular, IR<sup>-/-</sup> VSMCs carece de IR y niveles muy similares del IR en IRA VSMCs, IRB VSMCs e IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs (Figure 2B). Además comprobamos por RT-PCR que las IRA VSMCs e IRB

VSMCs expresan específicamente la isoforma del IRA o la IRB, respectivamente (Figure 2B).

A continuación comprobamos que las líneas celulares reconstituidas presentan un IR funcional y analizamos la fosforilación en Tyr del IR y de su sustrato más importante en estas células (IRS-1). La insulina indujo la fosforilación en Tyr en todas las líneas celulares exceptuando IR<sup>-/-</sup> VSMCs. Además, analizamos la fosforilación de AKT, p70 y ERK inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2. Como cabía esperar, las IR<sup>-/-</sup> VSMCs respondían a IGF-1 e IGF-2, pero no a insulina, mientras que en las IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs se produjo un aumento significativo de p-AKT, p-p70 y p-ERK inducido por los tres estímulos. Se observó una mayor afinidad y máxima fosforilación de AKT, p70 y ERKs en respuesta a insulina o IGFs en IRA VSMCs versus IRB VSMCs (Figura 2C y D). En este sentido, se ha descrito que la insulina induce una señalización más sostenida en el tiempo en células pancreáticas que sólo expresan la isoforma A con respecto a las que solo

expresan la IRB (19). Por otro lado, se ha descrito que la insulina induce la vía de señalización PI3K/Akt y la translocación de Glut-4 del citosol a la membrana plasmática (23). Por ello, nos planteamos en este trabajo analizar el papel diferencial de las dos isoformas del IR en la captación de glucosa y se observó que la insulina inducía captación de glucosa dosis dependiente en las

IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs e IRA VSMCs (Figura 2E). Y comprobamos que aunque los niveles totales de Glut-4 eran muy similares en todas las líneas celulares estudiadas, la insulina inducía translocación de Glut-4 desde el citosol a la membrana plasmática en IRA VSMCs, pero no en IRB VSMCs (Figura 2F).



**Figura 2**

**Figura 2. Caracterización, señalización de insulina y captación de glucosa de las VSMCs.** (A) Análisis por Western blot de AgT, p53,  $\alpha$ -SMA y  $\beta$ -actina en el cultivo primario y las líneas celulares: WT and IRLoxP<sup>+/+</sup>. (B) (Panel superior) Análisis por Western blot de IR $\beta$  en IRLoxP<sup>+/+</sup>, IR<sup>-/-</sup>, IRA e IRB VSMCs. (Panel inferior) RT-PCR de las isoformas del IR isoforms en todas las líneas celulares estudiadas. (C) Análisis por Western blot de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs en respuesta a insulina 10nM. (D) Análisis comparativo por Western blot de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs en respuesta a insulina, IGF-1 o IGF-2 10nM. (E) Captación de glucosa dependiente de insulina en VSMCs. (F) Análisis por Western blot de Glut-4 en la membrana plasmática y en el citosol de VSMCs estimuladas con 100 nM de insulina durante 30 min. Los experimentos fueron realizados al menos 5 veces. Cultivo primario (PC); línea celular (CL); VSMC con IR (WT and IRLoxP<sup>+/+</sup>); VSMC sin IR (IR<sup>-/-</sup>); VSMC sólo con IRA (IRA); VSMC sólo con IRB (IRB); Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB). \*p<0.05 vs. Control.

A continuación, como en los modelos in vivo habíamos visto que el patrón de expresión de las isoformas del IR o IGF-1R en la arteria aorta de animales control con respecto a los grupos que poseen alteraciones vasculares puede modificarse, pensamos que ciertos estímulos implicados en dichas alteraciones podrían también in vitro modificar la expresión de estos receptores. En este sentido, observamos tanto por qRT-PCR como por Western blot, que la insulina, IGF-2, TNF- $\alpha$  y otros estímulos aterogénicos, como Ang II, ET-1 o el análogo del TXA2 (U46619)

inducen un aumento significativo de la expresión a nivel del mRNA y de los niveles de proteína de la IRA sin modificar la expresión de la IRB en las VSMCs (Figura 3A, B, D y E). Además, tanto el IGF-2 como el TNF- $\alpha$  serían capaces también de aumentar significativamente la expresión y los niveles de proteína del IGF-1R en las VSMCs (Figura 3C y F).

A continuación, evaluamos uno de los principales objetivos del presente trabajo que es el papel de estos receptores en la proliferación de las VSMCs. Para ello,

analizamos el ratio de proliferación por incorporación de BrdU a las 42h y observamos que la insulina indujo una discreta proliferación en WT, IRLoxP<sup>+/+</sup> e IRB VSMCs. No hubo efecto en la proliferación inducida por insulina en las IR<sup>-/-</sup> VSMCs. Sin embargo, la insulina indujo un aumento significativo en las IRA VSMCs dosis dependiente (Figure 4A). Además, observamos que 25 nmol/L IGF-1 indujo un aumento significativo de la proliferación en todas las líneas estudiadas (Figure 4B). Sin embargo, 25 nmol/L IGF-2 indujo un aumento significativo de la proliferación en IR<sup>-/-</sup> e IRA VSMCs, sin modificar el ratio de proliferación en IRLoxP<sup>+/+</sup> and IRB VSMCs (Figure 4C). Asimismo, cuando empleamos otros estímulos aterogénicos que habíamos visto que aumentaban la expresión de la IRA y que previamente se han descrito como inductores de la migración y proliferación en VSMCs (24), inducían el mayor incremento en la ratio de proliferación en las VSMCs que

sólo expresaban la IRA (Figure 4D). En este sentido, se ha descrito que la IRA podría tener una función principal en procesos proliferativos, como en el cáncer y en la hiperplasia pancreática (9, 11-13)

