



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dra. Ilona I. Concha**  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante  
**Dra. Angara H. Zambrano**  
Instituto de Microbiología  
Facultad de Ciencias

**EFEECTO DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE  
GRANULOCITOS Y MACRÓFAGOS (GM-CSF) EN LA  
DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE TRANSPORTADORES  
FACILITATIVOS DE HEXOSAS: PARTICIPACIÓN DE LA VÍA  
DE SEÑALIZACIÓN DE PI3-QUINASA**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar al  
grado de *Licenciado en  
Bioquímica* y Título Profesional de  
*Bioquímico*

**EVELYN LILIANA JARA FERNÁNDEZ**

**VALDIVIA – CHILE**

**2006**

*Doy gracias a Dios por  
permitir esta etapa en mi  
vida.*

*A mis papitos por su  
dedicación, amor y apoyo*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis primeras palabras de agradecimiento son para la Dra. Ilona Concha, por acogerme en su laboratorio y así llevar a cabo este trabajo de tesis, brindándome un grato ambiente de trabajo. Muchas gracias por su apoyo y por sus consejos. También quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Señalización Celular, con quienes tuve el agrado de compartir durante todo este tiempo, muy especialmente a Maite Castro, Constanza Angulo y Danai Bucher.

También quisiera agradecer a la Dra. Angara Zambrano por todo su apoyo y consejos brindados a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de carrera, gracias por los años compartidos, especialmente a Carlos y Franz.

Gracias a todas las personas del Instituto de Bioquímica que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por DID-UACH 200460 y el proyecto FONDECYT 1060135.

## INDICE DE CONTENIDOS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>1. RESUMEN</b>   | 1             |
| <b>SUMMARY</b>  | 2             |
| <b>2. INTRODUCCION</b>  | 3             |
| <b>3. MATERIALES Y METODOS</b>  | 20            |
| <b>3.1 Materiales</b>   | 20            |
| 3.1.1 Material biológico  | 20            |
| 3.1.2 Reactivos químicos  | 20            |
| <b>3.2 Métodos</b>  | 23            |
| 3.2.1 Cultivo de la línea celular embrionaria humana de riñón<br>HEK293                   | 23            |
| 3.2.2 Cultivo de la línea celular de células de Sertoli inmortalizadas<br>de ratón 42GPA9 | 23            |
| 3.2.3 Inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata                                       | 23            |
| 3.2.4 Inmunofluorescencia doble   | 25            |
| 3.2.5 Extracción de proteínas   | 25            |
| 3.2.6 Separación electroforética de proteínas   | 26            |
| 3.2.7 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF                                      | 27            |
| 3.2.8 Detección inmunológica  | 27            |
| 3.2.9 Efecto del factor estimulador de colonias de granulocito-<br>macrófago (GM-CSF)     | 28            |
| 3.2.10 Efecto del inhibidor LY294002  | 29            |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 3.2.11 Ensayos de transporte  | 29            |
| 3.2.12 Análisis estadístico   | 30            |
| <b>4. RESULTADOS</b>  | <b>31</b>     |
| 4.1 Expresión del receptor para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) en células HEK293                 | 31            |
| 4.2 Análisis de la expresión y función de transportadores de glucosa en células HEK293  | 35            |
| 4.3 Presencia del receptor para GM-CSF y de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3 en riñón de rata               | 41            |
| 4.4 Efecto de GM-CSF sobre el transporte de 3- <i>o</i> -metil-D-glucosa en células HEK293  | 46            |
| 4.5 Efecto de GM-CSF sobre los niveles de expresión de GLUT1 y GLUT3  | 50            |
| 4.6 Efecto de GM-CSF sobre la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3  | 53            |
| 4.7 Participación de PI 3-quinasa en la estimulación del transporte de glucosa inducido por GM-CSF                                    | 57            |
| 4.8 Participación de PI 3-quinasa en la distribución subcelular de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en respuesta a GM-CSF | 59            |
| 4.9 Activación de Akt en células estimuladas por GM-CSF ocurre a través de la vía PI 3-quinasa  | 65            |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 4.10 Expresión del receptor para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) en la línea de células de Sertoli 42GPA9 | 69            |
| 4.11 Análisis de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células de Sertoli 42GPA9                                    | 73            |
| 4.12 Efecto de GM-CSF sobre el transporte de DOG en células de Sertoli 42GPA9   | 76            |
| <b>5. DISCUSION</b>   | <b>78</b>     |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>101</b>    |

## INDICE DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1:</b> Esquema del receptor para GM-CSF   | 6             |
| <b>Figura 2:</b> Vía PI 3-quinasa/Akt. Modelo del mecanismo de activación de Akt/PKB por PI 3-quinasa y PDK1                            | 10            |
| <b>Figura 3:</b> Esquema de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs)  | 16            |
| <b>Figura 4:</b> Análisis de la expresión del receptor para GM-CSF en la línea celular HEK293   | 33            |
| <b>Figura 5:</b> Análisis de la expresión de transportadores de glucosa en células HEK293   | 36            |
| <b>Figura 6:</b> Caracterización del transporte de OMG en células HEK293  | 39            |
| <b>Figura 7:</b> Inmunolocalización del receptor de GM-CSF y de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en cortes de riñón de rata | 44            |
| <b>Figura 8:</b> Efecto de GM-CSF sobre el transporte de OMG en células HEK293  | 47            |
| <b>Figura 9:</b> Efecto tiempo-dependiente de GM-CSF en la incorporación de OMG   | 49            |
| <b>Figura 10:</b> Efecto de GM-CSF sobre la abundancia relativa de GLUT1 y GLUT3  | 51            |
| <b>Figura 11:</b> Efecto de GM-CSF en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3   | 55            |

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 12:</b> Participación de PI 3-quinasa en la estimulación del transporte de OMG inducido por GM-CSF   | 58            |
| <b>Figura 13:</b> Participación de PI 3-quinasa en la redistribución subcelular de GLUT1 inducida por GM-CSF   | 60            |
| <b>Figura 14:</b> Participación de PI 3-quinasa en la distribución subcelular de GLUT3 en respuesta a GM-CSF   | 63            |
| <b>Figura 15:</b> Activación de proteína serina/treonina quinasa Akt en células HEK293 estimuladas con GM-CSF ocurre a través de la vía PI 3-quinasa | 67            |
| <b>Figura 16:</b> Análisis de la expresión del receptor para GM-CSF en la línea de células de Sertoli 42GPA9   | 71            |
| <b>Figura 17:</b> Análisis de la expresión de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células de SERTOLI 42GPA9                                  | 74            |
| <b>Figura 18:</b> Efecto tiempo-dependiente de GM-CSF en la incorporación de DOG en células de Sertoli 42GPA9  | 77            |
| <b>Figura 19:</b> Posible mecanismo por el cual GM-CSF induce un incremento en la captación de glucosa   | 100           |

**LISTA DE ABREVIATURAS:**

|              |  |
|--------------|--|
| BSA          | : Albúmina sérica de bovino  |
| Ci           | : Curie  |
| cpm          | : Cuentas por minuto   |
| DMSO         | : Dimetilsulfóxido   |
| EDTA         | : Acido etilendiaminotetracético   |
| GLUT         | : Transportador facilitativo de hexosa                                     |
| GM-CSF       | : Factor estimulador de colonia granulocito-macrófago                      |
| GM-CSFr      | : Receptor del factor estimulador de colonia granulocito-macrófago         |
| Hepes        | : [N-(2-hidroxietil) piperazina-N`-(2-ácido etansulfónico)]                |
| IL-3         | : Interleuquina 3  |
| IL-5         | : Interleuquina 5  |
| kDa          | : Kilo Dalton  |
| OMG          | : 3- <i>o</i> -metilglucosa  |
| PBS          | : Tampón fosfato salino  |
| PMSF         | : Fenilmetilsulfonil fluoruro  |
| SDS-PAGE     | : Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes |
| TEMED        | : N, N, N', N'- tetrametilendiamina  |
| Tris         | : Tris-(hidroximetil)-aminometano  |
| Triton X-100 | : Octil fenoxi polietoxietanol   |

## 1. RESUMEN

El factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF) es una citoquina pleiotrópica y su función principal es regular la proliferación y diferenciación de células precursoras mieloides así como estimular el funcionamiento de granulocitos y fagocitos mononucleares maduros. En células no hematopoiéticas, GM-CSF puede inducir la proliferación y migración de células endoteliales, proliferación de líneas celulares tumorales, regulación del desarrollo embrionario temprano, y un incremento en el transporte de glucosa y vitamina C. Su receptor es una glicoproteína formada por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , y se expresa en precursores y células mieloides maduras, así como en algunas células no hematopoiéticas.

La expresión del receptor de GM-CSF en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) fue demostrada en este estudio. La adición de GM-CSF señaló un incremento en la captación de glucosa a través de cambios en la redistribución subcelular de los transportadores de hexosas GLUT1 y GLUT3. El efecto inhibitorio de fosfatidilinositol 3-quinasa por LY294002 reveló que esta enzima es requerida para la estimulación del transporte de glucosa y la redistribución de estos transportadores.

Concluimos que GM-CSF está involucrado en la redistribución subcelular de los transportadores de hexosas en una forma dependiente de PI3K/AKT, asegurándose de la administración de un substrato metabólico clave.