Además de ver in vitro que distintos estímulos podrían modificar el patrón de expresión de las isoformas del IR e IGF-1R y que en todo caso parece que ese aumento de la expresión de la IRA podría conferir una ventaja proliferativa a las VSMCs; queríamos analizar si in vitro se estaba favoreciendo la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R igual que previamente habíamos demostrado in vivo. Así, en ambas líneas celulares hay una asociación basal de IRA o IRB con IGF-1R. Sin embargo, IGF-2 y TNF- $\alpha$  inducía de forma significativa la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en IRA VSMCs con respecto a IRB VSMCs (Figura 4E).

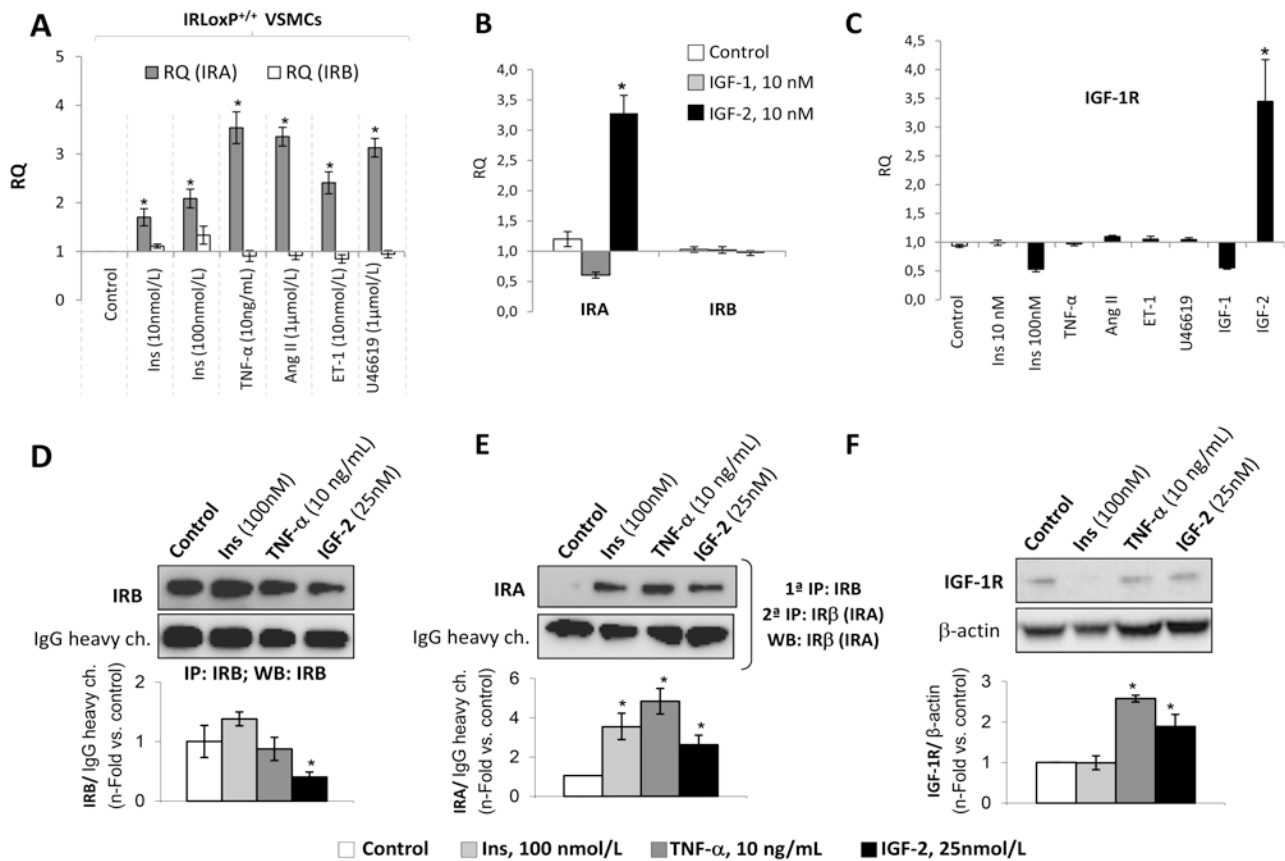
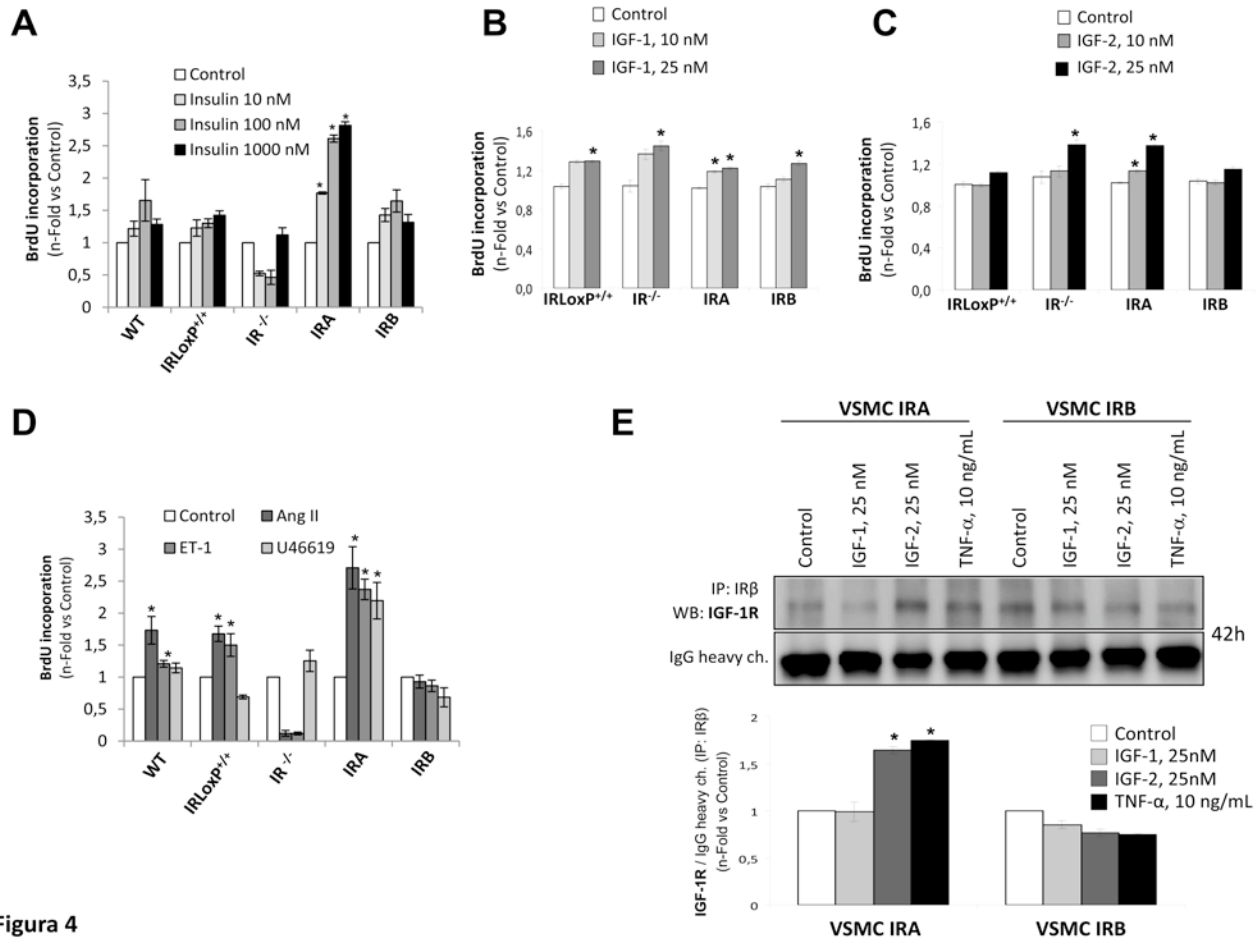