## SUMMARY

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a pleiotropic cytokine and its main function is to regulate the proliferation and differentiation of myeloid precursor cells as well as to stimulate the functioning of mature mononuclear granulocytes and phagocytes. In non-hematopoietic cells, GM-CSF can induce proliferation and migration of endothelial cells, proliferation of tumor cell lines, regulation of early embryonic development, and an increased glucose and vitamin C transport. Its receptor is a glycoprotein formed by two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , and it is expressed in precursor and mature myeloid cells, as well as in some non-hematopoietic cells.

The expression of GM-CSF receptor in the human embryonic kidney cell line (HEK 293) was demonstrated in this study. The addition of GM-CSF signaled an increased glucose uptake through changes in the subcellular redistribution of hexose transporters GLUT1 and GLUT3. The inhibitory effect of phosphatidylinositol 3-kinase by LY294002 revealed that this enzyme is required for both GM-CSF stimulation of glucose transport and redistribution of these transporters.

We conclude that GM-CSF is involved in the subcellular redistribution of hexose transporters in a PI3K/AKT-dependent fashion, thus ensuring the supply of key metabolic substrates.

## 2. INTRODUCCION

Las citoquinas constituyen un grupo de moléculas señalizadoras intercelulares de bajo peso molecular, las cuales son liberadas por una gran variedad de tipos celulares controlando eventos importantes como son la supervivencia, crecimiento, diferenciación y función efectora de las células de diferentes tejidos. Estos factores incluyen familias de variadas proteínas reguladoras conocidas como factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas e interferones (Nicola, 1997).

Entre los factores más estudiados por inducir supervivencia en la línea hematopoiética se encuentra el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) conocido también como factor estimulador de colonia 2 (CSF-2), inductor macrófago granulocito-1GM (MGI-1GM), factor estimulador de colonia- $\alpha$  (CSF- $\alpha$ ) y pluripoiética  $\alpha$  (Nicola, 1997). El factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) es una citoquina pleiotrópica que se encuentra involucrada en la proliferación y diferenciación de los precursores de células mieloides y en la estimulación funcional de los granulocitos y fagocitos mononucleares maduros (Gasson, 1991).

GM-CSF tiene un amplio alcance de especificidad hematopoiética con acción sobre neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, progenitores eritroides, progenitores de megacariocitos y células dendríticas presentadoras de antígenos. Estas acciones incluyen prolongación de la supervivencia (inhibición de la apoptosis) de células progenitoras y en el caso de los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos de células maduras, estimulación de la proliferación de las células progenitoras y aumento de la capacidad funcional de células maduras (Nicola, 1997). Otras de las funciones

atribuidas a GM-CSF es la participación en la regulación de la respuesta oxidativa en neutrófilos, estimulando además, la captación de glucosa y vitamina C en células mieloides (Vera *et al.*, 1998).

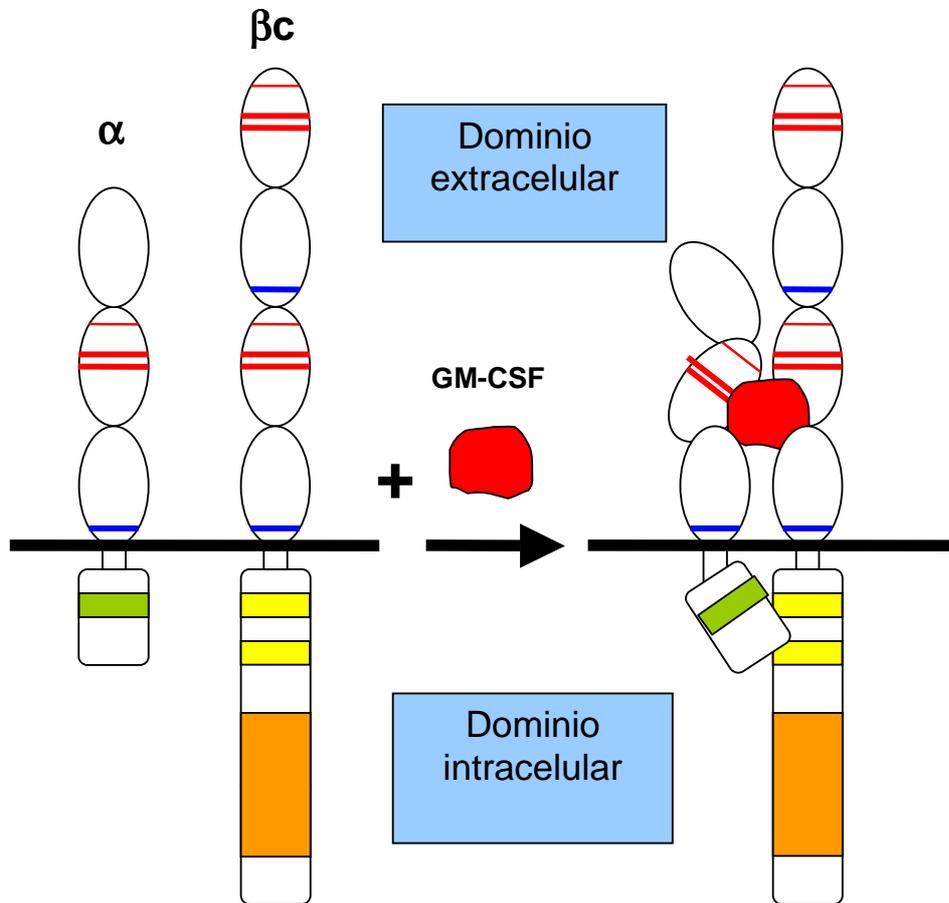
Esta citoquina es secretada como una glicoproteína monomérica de 124 residuos aminoácidos en ratón y 127 en humano. Mientras que el polipéptido sintetizado tiene un peso molecular de 15 kDa, GM-CSF liberado desde su fuente natural tiene un peso molecular que varía de 14 a 30 kDa debido a la presencia de diferentes grados de glicosilación, pues más de la mitad de la molécula está constituida por carbohidratos (Kubota *et al.*, 1990). Estas glicosilaciones, ubicadas en las posiciones 66 y 75 de la secuencia aminoácida en ratón y 27 y 37 en humano, al parecer reducirían la actividad biológica y la afinidad de unión al receptor (Cebon *et al.*, 1990).

En cuanto a su estructura, GM-CSF posee dos pares de  $\alpha$  hélices antiparalelas y dos hebras  $\beta$  antiparalelas entre las hélices  $\alpha$ , adoptando una conformación de ovillo, además contiene dos puentes disulfuros intramoleculares (Cis 54 – Cis 96 y Cis 88 – Cis 21 en humano; Cis 51 – Cis 93 y Cis 85 – Cis 118 en ratón) los que son altamente conservados y esenciales para un correcto plegamiento y actividad biológica (Nicola, 1997).

El mecanismo de acción de las citoquinas es de marcada especificidad ya que ejercen su función a través de receptores celulares altamente específicos que son inducidos o expresados por la célula blanco. Aunque las citoquinas no presentan semejanzas estructurales entre sí, muchos receptores de citoquinas pertenecen a familias con homología en sus dominios extracelulares. Por el contrario, los dominios intracitoplasmáticos de los receptores de citoquinas no son homólogos, situación que

sugiere que en las células existen mecanismos diferentes de transducción de señales en respuesta a la unión de cada una de ellas (Kanakura *et al.*, 1990).

El receptor para GM-CSF (GM-CSFr) ha sido estudiado intensamente en células progenitoras hematopoiéticas en las cuales fue detectado originalmente. Este es un heterodímero que consta de dos subunidades, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  (Hayashida *et al.*, 1990) (Fig. 1). La subunidad  $\alpha$  del receptor humano es producida como un precursor de 400 aminoácidos con una secuencia líder de 22 aminoácidos. Esta cadena  $\alpha$  posee un segmento de transmembrana de 26 aminoácidos, un dominio extracelular de 298 aminoácidos y un corto dominio citoplasmático de 54 aminoácidos. El peso molecular predecible según la secuencia de la proteína es de 44 kDa, pero en geles de SDS-PAGE se observa un peso molecular aparente de 75-85 kDa, debido a las N-glicosilaciones descritas en 11 diferentes sitios (Nicola, 1997). Los 200 aminoácidos proximales por el lado extracelular a la región transmembrana, forman un dominio que presumiblemente une GM-CSF, el cual es homólogo en varios receptores de citoquinas. Este dominio consiste en varios elementos de secuencia cortos conservados, incluidos 4 residuos de cisteínas conservadas y elementos Trp-Ser-X-Trp-Ser (Gearing *et al.*, 1989; Kitamura *et al.*, 1991; Nicola, 1997).



**Figura 1: Esquema del receptor para GM-CSF.** La figura muestra un esquema del receptor para GM-CSF, el cual consta de dos subunidades; la subunidad  $\alpha$ , que es específica para este receptor, y la subunidad  $\beta$ , que es compartida con los receptores para IL-3 e IL-5. La unión del ligando induce cambios en el receptor que permiten su activación. Adaptado de Miyajima *et al.* (1992).

En humanos se han descrito 3 transcritos alternativos del gen de la subunidad  $\alpha$  del receptor para GM-CSF, los cuales ya han sido clonadas:  $\alpha_1$ , con 400 aminoácidos que corresponde a la antes mencionada; subunidad  $\alpha_2$ , de 410 aminoácidos y que difiere de la anterior en que de los 54 aminoácidos del dominio citoplasmático, 25 aminoácidos son reemplazados por 35 aminoácidos ricos en serina y prolina (Crosier *et al.*, 1991); y la subunidad  $\alpha$  soluble que mantiene su capacidad para unir GM-CSF en solución. La expresión diferencial de estas isoformas sobre los diversos tipos de células y estados de diferenciación lleva a la presentación de diferentes respuestas a GM-CSF.

Por otra parte, la subunidad  $\beta$  del receptor consiste en un polipéptido de 897 aminoácidos que contiene un dominio duplicado en el segmento extracelular, motivo común de la familia de receptores de citoquinas (Hayashida *et al.*, 1990), posee una secuencia líder de 116 aminoácidos, una única región transmembrana de 27 aminoácidos y una cola citoplasmática de 359 aminoácidos. El peso molecular de la subunidad  $\beta$  es de 110 kDa y en geles de SDS-PAGE su peso molecular aparente es de 120 kDa, hecho que sugiere una leve glicosilación (Kitamura *et al.*, 1991).

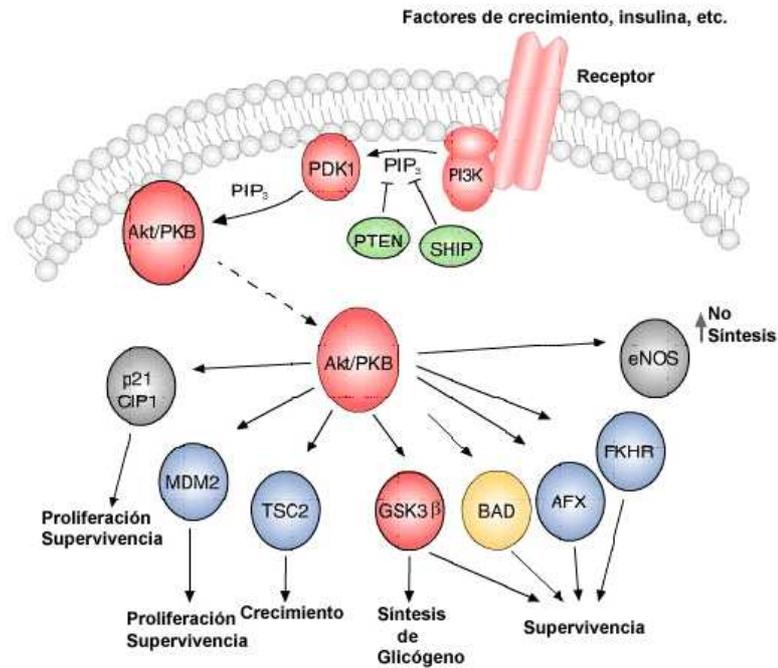
GM-CSF se une con baja afinidad (Kd: 1-7 nmoles/L) a la subunidad  $\alpha$  específica aislada. La subunidad  $\beta$ , que es fosforilable, es incapaz de unir al factor por sí sola, sin embargo, lo hace en complejo con la subunidad  $\alpha$  y forma un receptor de alta afinidad (Kd: 20-250 pmoles/L). La subunidad  $\alpha$  es específica para el receptor de GM-CSF, mientras que la subunidad  $\beta$  es compartida con los receptores de IL-3 e IL-5 (Nicola y Metcalf, 1991), por lo que es denominada subunidad  $\beta$  común ( $\beta_c$ ). Por otro lado, el dominio C-terminal de la subunidad  $\beta$  del receptor (residuos 626 – 763) es responsable

de la fosforilación en tirosina y la activación de las diferentes vías de señalización (Nicola, 1997).

GM-CSF es conocido por activar a lo menos tres vías de transducción de señales: la vía ras/MAP quinasa, la vía JAK/STAT y la vía de PI 3-quinasa, las que no son mutuamente excluyentes, pudiendo superponerse sustancialmente (Guthridge *et al.*, 1998). En todas éstas, específicamente la subunidad  $\beta$  del GM-CSFr es muy importante para la transducción de señales debido a su larga cola citoplasmática. Dado que ni la subunidad  $\alpha$  o la  $\beta$  contienen dominios quinasas en su región citoplasmática (Adachi y Alam, 1998), el receptor actúa por asociación y activación de numerosas tirosinas quinasas citosólicas que se encuentran asociadas físicamente con la subunidad  $\beta$  (Al-Shami y Naccache, 1999; Li *et al.*, 1995).

La activación de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) es una de las respuestas celulares inmediatas a la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo GM-CSF. La fosforilación de fosfoinositoles por PI 3-quinasa genera segundos mensajeros tales como fosfatidilinositol-3,4-bis-fosfato, los cuales regulan la actividad de numerosas quinasas y proteínas del citoesqueleto. PI 3-quinasa es un heterodímero compuesto de dos subunidades: una proteína reguladora de 85 kDa conteniendo dominios SH2 y SH3 (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La subunidad p85 funciona como una molécula adaptadora que se une a la subunidad p110 al activarse los receptores de factores de crecimiento. En la mayoría de los casos, esto es mediado por la unión de dominios SH2 de p85 a motivos consenso pYXXM en receptores de tirosina quinasa activados, como por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Uno de los mejores blancos caracterizados de los productos lipídicos de PI 3-quinasa es la proteína quinasa Akt/PKB (Proteína serina/treonina quinasa) (Fig. 2). Las proteínas de la familia Akt, presentan un dominio quinasa central con especificidad por residuos serina o treonina (Bellacosa *et al.*, 1991; Coffey y Woodgett, 1991). Además, la región amino terminal de Akt incluye un dominio de homología a plecstrina (PH), el cual puede mediar interacciones lípido-proteína y/o proteína-proteína (Data *et al.*, 1995; Mayer *et al.*, 1993). El dominio PH de Akt se une a los intermediarios lipídicos que se han fosforilado previamente por PI 3-quinasa; como consecuencia, Akt se transloca a la cara interna de la membrana plasmática quedando anclada a ella por el dominio PH (Andjelkovic *et al.*, 1997; Currie *et al.*, 1999; Zhang y Vik, 1997). La relocalización de Akt en la membrana plasmática favorece que Akt pueda ser fosforilada por quinasas próximas. Se han identificado cuatro lugares de fosforilación en Akt (Ser-124, Thr-308, Thr-450 y Ser 473). Los residuos Thr-308 y Ser-473 son fosforilados luego del tratamiento con estímulos extracelulares, mientras que Ser-124 y Thr-450 ya se encuentran fosforiladas de forma basal (Alessi *et al.*, 1996). La fosforilación de Akt en estos residuos es necesaria para la actividad de Akt tanto *in vitro* como *in vivo* (Anjelkovic *et al.*, 1996; Bellacosa *et al.*, 1991; Burgering y Coffey, 1995; Coffey y Woodgett, 1991), facilitando de esta manera la supervivencia celular por fosforilación de sustratos que pueden incluir a Bad, Caspasa 9, miembros de la familia Forkhead, la quinasa I $\kappa$ B y la quinasa glicógeno sintasa-3.



**Figure 2: Vía PI 3-quinasa/Akt. Modelo del mecanismo de activación de Akt/PKB por PI 3-quinasa y PDK1.** Tras estímulos extracelulares PI 3-quinasa es activada, produciendo la fosforilación de lípidos de inositol presentes en la membrana. A continuación, el dominio PH de Akt se une a los fosfoinositoles generados por PI 3-quinasa en cercanías de la membrana plasmática, en donde Akt es fosforilada por PDK1. De esta forma, Akt activa, media la fosforilación de diversos substratos involucrados en la regulación de los procesos de supervivencia celular. (PDK1: 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; GSK3β: glycogen synthase kinase-3). Adaptado de Vanhaesebroeck *et al.*, (2000).

Todo lo relacionado a GM-CSF y su receptor ha sido ampliamente estudiado en la línea hematopoiética, por ello, es importante destacar que ambas subunidades del receptor para GM-CSF no sólo son expresadas en células de origen hematopoiético, sino que también son expresadas en varias células no hematopoiéticas, incluyendo células endoteliales, oligodendrocitos en el sistema nervioso central, trofoblastos de placenta (Baldwin *et al.*, 1993; Brosnan *et al.*, 1993; Bussolino *et al.*, 1989; Gearing *et al.*, 1989) y en algunas neoplasias y líneas celulares tumorales (Baldwin *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1991; Metcalf *et al.*, 1990; Rivas *et al.*, 1998). Por otro lado, la citoquina ha sido encontrada en ovario, útero y placenta de murinos, como también en endometrio de bovino (Brannstrom *et al.*, 1994; Crainie *et al.*, 1990; Imakawa *et al.*, 1993; Kanzaki *et al.*, 1991; Robertson y Seamark, 1990). Sin embargo, la importancia biológica de la expresión de estos receptores en células no hematopoiéticas aún no ha sido clarificada. En algunos casos se ha demostrado que induce la migración y proliferación de células endoteliales humanas (Bussolino *et al.*, 1991; Colotta *et al.*, 1993), de líneas celulares tumorales, como sarcoma osteogénico, de líneas celulares de carcinoma y adenocarcinoma. Sin embargo, el papel fisiológico y los mecanismos moleculares implicados en estos roles no se conocen. Nuestro laboratorio ha demostrado la expresión de receptores de GM-CSF en células germinales masculinas (Noli, 1999), así mismo, en estudios posteriores se demostró la presencia y funcionalidad de este receptor en la línea germinal masculina y en espermatozoides de eyaculados humanos y bovinos (Zambrano *et al.*, 2001).