Figura 3

**Figura 3. Efecto de la insulina, IGFs u otros estímulos aterogénicos en el perfil de expresión de ambas isoformas del IR e IGF-1R.** Análisis de los niveles de mRNA por qRT-PCR (A, B y C) o de los niveles de proteína por Western Blot (D, E, F) de la IRA, IRB e IGF-1R en VSMCs estimuladas por insulina, IGF-1, IGF-2, TNF- $\alpha$ , Ang II, ET-1 o U46619. \*p<0,05 vs. cada control.



**Figura 4**

**Figura 4. Estudios de proliferación en VSMCs.** Se determinaron los ratios de proliferación por incorporación de BrdU en VSMCs en respuesta a insulina (10-1000 nM) (A), IGF-1 (10-25nM) (B), IGF.2 (10-25 nM) (C) o a estímulos aterogénicos (Ang II, ET-1 y U46619) (D). Geles representativos y cuantificación de la asociación de IGF-1R con IR en respuesta a IGF-1 (25 nmol/L), IGF-2 (25 nmol/L) y TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) durante 42h en IRA e IRB VSMCs. \*p<0.05 vs. cada Control.

### 3.3. Implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la migración de las VSMCs

La migración de las VSMCs contribuye al desarrollo del proceso aterosclerótico. En este contexto, nos planteamos la necesidad de estudiar el papel de las isoformas del IR en la migración de las VSMCs. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de reparación de herida en VSMCs control y VSMCs estimuladas con insulina, IGFs o TNF- $\alpha$ .

La insulina producía un aumento significativo de la migración de las IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs en comparación con las IR<sup>-/-</sup> VSMCs a las 6 y 12 horas de realizar la herida. Además, inducía un mayor incremento en las tasas de cierre de herida en las células IRA VSMCs respecto a las IRB VSMCs a todas las horas estudiadas (Figura 5). Esto sugiere que la insulina estimula la migración de las VSMCs, principalmente a través de la isoforma IRA y en mucha menor medida a través del IGF-1R. El efecto de la insulina en la migración de las VSMCs ha sido estudiado por distintos autores, con resultados bastante controvertidos dependiendo de la concentración de

insulina. Así, una concentración de insulina (1 mM) no afectaba a la migración de cultivos primarios de VSMCs (25). Por el contrario, un estudio reciente demuestra que el tratamiento con insulina (100 nM) durante 6 días inducía la migración y proliferación de VSMCs humanas (26).

La estimulación con IGF-1 potenciaba en gran medida la migración de las VSMCs, apreciando incrementos significativos en las tasas de cierre de herida en las cuatro líneas celulares estudiadas (Figura 6). Por tanto, este efecto parece estar mediado principalmente por el IGF-1R, ya que se ve completamente anulado en VSMCs que carecen del IGF-1R (dato no mostrado). Así, IGF-1 es un reconocido inductor de la migración de las VSMCs (27, 28). De forma coherente, nuestros resultados sugieren que IGF-1 potencia en gran medida la migración de las IRLoxP<sup>+/+</sup>, IR<sup>-/-</sup>, IRA e IRB VSMCs. Aunque sus efectos están generalmente mediados por el IGF-1R, IGF-1 puede unirse también al IR con menor afinidad. Sin embargo, el incremento de la migración observado en las IR<sup>-/-</sup> VSMCs parece evidenciar que este efecto del IGF-1 está mediado principalmente por el IGF-1R.



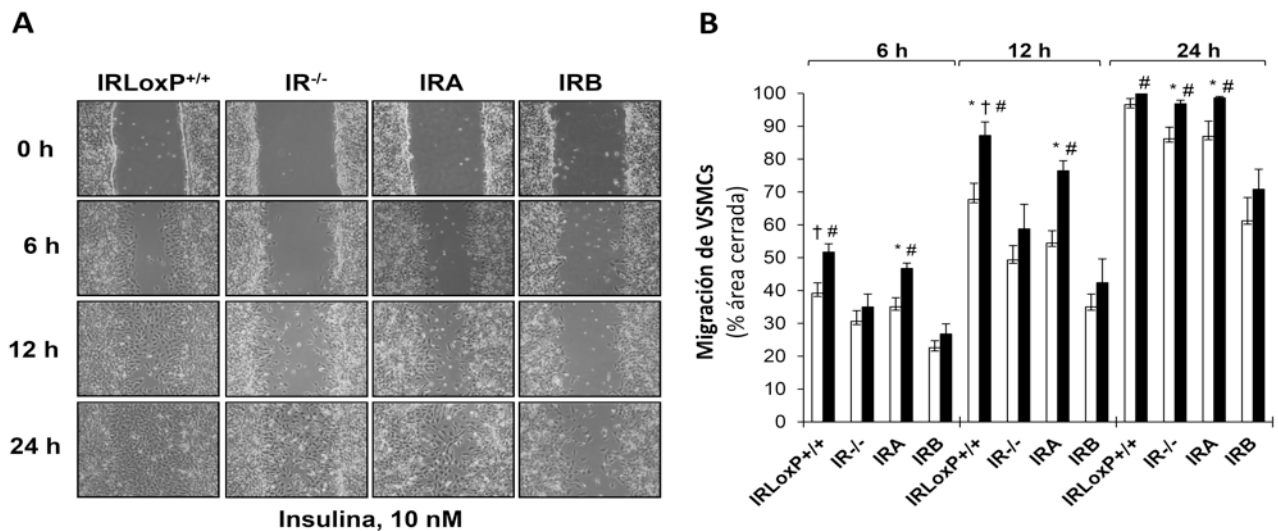


Figura 5

**Figura 5. Efecto de la insulina en la migración de las VSMCs.** (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs, IR<sup>-/-</sup> VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con insulina (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto de la insulina (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. \*p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR<sup>-/-</sup> VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