A pesar de ser muy escasos los estudios que describen una posible función de GM-CSF en sistemas no hematopoiéticos, los pocos resultados parecen ser muy

interesantes, evidencias que apuntan por ejemplo, a que GM-CSF podría tener un papel trófico en el sistema nervioso central. Es así como algunos autores mostraron que esta citoquina posee un efecto trófico sobre neuronas colinérgicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kamegai *et al.*, 1990; Tabira *et al.*, 1995), además de tener el mismo efecto sobre neuronas simpáticas (Kannan *et al.*, 2000).

Hoy en día el estudio de citoquinas no está restringido solamente a sistemas hematopoiéticos y son numerosos los trabajos que se enfocan a dilucidar la función y los mecanismos moleculares utilizados por éstas en otros modelos. Es así como se ha demostrado, por ejemplo, que Eritropoietina (Epo), a través de la quinasa Akt (Hirata *et al.*, 2005; Kretz *et al.*, 2005; Siren *et al.*, 2001), previene la muerte neuronal durante eventos isquémicos en el cerebro y en enfermedades neurodegenerativas, presumiblemente a través de sus efectos antiapoptóticos. Se ha demostrado que en ausencia de factores de crecimiento la forma activa de Akt/PKB es capaz de prevenir la apoptosis. Algunos trabajos han sugerido que esta privación resulta en la pérdida de transportadores de superficie de glucosa, así como transportadores de lipoproteínas de baja densidad, aminoácidos y hierro, resultando en una depleción de ATP y metabolitos derivados de glucosa en las células, creando un estado catabólico caracterizado por atrofia y disminución del potencial de membrana mitocondrial. La activación de la quinasa Akt se opone a esto, manteniendo los diferentes transportadores en la superficie celular en ausencia de factores de crecimiento, induciendo un continuo importe de glucosa y aminoácidos (Edinger y Thompson, 2002). Vander-Heiden y colaboradores (2001) demostraron que los factores de crecimiento necesitan mantener el metabolismo de glucosa para promover la supervivencia celular. Es importante

destacar que el limitar la disponibilidad de glucosa restringe la habilidad de los factores de crecimiento para mantener la viabilidad celular y como consecuencia resulta en la muerte de la célula. Se comprobó por ejemplo, que la privación de la citoquina IL-3 en células hematopoiéticas, resulta en una disminución de la captación de glucosa en períodos que preceden a la apoptosis. De esta manera, la mantención de la captación de glucosa parece jugar un papel muy importante en la supresión de la apoptosis (Bentley *et al.*, 2003).

Se ha observado también que el aumento en la captación de glucosa que es capaz de inducir GM-CSF en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan receptores de alta y baja afinidad para GM-CSF es totalmente dependiente de la activación de PI 3-quinasa, sugiriéndose además que la subunidad  $\alpha$  posee sitios de unión a esta quinasa, permitiendo su activación (Dhar-mascareño *et al.*, 2003). En este estudio Dhar-mascareño y colaboradores postulan también que el aumento en la captación de glucosa se debe a una disminución aparente de la  $K_m$  para el sustrato transportado por medio de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs).

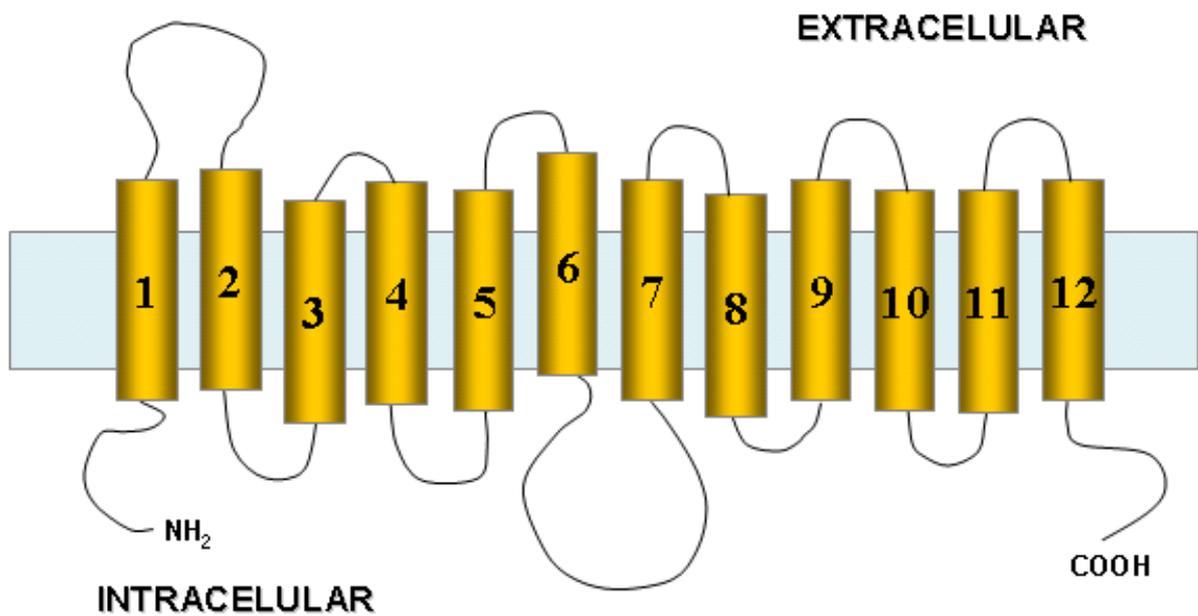
Hace algunos años, algunos autores determinaron el aumento de la incorporación de glucosa en macrófagos producido por factores de crecimiento hematopoiéticos, entre ellos, GM-CSF, demostrándose que el aumento de la captación de glucosa se debe a un efecto sobre los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) (Hamilton *et al.*, 1988). También ha sido descrito que la señalización para el aumento del transporte de glucosa ocurre por un mecanismo independiente de la fosforilación de proteínas y sólo a través de la subunidad  $\alpha$  del receptor (Ding *et al.*, 1994; Spielholz *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha demostrado que GM-CSF es capaz

de producir un aumento en el transporte de azúcares y vitamina C en neutrófilos, monocitos humanos, la línea celular HL-60 e incluso en espermatozoides (Vera *et al.*, 1998; Zambrano *et al.*, 2001; Rauch *et al.*, 2004), todo esto a través de los transportadores facilitativos de hexosas, sin embargo, el mecanismo por el cual se logra este aumento es aún desconocido. En general, el aumento de la captación de nutrientes puede deberse a un aumento de la afinidad de los transportadores (cambios en la  $K_m$ ), aumento en su expresión o bien cambios en la distribución subcelular de éstos.

En mamíferos existen dos sistemas de transporte de glucosa, el cotransportador de sodio y glucosa y los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs). Estos últimos constituyen una familia de proteínas de membrana de 45-55 kDa, de las cuales se han identificado 14 isoformas funcionales, GLUT 1-14 (Doege *et al.*, 2000a; Doege *et al.*, 2000b; Doege *et al.*, 2001; Ibberson *et al.*, 2000; Joost *et al.*, 2002). Los GLUTs son capaces de transportar a través de la membrana plasmática solo los D-enantiómeros de glucosa a favor de un gradiente de concentración, siendo independiente de la presencia de sodio. Este fenómeno se conoce como difusión facilitada o transporte facilitado (Mueckler, 1990; Simpson y Cushman, 1986; Thorens, 1993). Estas proteínas poseen una actividad transportadora multifuncional, mediando la incorporación de glucosa, fructosa, vitamina C y otros compuestos (Angulo *et al.*, 1998; Concha *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1994; Vera., 1993).

Estos transportadores comparten una estructura similar, con una cadena polipeptídica que atraviesa 12 veces la membrana celular y con sus extremos amino y carboxilo terminal localizados intracelularmente (Medina y Owen, 2002; Mueckler *et al.*,

1985) (Fig. 3). Sobre la base de características similares, la familia de transportadores de hexosas (GLUTs) han sido divididos en tres subfamilias, la clase I que agrupa a los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, GLUT3, y GLUT4; clase II, que agrupa a los transportadores de fructosa, entre ellos GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11; y la clase III que agrupa a los transportadores GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y el transportador de myo inositol HMIT1 (Joost y Thorens, 2001). Las diferentes isoformas de estos transportadores pueden expresarse simultáneamente en distintos tejidos y células.



**Figura 3. Esquema de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs).** La figura muestra un esquema de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), los cuales están formados por doce dominios de transmembrana, con sus extremos carboxilo y amino terminal orientados intracelularmente. Adaptado de Jung (1996).

Entre estos transportadores, GLUT3 y GLUT1 parecen estar involucrados en el transporte constitutivo de glucosa, con una Km de 1-2 y de 5-10 mM, respectivamente. Por su parte, GLUT3 se encuentra abundantemente en tejido nervioso en ratón y en varios tipos celulares humanos como placenta, hígado, riñón, corazón, cerebro y tejido muscular adulto (Nagamatsu *et al.*, 1993; Haber *et al.*, 1993), mientras que GLUT1 puede ser encontrado virtualmente en todos los tejidos, principalmente en eritrocitos, tejido fetal, placenta y cerebro (Mueckler *et al.*, 1985; Gould *et al.*, 1991).

Se ha observado por ejemplo, que la translocación de uno de los transportadores de hexosas, GLUT1, desde compartimentos intracelulares a la superficie celular en células hematopoiéticas, sería uno de los mecanismos de supervivencia utilizado por IL-3, miembro de la familia de receptores de GM-CSF. Además, este proceso dependería del citoesqueleto y la activación de PI 3-quinasa (Bentley *et al.*, 2003).

Según los datos aquí expuestos, los factores de crecimiento son capaces de inducir un aumento en la supervivencia celular activando cascadas de señalización intracelular, siendo a la vez capaces de estimular la captación de nutrientes. Sin embargo, no se conoce con exactitud los eventos implicados en el aumento de la captación de nutrientes, o si las vías activadas para la inducción de supervivencia a la vez, podrían participar en el aumento de la captación de éstos. Es muy importante resaltar que hasta la fecha los datos que se tienen sobre la participación de GM-CSF en cuanto a supervivencia y a los mecanismos moleculares inducidos por éste se han reportado en células de origen hematopoiético. Se tienen sólo algunos datos que sugieren fuertemente que GM-CSF tendría un papel similar en otros tejidos que

expresan su receptor, pero nada se conoce acerca de vías de señalización inducidas por GM-CSF en sistemas no hematopoiéticos.

Por ello, teniendo en cuenta que GM-CSF es capaz de inducir supervivencia en células que expresan el receptor correspondiente, conociendo que es capaz de inducir en éstas un aumento en la captación de glucosa y dado los antecedentes en que habría redistribución de transportadores facilitativos de hexosas a la membrana celular, se utilizará como modelo de trabajo la línea celular HEK293, derivada de células embrionarias humanas de riñón, la cual fue escogida por ser una línea de origen no hematopoiético, que según antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio, expresa ambas subunidades para el receptor de GM-CSF y que además posee transportadores de glucosa funcionales. De esta manera, contando con un modelo de trabajo apropiado, se propone la siguiente hipótesis de trabajo: **“GM-CSF es capaz de inducir un aumento en la captación de glucosa mediante la redistribución de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), participando en este evento la vía de supervivencia celular PI 3-quinasa en células HEK293”**.

Por lo tanto, los objetivos específicos de la presente tesis son:

**1.- Demostrar la presencia y localización del receptor de GM-CSF y de los transportadores facilitativos de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células HEK 293.**

**2.- Estudiar la redistribución y abundancia relativa de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3.**

**3.- Estudiar el efecto de GM-CSF sobre el transporte de hexosas en este modelo.**

**4.- Estudiar la participación de la vía PI 3-quinasa en el aumento de la captación de glucosa y en la redistribución de los transportadores facilitativos de hexosas.**

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Material biológico

La línea celular HEK293 derivada de riñón embrionario humano se obtuvo de ATCC® código CRL-1573™, mientras que la línea celular de Sertoli 42GPA9 derivadas de ratón, fue obtenida desde el Grupo de Estudio de Comunicaciones Celulares, Histología-Embriología del Doctor Dominique Segretain de la Universidad de París.

##### 3.1.2 Reactivos químicos

De **Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)** se obtuvieron los siguientes reactivos: 2-mercaptoetanol, glicina, azul de Coomassie G-250, Tritón X-100, poli-L-lisina (peso molecular > 350 kDa), albúmina de suero de bovino (BSA), Tween 20, desoxicolato de sodio, NP-40, dodecil sulfato de sodio (SDS), cloruro mercúrico, Hepes, leupeptina, aprotinina, pepstatina A, pironina Y, Histochoice (fijador de tejido), cloruro de calcio, bicarbonato de sodio, sulfato de magnesio, EDTA, ioduro de propidio, 3-o-metil-D-glucosa (OMG).

De **Merck & Co, Inc. (Darmstadt, Germany)**, fueron adquiridos los siguientes reactivos: ácido clorhídrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato dihidrógeno de potasio, Tris, glicerol, PMSF, metanol y etanol.

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)** fueron utilizados: acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amonio, tripsina-EDTA, L-glutamina, penicilina/estreptomicina, fungizona y TEMED.

De **United Status Biological (Swampscott, MA, USA)** se obtuvo medio Dulbelcco's Eagle modificado enriquecido con F-12 (DMEM-F12) y de **Hyclone (Logan, UT, USA)**, suero bovino fetal (FBS).

De **Santa Cruz Biotechnology**, se obtuvieron los anticuerpos que son IgG de conejo policlonales, dirigidos al extremo carboxilo terminal de las subunidades  $\alpha$  (C-18) y  $\beta$  (C-20) del receptor del factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago, ambos a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . El anticuerpo anti-GLUT3 fue obtenido de **East-Acres Biologicals Inc.**, mientras que el anticuerpo para la detección de GLUT1 fue obtenido de **Alpha Diagnostics International, Inc. (San Antonio, TX, USA)**.

De **Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)** fueron adquiridos los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón y anti-IgG de cabra, mientras que de **Molecular Probes (Eugene, OR, USA)**, se adquirió anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488 (verde).

De **DAKO (Carpintería, CA, USA)**, se adquirió el medio de montaje para fluorescencia y Quick Staining Kit<sup>®</sup> HRP, peroxidasa policlona.

De **Perkin Elmer (Boston, MA, USA)** se usaron membranas de PVDF, de **Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA)** se obtuvo ECL Western blotting, y el material fotográfico utilizado fue adquirido de **Kodak**.

El radioisótopo D-3-O-[metil-<sup>3</sup>H] glucosa (<sup>3</sup>H-OMG, 10 Ci/mmol) fue obtenido de **Dupont NEN (Boston, MA, USA)**, mientras que el líquido de centelleo biodegradable para cuentas solubles y no solubles Ecoscint, fue obtenido de **National Diagnostics (Atlanta, GA, USA)**.

Finalmente, los equipos utilizados fueron los siguientes: centrífuga Eppendorf 5417-R, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company, agitador magnético IKAMAG<sup>®</sup> RCT, espectrofotómetro Shimadzu UV-120-12, contador de centelleo líquido Packard tri-Carb 1600TR, pHmetro Radiometer Copenhagen PHM 83 Autocal, cámara de Neubauer, balanza precisa 180<sup>a</sup>, sistema de electroforesis y transferencia Mini Protean<sup>®</sup> III y Mini Trans Blot de BIO RAD, bomba de vacío GAST<sup>®</sup> modelo DOA-P104-AA, microscopio de marca ZEISS modelo Axioskop 2 acoplado a una cámara digital Nikon DXM1200, microscopio confocal invertido OLYMPUS FV 1000, microscopio invertido NOVA modelo IN833, Freezer a -20°C M&S 280 Consul, Freezer a -70°C Forma Scientific Bio-freezer 8425, refrigerador Fensa, incubadora Nuaire<sup>™</sup>, cámara de flujo laminar Nuaire<sup>™</sup> Class II.

## **3.2 METODOS**

### **3.2.1 Cultivo de la línea celular embrionaria humana de riñón HEK293**

Se realizaron cultivos de la línea celular embrionaria humana de riñón HEK293, las que crecieron y se mantuvieron en medio Dulbecco's Eagle modificado enriquecido con F-12 (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C y en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **3.2.2 Cultivo de la línea celular de células de Sertoli inmortalizadas de ratón 42GPA9**

Las células 42GPA9 fueron cultivadas en DMEM conteniendo suero bovino fetal 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 mg/ml a 34°C y CO<sub>2</sub> 5% (Xing y Sairam, 2001).