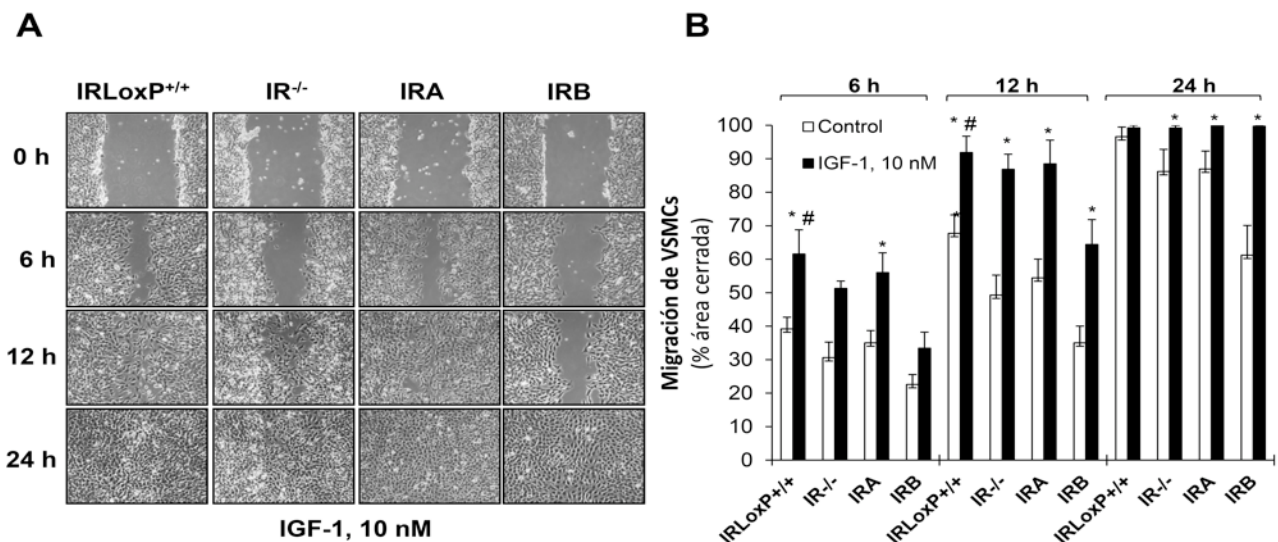


Figura 6

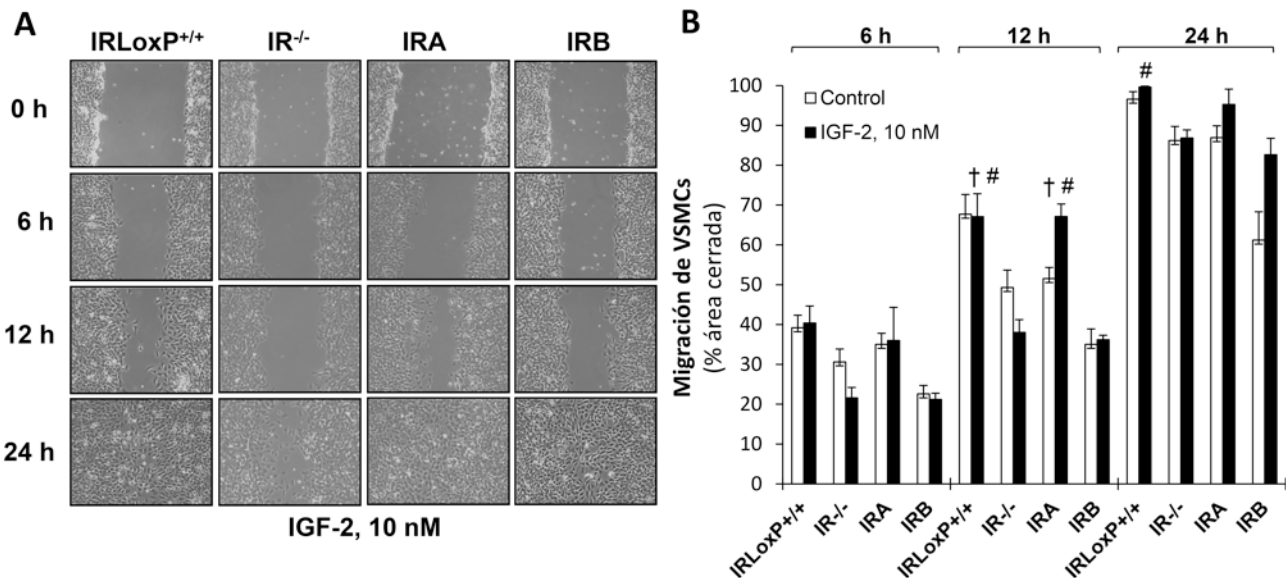
**Figura 6. Efecto del IGF-1 en la migración de las VSMCs.** (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs, IR<sup>-/-</sup> VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con IGF-1 (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto del IGF-1 (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. \*p<0,05 vs. cada control; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

Por el contrario, IGF-2 induce la migración a través de la IRA o la formación de receptores híbridos IRA: IGF-1R (Figura 7). Así, el máximo efecto del IGF-2 en la migración fue el observado en IRA VSMCs a las 12h (16%). Siendo el efecto de IGF-2 en la migración de las VSMCs mucho más discreto, apreciando un incremento significativo de la misma principalmente en las células IRA VSMCs.

Se ha descrito que en fases iniciales de la aterosclerosis, donde cobra especial importancia la migración y proliferación de la VSMCs, hay un aumento significativo de la expresión de IRA y del IGF-1R (29). Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten entender que ese aumento de la expresión de IRA e IGF-1R favorece la proliferación y la migración inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2. Asimismo, parece que la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R, presentes también en la aorta de modelos con aterosclerosis, podría

favorecer la migración de las VSMCs inducida por IGF-2.

El aumento tanto de la migración como de la proliferación de las VSMCs contribuye de forma considerable al desarrollo de una placa aterosclerótica organizada (24). Así, la formación temprana de la neointima puede contribuir al aumento del proceso inflamatorio y trombótico, conduciendo a la aterosclerosis (30, 31). De este modo, un mejor conocimiento y comprensión de los mecanismos moleculares y los cambios celulares asociados al daño vascular, con el fin de determinar si la inhibición del crecimiento y la migración de las VSMCs podría servir como nueva estrategia terapéutica para prevenir el crecimiento de la placa aterosclerótica o las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (32). Así, se ha descrito que los pacientes diabéticos presentan una aterosclerosis acelerada en parte debido a que sus células de músculo liso vascular tienen mayor tasa de proliferación, adhesión y migración (33).



**Figura 7**

**Figura 7. Efecto del IGF-2 en la migración de las VSMCs.** (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP<sup>+/+</sup> VSMCs, IR<sup>-/-</sup> VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con IGF-2 (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto del IGF-2 (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. \*p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR<sup>-/-</sup> VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

### 3.4. Papel del TNF- $\alpha$ en la aterosclerosis temprana

El TNF- $\alpha$  es uno de los estímulos inflamatorios y aterogénicos que se han utilizado en este trabajo y que hemos demostrado que modifica el perfil de expresión de las isoformas del IR, aumentando la expresión y los niveles de proteína de la IRA (Figura 3A). Dicha citoquina proinflamatoria inducía también un aumento significativo

de la expresión de IGF-1R y favorecía la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R. Por incorporación de BrdU, también observamos que el TNF- $\alpha$  inducía un aumento significativo del ratio de proliferación, principalmente en WT e IRA VSMCs (Figura 8A). Además se estudió el papel del TNF- $\alpha$  en la migración de las VSMCs. Se observó un incremento significativo en las

tasas de cierre de herida en las IR<sup>-/-</sup> VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs a las 24 horas (Figura 8B), sugiriendo un efecto más tardío del TNF-α en la migración de las VSMCs en relación con los otros estímulos empleados.