### **3.2.3 Inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata**

La localización de diferentes proteínas fue analizada por estudios de inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata incluidos en parafina. Se procedió a desparafinar los portaobjetos mediante la incubación de los cortes de tejido en xilol por 3 minutos (2 veces), en etanol absoluto por 3 minutos (2 veces), por inmersión en solución de etanol al 95% por 3 minutos (2 veces), y finalmente en H<sub>2</sub>O destilada por 3 minutos (2 veces). Posteriormente, los cortes fueron tratados con citrato de sodio (10 mM [pH 6,0]) y sometidos a máxima potencia del microondas por 1 minuto y luego a 10% de potencia por 10 minutos. Los cortes se dejaron en la solución de citrato de

sodio a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, se eliminó el exceso de la solución nitrada y se lavó con H<sub>2</sub>O destilada. La peroxidasa endógena del tejido fue inactivada por la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 5 minutos a temperatura ambiente, con un posterior lavado con H<sub>2</sub>O destilada y otro con PBS 1X. Posteriormente, los cortes fueron bloqueados por 1 hora a 37°C con solución de PBS 1X conteniendo 1% BSA, 5% leche descremada y 0,3% Tritón X-100. Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios. Los anticuerpos fueron diluidos a 1:100 en solución de PBS 1X conteniendo 1% BSA, 5% leche descremada y 0,3% Tritón X-100. La incubación del segundo anticuerpo y el revelado fue realizado por la utilización del sistema DAKO<sup>®</sup> Quick Staining Kit HRP. Esta técnica se basa en que las muestras después de ser incubadas con el primer anticuerpo son tratadas con una solución que contiene IgG de conejo/ratón/cabra biotinilados para luego ser incubadas con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa. La reacción se completa al incubar la muestra con un sustrato cromógeno, desarrollándose la reacción de color usando 3, 3'- diaminobencidina (DAB) dando como resultado un precipitado café insoluble en el sitio de unión antígeno-anticuerpo. Finalmente se procedió a la deshidratación de los cortes utilizando etanol al 80 y 100%, se incubó 1 minuto en cada solución. Luego los cortes se incubaron en xilol por 5 minutos (2 veces), y finalmente se montaron usando Citoseal<sup>™</sup> y cubreobjetos, para ser observados en un microscopio óptico Zeiss acoplado a una cámara digital Nikon DXM1200. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop 6.0. Previo al proceso de deshidratación, los núcleos celulares fueron teñidos con hematoxilina.

### **3.2.4 Inmunofluorescencia doble**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, previamente cubiertos con poli-L-lisina. Las preparaciones fueron fijadas con Histochoice:etanol, en una proporción de 4:1, previo lavado con PBS 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 al 0,3% en PBS 0,1 M, de manera de facilitar el acceso a antígenos intracelulares. Los preparados celulares fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (1% BSA y 5% de leche descremada en PBS 0,1 M). En esta misma solución fueron incubadas las muestras con los anticuerpos primarios en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpos secundarios se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488, en una dilución de 1:300 en solución de bloqueo. En todos los casos, los núcleos fueron teñidos utilizando ioduro de propidio a una concentración de 1,7 µg/ml. Las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia DAKO y visualizadas utilizando un microscopio confocal invertido (García *et al.*, 2005).

### **3.2.5 Extracción de proteínas**

Las células en cultivo, previamente lavadas con PBS 0,1 M (pH 7,4), fueron despegadas de las placas de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0,25% (p/v). El sedimento celular fue resuspendido y homogenizado en 100 µl de tampón A (sacarosa 300 mM, DTT 3 mM, PMSF 100 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, pestatina A 1 µg/ml, leucepeptina 2 µg/ml y EDTA 1 mM, pH 7,4). Luego de aproximadamente 1 hora de reposo de los homogenizados, siempre mantenidos a 4°C, éstos fueron centrifugados a 14,000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue rescatado y cuantificado mediante el

método de *Bradford*. Estos extractos proteicos fueron utilizados para realizar ensayos de *Western blot*.

### 3.2.6 Separación electroforética de proteínas

Se realizaron las separaciones electroforéticas de las proteínas extraídas en geles de poliacrilamida al 15%, en el sistema *Mini Protean*<sup>®</sup> III de la compañía BIO RAD. El gel separador y el espaciador se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8%. El gel separador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 15% conteniendo 375 mM Tris [pH 8,8]; 0,1% SDS, 0,04% persulfato de amonio y 0,03% TEMED. Mientras que el gel espaciador se preparó con una concentración final de poliacrilamida de 3,8% incluyendo 125 mM Tris [pH 6,8], 0,1% SDS, 0,01% persulfato de amonio y 0,04% TEMED. Se tomaron muestras de proteínas de 50 µg y se les agregó tampón muestra (500 mM Tris [pH 6,8], 10% SDS, 0,7 M 2-mercaptoetanol, 20% glicerol y 0,8 mg/ml de pironina) a cada una. Las muestras fueron colocadas en el gel realizándose la electroforesis a 30 mA por 2 horas en tampón 25 mM Tris [pH 8,3], 190 mM glicina y 0,1% SDS. Para determinar la distribución de las proteínas en el gel, se colocó en una solución de fijación (25% isopropanol y 10% ácido acético) por 1 hora, y posteriormente se tiñó con una solución de azul de Coomassie (30% metanol y 10% ácido acético) por tres horas. Finalmente el gel fue desteñido en una solución conteniendo 30% de metanol y 10% de ácido acético. En el caso de realizar análisis de *Western blot* el gel fue transferido a una membrana de PVDF.

### 3.2.7 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno; 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, 100-145  $\mu\text{m}$  de espesor), según lo descrito por Tsang y colaboradores (1983), modificado por Rauch *et al.*, (2004). Para ello, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (25 mM Tris [pH 8,3], 190 mM glicina, 0,1% SDS y 20% de metanol) se depositó secuencialmente: dos trozos de papel Whatman nº 1, la membrana de PVDF, el gel a transferir y dos papeles filtros más. Luego se cubrió con otra esponja embebida en la misma solución. Esto se colocó en una cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón mencionado y se aplicó una intensidad de corriente de 30 mA por 14 horas o 100 mA por 4 horas. Una vez cumplido el tiempo, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente. Para verificar el buen resultado de la transferencia, el gel se tiñó según lo descrito en el punto anterior.

### 3.2.8 Detección inmunológica

Para los análisis de *Western blot* las membranas se incubaron con 10 ml de solución de bloqueo PBS-Tween 20 (PBS 1X: 15 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [pH 7,4], 150 mM NaCl, 0,3% Tween-20, 1% BSA y 5% leche descremada) a temperatura ambiente por una hora. Luego se incubaron las membranas con 5 ml de una solución conteniendo los anticuerpos primarios de interés; anti-GM-CSFr $\alpha$ , anti-GM-CSFr $\beta$ , anti-tubulina, anti-GLUT1, anti-GLUT3 y anticuerpo contra Akt fosforilada en Ser<sub>473</sub>. Todos los anticuerpos fueron diluidos entre 1:500 – 1:1000 en la solución de bloqueo e incubados toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, las

membranas se lavaron tres veces en PBS-Tween-20 (0,3% Tween-20 en PBS 1X) a temperatura ambiente por 15 minutos cada una. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas con 5 ml de una solución de anti-IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa, diluida 1:5000 y 1:1000 respectivamente, en solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 por 10 minutos cada una. El revelado del conjugado se realizó utilizando un método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham), el cual se basa en la emisión de luz no radioactiva detectando antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con peroxidasa. El resultado se obtiene mezclando partes iguales de dos reactivos, obteniéndose una solución de peróxido de hidrógeno y luminol que se vierte sobre las membranas, dejándose actuar por 1 minuto y secando el exceso con papel filtro, para exponer en un film el resultado de la excitación del luminol. Finalmente, se detiene la reacción al retirar la película de la membrana y se revela con reactivo D<sub>72</sub> y se fija con reactivo U<sub>3</sub>. Los film se digitalizaron y se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa Image J, los datos fueron normalizados con la densitometría de las bandas del *immunoblot* de tubulina y graficados en base a unidades arbitrarias y como porcentaje del control.

### **3.2.9 Efecto del factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF)**

Para estudiar los efectos de GM-CSF sobre la línea celular HEK293, las células destinadas a análisis de *Western blot*, inmunofluorescencia y ensayos de transporte fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación (Hepes 15 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM, pH 7,4, 320 mOsm),

previo al tratamiento con la citoquina. Zambrano *et al.*, (2001) mostraron que la captación de DOG se estimulaba a una concentración de GM-CSF de 6,6 nM en espermatozoides de toro. Por esta razón se optó por utilizar esta concentración.

### **3.2.10 Efecto del inhibidor LY294002**

Para determinar la participación de la vía de transducción de señal PI 3-quinasa/Akt, las células fueron tratadas con un inhibidor específico para esta vía, 30 minutos antes de agregar GM-CSF. El inhibidor utilizado fue LY294002, a una concentración final de 10  $\mu$ M (Bentley *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2000).

### **3.2.11 Ensayos de transporte**

Para los ensayos de transporte, las células fueron crecidas en placas de 12 pocillos. Previo a cada experimento, se analizaron cuidadosamente los cultivos celulares bajo el microscopio, de modo de asegurar que sólo aquellos pocillos con densidad celular uniforme fueran usados. Además, se despegaron las células provenientes de 3 pocillos, los cuales fueron cuantificados utilizando una cámara de Neubauer con el fin de estimar el número promedio de células totales en cada pocillo. Los ensayos de incorporación con radioisótopos se realizaron según lo descrito por Castro *et al.* (2005). Las células fueron lavadas con tampón de incubación (Hepes 15 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM, pH 7,4, 320 mOsm) e incubadas en esta misma solución durante 30 minutos a 37°C para permitir el equilibrio entre los espacios extra e intracelular. Luego de este período, se realizaron los ensayos de captación en 500  $\mu$ l de tampón de incubación que contenía 1-1,2  $\mu$ Ci de D-3-O-

[metil-<sup>3</sup>H] glucosa (<sup>3</sup>H-OMG). La reacción fue detenida con tampón de incubación frío que contenía HgCl<sub>2</sub> 0,2 mM, seguido de 3 lavados con la misma solución. Luego, las células fueron tratadas con 200 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, SDS 0,2%) y la radioactividad incorporada medida por centelleo líquido (Astuya *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2001).

La determinación de parámetros cinéticos fue realizada por regresión no lineal a una hipérbola simple rectangular de los datos obtenidos en cada curva de saturación y para determinar la presencia de uno o más componentes se realizó el análisis de Eadie-Hofstee (Fhurmann y Volker, 1993). Para los ensayos de estimulación con GM-CSF, las células fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación, previo al tratamiento con la citoquina. Para el caso de los ensayos de inhibición, las células fueron preincubadas a 37°C durante 30 minutos con LY294002, antes de realizar el tratamiento con GM-CSF.

### **3.2.12 Análisis estadístico**

Los datos de todas las gráficas fueron presentados como promedio ± desviación estándar. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba t-student o por análisis de variancia utilizando el programa GraphPad Prism 4.0. Para los análisis de regresión hiperbólica, ajustes a curvas exponenciales y regresión lineal se utilizó el programa Sigma Plot 9.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Expresión del receptor para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) en células HEK293

Las líneas celulares son una de las herramientas más ampliamente utilizadas para la investigación en biología celular, ya que tienen como ventaja una gran capacidad proliferativa en comparación con las células normales.

La línea HEK293, es una línea celular derivada de tejido renal humano en edad fetal. Estas células poseen morfología de células epiteliales y fueron inmortalizadas utilizando un adenovirus siendo usadas normalmente en el laboratorio para la realización de estudios funcionales que se relacionan a la expresión de proteínas y quimeras. En esta tesis, se utilizó esta línea celular como un representante de células no hematopoiéticas.

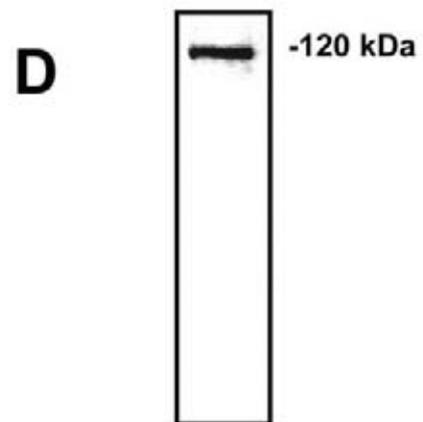
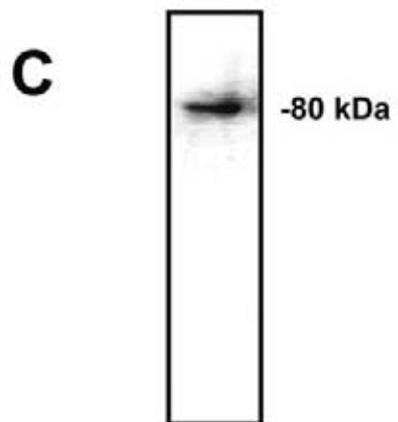
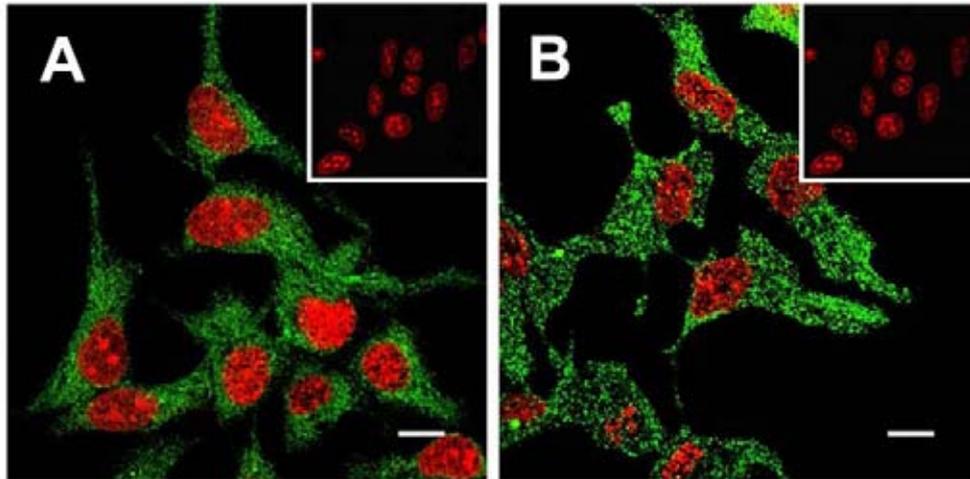
Según antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio (Datos aún no publicados), la línea celular HEK293 expresaría el receptor para GM-CSF. Es por ello que para comprobar este hecho, se realizó un análisis de inmunofluorescencia para determinar la existencia de las proteínas correspondientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para GM-CSF, para lo cual se utilizaron los anticuerpos anti-GM-CSFr $\alpha$  y anti-GM-CSFr $\beta$  descritos en materiales y métodos. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488. La inmunofluorescencia para GM-CSFr $\alpha$  y GM-CSFr $\beta$  (**Figura 4, panel A y B**), evidenció que estas proteínas son expresadas en las células HEK293. Se pudo observar que para la subunidad  $\alpha$  del receptor de GM-

CSF, las células presentan un gran patrón inmunorreactivo positivo en la región intracitoplasmática, mientras que a nivel de la membrana plasmática es muy poca la cantidad de esta proteína que puede ser observada (**Figura 4, panel A**). Por su parte, la subunidad  $\beta$  de este receptor (**Figura 4, panel B**) presenta un patrón inmunorreactivo positivo localizado en zonas muy similares a las detectadas en el caso de la subunidad  $\alpha$ , presentando un patrón de reacción punteado, sugiriendo que esta proteína podría encontrarse contenida al interior de vesículas intracitoplasmáticas.

Como control negativo se utilizó solución de bloqueo sin primer anticuerpo, no observándose inmunorreacción positiva en las células.

A continuación se confirmó la presencia del receptor en esta línea celular por análisis de *Western blot*. Para ello, extractos proteicos totales provenientes de células en cultivo, fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalantes y posteriormente electrotransferidas a membranas de PVDF para el análisis de inmunodetección. La **Figura 4, panel C y D**, muestra la inmunodetección de la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ , respectivamente, del receptor para GM-CSF. La masa molecular aparente para la subunidad  $\alpha$  fue de 80 kDa y para la subunidad  $\beta$  fue de 110 kDa, lo que concuerda con lo descrito para otros tipos celulares en la literatura.

**Figura 4. Análisis de la expresión del receptor para GM-CSF en la línea celular HEK293. A, B.** Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-GM-CSFr $\alpha$  (A, verde) y anti-GM-CSRr $\beta$  (B, verde). El control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (inserto). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m. **C, D.** Western blot para detectar GM-CSFr $\alpha$  (C) y GM-CSRr $\beta$  (D) a partir de extractos totales de células HEK293.



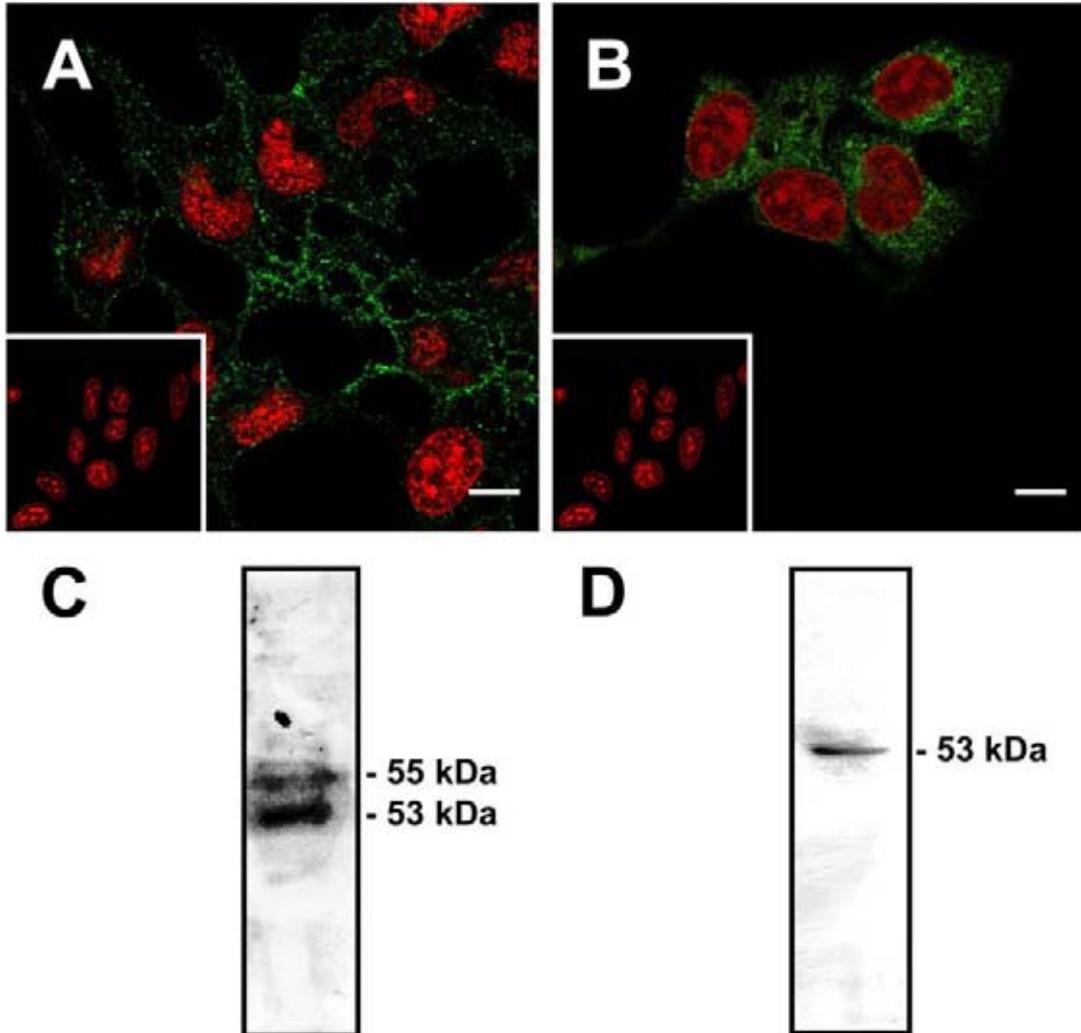
#### **4.2 Análisis de la expresión y función de transportadores de glucosa en células HEK293**