Con el fin de analizar porque el TNF-α inducía más proliferación y migración en las células IRA VSMCs vs IRB VSMCs, se valoró los niveles de proteínas de sus receptores, TNF-R1 y TNF-R2, así como su asociación con las isoformas del IR. En primer lugar, los niveles de

los receptores de TNF-α fueron muy similares en ambas líneas celulares (datos no mostrados). Se observó ya una asociación basal entre la IRA y los receptores de TNF-α mientras que dicha asociación basal no se producía con la isoforma B del IR (Figura 8C). Además, el TNF-α progresivamente aumentaba la asociación basal entre la IRA y TNF-R1 de forma tiempo dependiente. Sin embargo, la unión del TNF-α disminuía la asociación basal entre la IRA y el TNF-R2.

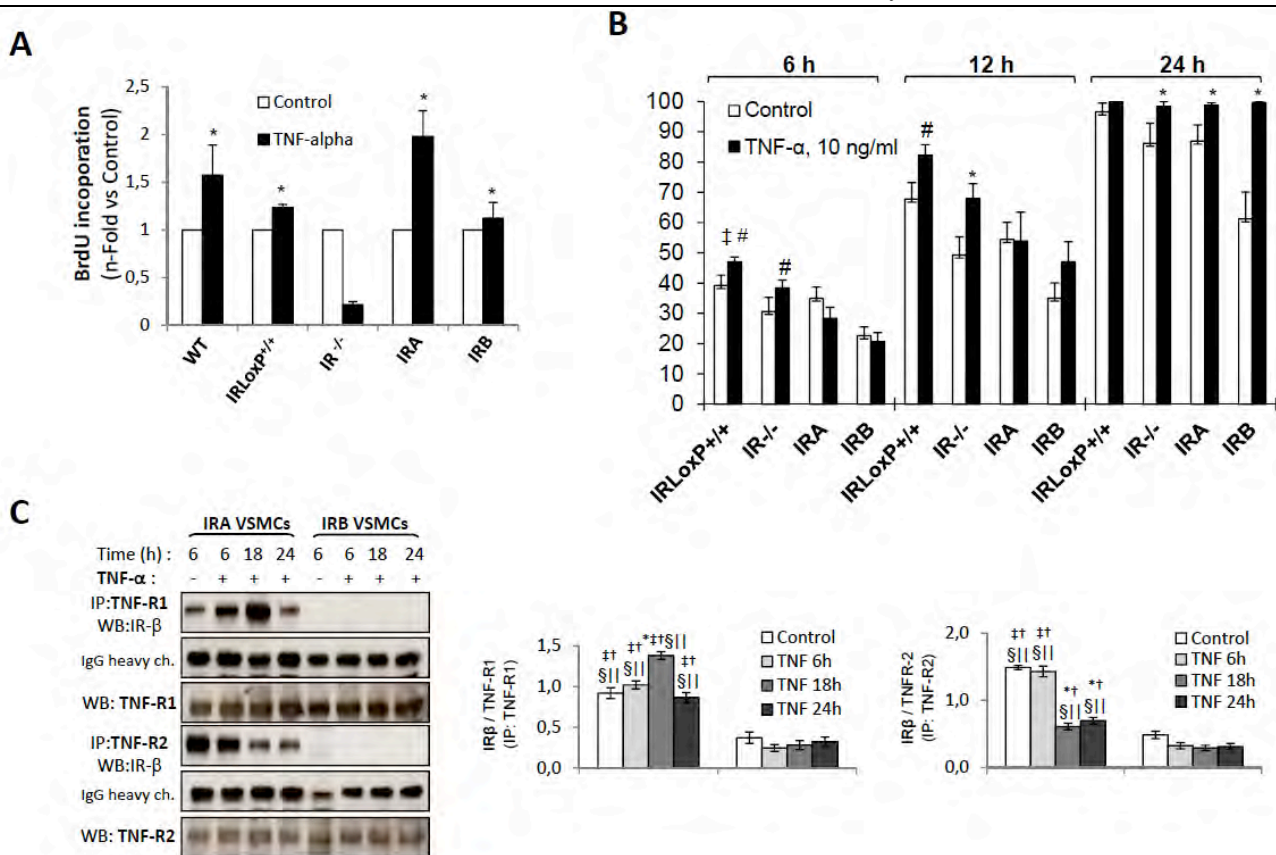


Figura 8

**Figura 8. Efecto del TNF-α en las VSMCs.** Se valoró el efecto del TNF-α en la proliferación por incorporación de BrdU (A) y en la migración (B) de VSMCs. (C) Geles representativos y cuantificación de las asociaciones de los dos isoformas del IR, IRA o IRB, con los receptores de TNF-α, TNF-R1 o TNF-R2. En los experimentos de proliferación: \*p<0,05 vs cada control. En los experimentos de migración: \*p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR<sup>-/-</sup> VSMCs; ‡ p<0,05 vs. IRA VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs. Y en los experimentos de asociación de IR con TNFRs: \*p<0,05 vs. Control (IRA VSMCs); ‡p<0,05 vs. Control (IRB VSMCs); †p<0,05 vs. TNF 6h (IRB VSMCs); §p<0,05 vs. TNF 18h (IRB VSMCs); ||p<0,05 vs. TNF 24h (IRB VSMCs).

Por ello, quisimos determinar si en la aorta de los modelos animales con daño vascular podría haber un aumento de la expresión del receptor de alta afinidad TNF-R1 y una posible asociación con la isoforma A. Así, se observó un aumento significativo de TNF-R1 y de su asociación con la IRA en la aorta del ratón ApoE<sup>-/-</sup> y BATIRKO 52 semanas comparado con sus respectivos controles (Figure 9A y B). En este sentido, estudios previos han descrito que la señalización a través de TNF-R1 en la pared arterial contribuye en las fases tempranas o

de rápido crecimiento, mucho más que en fases más tardías, ya que induce un aumento significativo de la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión así como un aumento en la migración y proliferación de las células de músculo liso vascular (34).

Además, nos planteamos en uno de los modelos empleados, BATIRKO 52 semanas, hacer un tercer grupo que estuvieran tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TNF-α en las últimas seis semanas, ya que en el animal BATIRKO de 52 semanas el aumento concertado en la

secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  por parte de ambos tejidos adiposos, podría ser el responsable de las alteraciones vasculares observadas. Con el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$ , se observó una mejora en la obesidad, en las alteraciones metabólicas y vasculares, una disminución de la expresión de la IRA, TNF-R1 e IGF-1R además de un descenso significativo en la asociación entre la IRA y el TNF-R1 y una menor presencia de receptores híbridos IRA/IGF-1R (Figura 9). Esta disminución de la formación de receptores híbridos inducida por el tratamiento con anti-TNF- $\alpha$  podría mejorar la resistencia a la insulina vascular como previamente habíamos descrito (18).

Finalmente, una mayor presencia de la IRA podría contribuir al proceso aterosclerótico mediando las acciones proaterogénicas de IGF-2. Está bien establecido que la

IRA une IGF-2 con una afinidad muy superior que la IRB (6). Además, los receptores híbridos IRA/IGF-1R están fuertemente activados por IGF-1 e IGF-2 mientras que los otros receptores híbridos IRB/IGF-1R estarían fuertemente activados por IGF-1 y débilmente activados por IGF-2 (11). En nuestro trabajo, hemos descrito *in vitro* que el IGF-2 o el TNF- $\alpha$  son capaces de aumentar la expresión de IRA e IGF-1R y favorecer la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en VSMCs y como estos resultados se confirman *in vivo* en dos modelos experimentales. Hay que destacar que IGF-2 se ha descrito que tiene un papel clave en el crecimiento de la placa aterosclerótica (35) y la mayor presencia de la IRA como ocurre en los modelos descritos favorecería la formación de receptores híbridos con IGF-1R permitiendo la señalización de IGF-2.

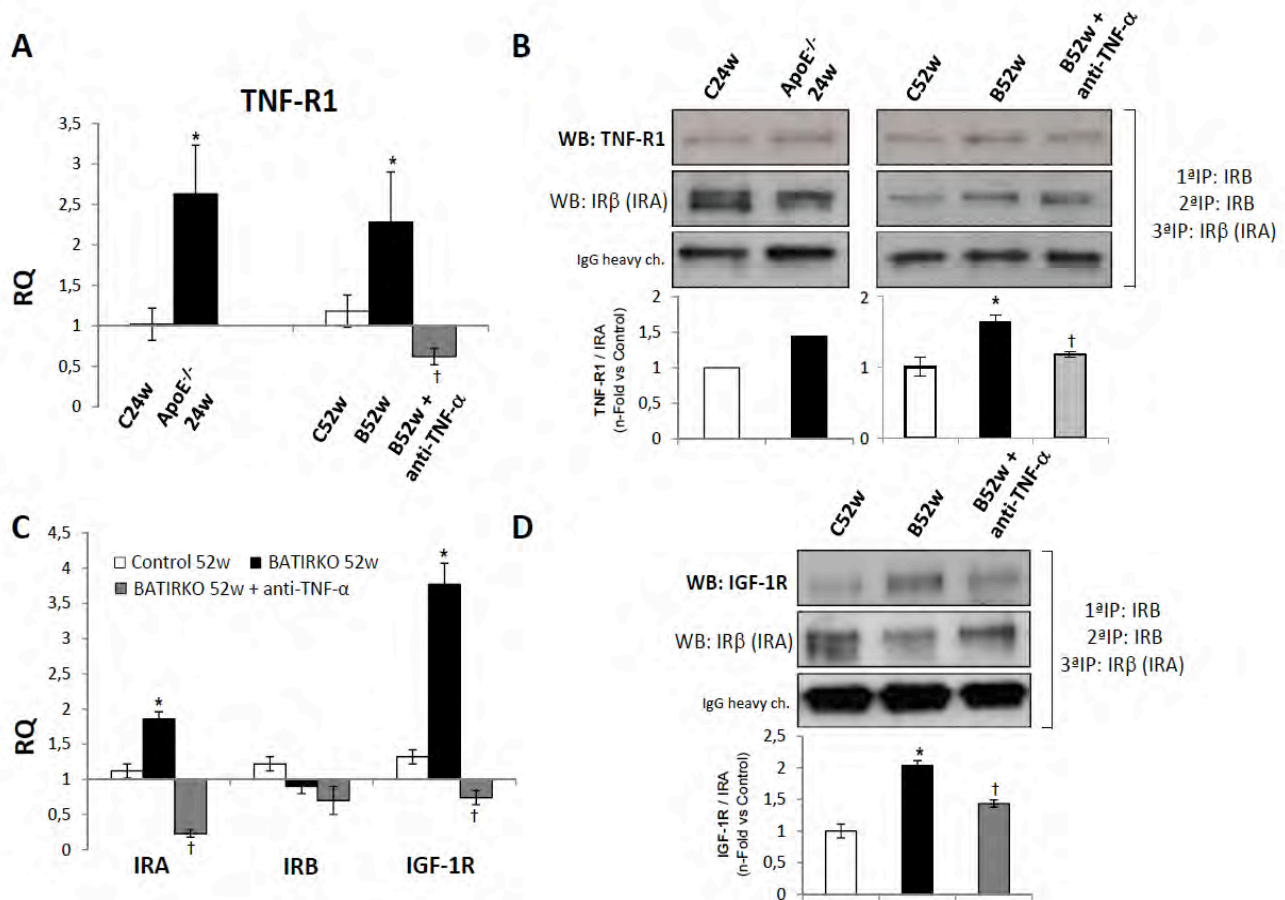


Figura 9

**Figura 9. Expresión de las isoformas del TNF-R1 y sus asociaciones con IRA en dos modelos experimentales de daño vascular. Efecto del anti-TNF- $\alpha$ .** (A) Análisis por qRT-PCR de la expresión de TNF-R1 en la aorta del ratón ApoE<sup>-/-</sup>, BATIRKO y BATIRKO tratado con anti-TNF- $\alpha$  (B). Geles representativos y sus cuantificaciones de las asociaciones de TNF-R1 con IRA en la aorta del ratón ApoE<sup>-/-</sup>, BATIRKO y BATIRKO tratado con anti-TNF- $\alpha$ . Efecto del tratamiento anti-TNF- $\alpha$  en la expresión de IRA, IRB e IGF-1R (C) así como su asociación con la isoforma A del IR en la aorta de los tres grupos del modelo BATIRKO (D). Grupo control de 24 semanas (C24w; n=5); grupo ApoE<sup>-/-</sup> de 24 semanas (ApoE<sup>-/-</sup> 24w; n=5); grupo control de 52 semanas (C52w; n=6); grupo BATIRKO de 52 semanas (B52w; n=5); grupo BATIRKO de 52 semanas tratados con anti-TNF- $\alpha$  (B52w + anti-TNF- $\alpha$ ; n=3). \*p<0.05 vs. cada Control; †p<0.05 vs. grupo BATIRKO de 52 semanas.

#### 4. CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que la isoforma A del receptor de la insulina y la formación de receptores híbridos con TNF-R1 o IGF-1R, confieren una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular, principalmente en respuesta a TNF- $\alpha$  o IGF-2. Además, la migración de las VSMCs inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2, podría estar favorecida por el aumento de la expresión de IRA e IGF-1R. Por ello sugerimos que la IRA confiere a las células de músculo liso vascular una ventaja proliferativa y migratoria en respuesta a distintas señales inflamatorias y siendo claves para el crecimiento de la placa durante las fases iniciales del proceso aterogénico.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos SAF2007/60058, SAF2008/00031 y SAF2011/22555 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) y CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, ISCIII, Spain), Spain. Quería agradecer a Gema García y Silvia Fernández por su asistencia técnica.

#### 6. REFERENCIAS

1. Myers MG Jr, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:615-58.
2. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordán J, Bellacosa A, Tschlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997;11:701-13.
3. Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;15:312-6.
4. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 1989;3:1263-9.
5. Goldstein BJ, Dudley AL. The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 1990;4:235-44.
6. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278-88.
7. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des* 2007;13:671-86.
8. Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:1013-8.
9. Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-Cell

hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 2009;58:820-8.

10. Sciacca L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology* 2003;144:2650-8.
11. Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A, Fujita-Yamaguchi Y, Siddle K, Goldfine ID, Belfiore A. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* 1999;5:1935-44.
12. Sciacca L, Costantino A, Pandini G, Mineo R, Frasca F, Scalia P, Sbraccia P, Goldfine ID, Vigneri R, Belfiore A. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 1999;18:2471-9.
13. Vella V, Sciacca L, Pandini G, Mineo R, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* 2001;54:121-4.
14. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55:131-153.
15. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143-63.
16. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278-88.
17. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 2009;30:586-623.
18. Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano O, Cachofeiro V, Lahera V, Benito M. Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology* 2012;153:1242-55.
19. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:917-22.
20. von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, van Heiningen S, Teeling P, van Berkel TJ, Biessen EA. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 2011;178: 924-34.
21. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. Decreased expression of insulin-like growth factor-I and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1777-89.

22. Engberding N, San Martín A, Martín-Garrido A, Koga M, Pounkova L, Lyons E, Lassègue B, Griendling KK. Insulin-like growth factor-1 receptor expression masks the antiinflammatory and glucose uptake capacity of insulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:408-15.
23. Bartolomé A, Guillén C, Benito M. Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 2010;151:3084-94.
24. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362: 801-9.
25. Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Zhang S. Insulin inhibits migration of vascular smooth muscle cells with inducible nitric oxide synthase. *Hypertension* 2000;35:303-6.
26. Abhijit S, Bhaskaran R, Narayanasamy A, Chakroborty A, Manickam N, Dixit M, Mohan V, Balasubramanyam M. Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2013;373:95-105.
27. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994;93:1266-74.
28. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 2000;86:15-23.
29. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226: 917-22.
30. Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131 Suppl, S3-4.
31. Schwartz SM. The intima: a new soil. *Circ Res* 1999;85:877-9.
32. Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:392-7.
33. Faries PL, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, Logerfo FW. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg* 2001;33:601-7.
34. Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, Orman ES, Brian L, Exum ST, Freedman NJ. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1087-94.
35. Zaina S, Pettersson L, Ahrén B, Brånén L, Hassan AB, Lindholm M, Mattsson R, Thyberg J, Nilsson J. Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 2002;277:4505-11.