En tejido renal se ha descrito la expresión de varias isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas, entre los que se encuentran GLUT1 (Vestri *et al.*, 2001), GLUT2 (Marks *et al.*, 2003; Vestri *et al.*, 2001), GLUT9 (Augustin *et al.*, 2004; Joost y Thorens, 2001) y se han detectado bajos niveles del mensajero relacionado a GLUT10 (Joost y Thorens, 2001). En las células HEK293, además de la expresión de GLUT1, se ha detectado la expresión de GLUT9 (Augustin *et al.*, 2004) y de GLUT3 (Datos Laboratorio Señalización Celular aún no publicados).

Según los análisis de inmunofluorescencia las células HEK293 muestran una reacción positiva localizada tanto a nivel intracitoplasmático, en donde la reacción se presentó en forma de gránulos, como a nivel de la membrana plasmática para la proteína GLUT1 (**Figura 5, panel A**). De la misma forma se detectó la presencia de GLUT3 (**Figura 5, panel B**), localizándose en forma abundante a nivel de la región intracitoplasmática, en regiones muy cercanas al núcleo. Además, se confirmó la presencia de dichas proteínas mediante ensayos de *Western blot* realizadas a partir de extractos proteicos totales de células en cultivo. Se detectaron dos bandas de aproximadamente 53 y 55 kDa con el anticuerpo anti-GLUT1 (**Figura 5, panel C**), mientras que para el caso de GLUT3 (**Figura 5, panel D**), se detectó una única banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 53 kDa.

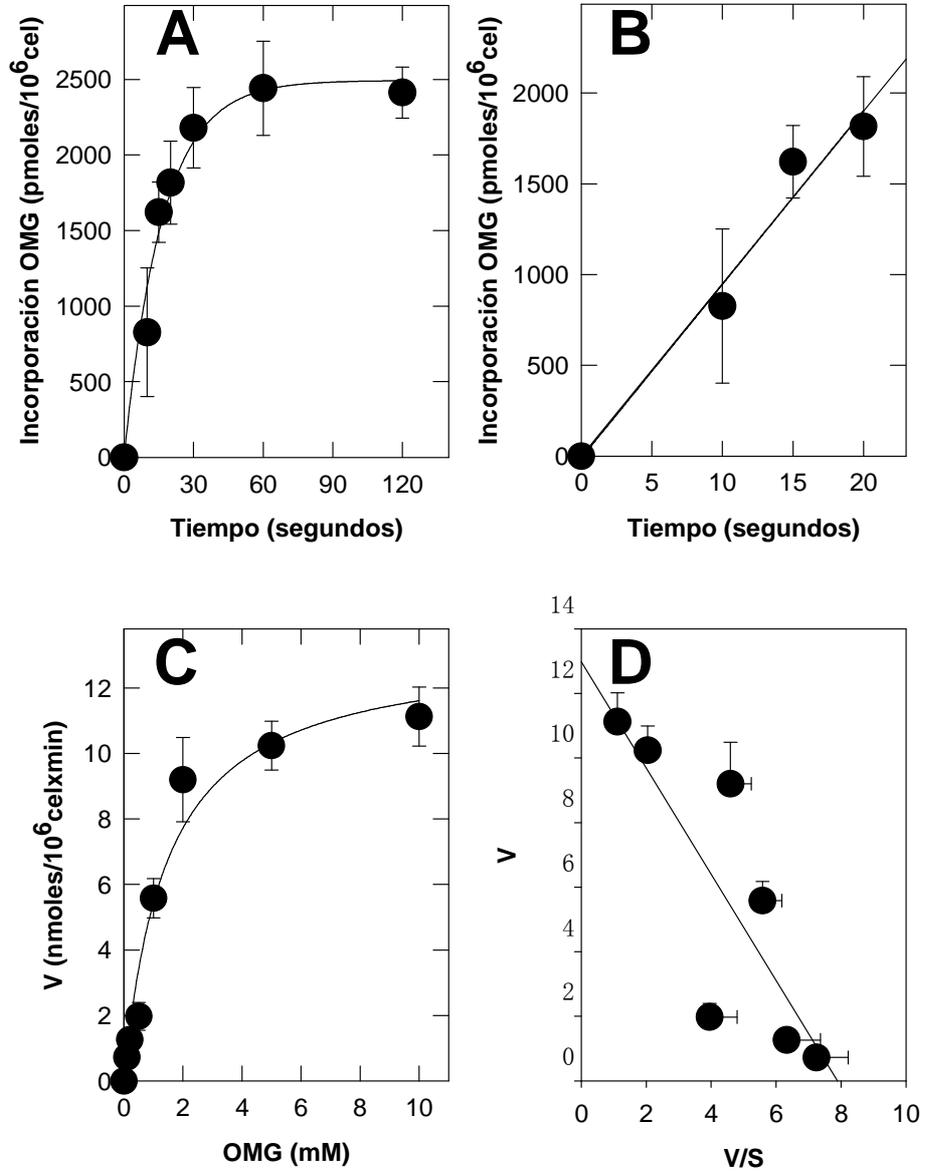
Como control negativo se utilizó solución de bloqueo sin primer anticuerpo, no observándose inmunorreacción positiva en las células.

**Figura 5. Análisis de la expresión de transportadores de glucosa en células HEK293. A, B.** Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (*A*, verde) y anti-GLUT3 (*B*, verde). El control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (inserto). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu\text{m}$ . **C, D.** Western blot para detectar GLUT1 (*C*) y GLUT3 (*D*) a partir de extractos totales de células HEK293.



A continuación, se realizaron estudios funcionales utilizando OMG, un análogo de glucosa que no es metabolizado intracelularmente, por lo que puede ser utilizado exclusivamente para estudiar la cinética de transporte (Carruthers, 1990; Simpson y Cushman, 1986). De esta manera se confirmó una vez más la presencia de transportadores de glucosa y además se estableció las condiciones óptimas para la realización de los estudios cinéticos posteriores. La incorporación de OMG 0,5 mM a 20°C fue lineal hasta casi los 20 segundos, alcanzando el equilibrio después de los 30 segundos (**Figura 6, panel A**). La velocidad inicial fue de  $5,7 \pm 0,7$  nmoles/ $10^6$  celxmin. El transporte de concentraciones crecientes de OMG, medidas durante 15 segundos a 20°C, mostró la presencia de un componente saturable (**Figura 6, panel C**). Los parámetros cinéticos según la regresión hiperbólica fueron  $K_m = 1,3 \pm 0,4$  mM y  $V_{max} = 12,1 \pm 1$  nmoles/ $10^6$  celxmin. El análisis de Eadie-Hofstee (**Figura 6, panel D**) también arrojó la presencia de un solo componente, con una  $K_m$  aparente de  $1,7 \pm 0,5$  mM y una  $V_{max}$  de  $12,3 \pm 2,4$  nmoles/ $10^6$  celxmin.

**Figura 6. Caracterización del transporte de OMG en células HEK293. A, B.** Cinética de incorporación de OMG 0,5 mM a 20°C. La línea en los gráficos corresponde al ajuste a una exponencial (A, R = 0,9972) y a una regresión lineal (B, R = 0,9954). **C.** Curva de saturación para la incorporación de OMG (15 s, 20°C). La línea corresponde al ajuste a una hipérbola rectangular (R = 0,9931) de la cual se obtuvieron los parámetros:  $K_m = 1,3 \pm 0,4$  mM y  $V_{max} = 12,1 \pm 1$  nmoles/ $10^6$  celxmin. **D.** Gráfica de Eadie-Hofstee para los datos obtenidos en C. La línea corresponde a la regresión lineal (R = 0,9442) de la población de puntos observados, a partir de los cuales se obtuvieron los parámetros:  $K_m = 1,7 \pm 0,5$  mM y  $V_{max} = 12,3 \pm 2,4$  nmoles/ $10^6$  celxmin. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. \*\*\*  $p < 0,001$ .



#### **4.3 Presencia del receptor para GM-CSF y de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3 en riñón de rata.**

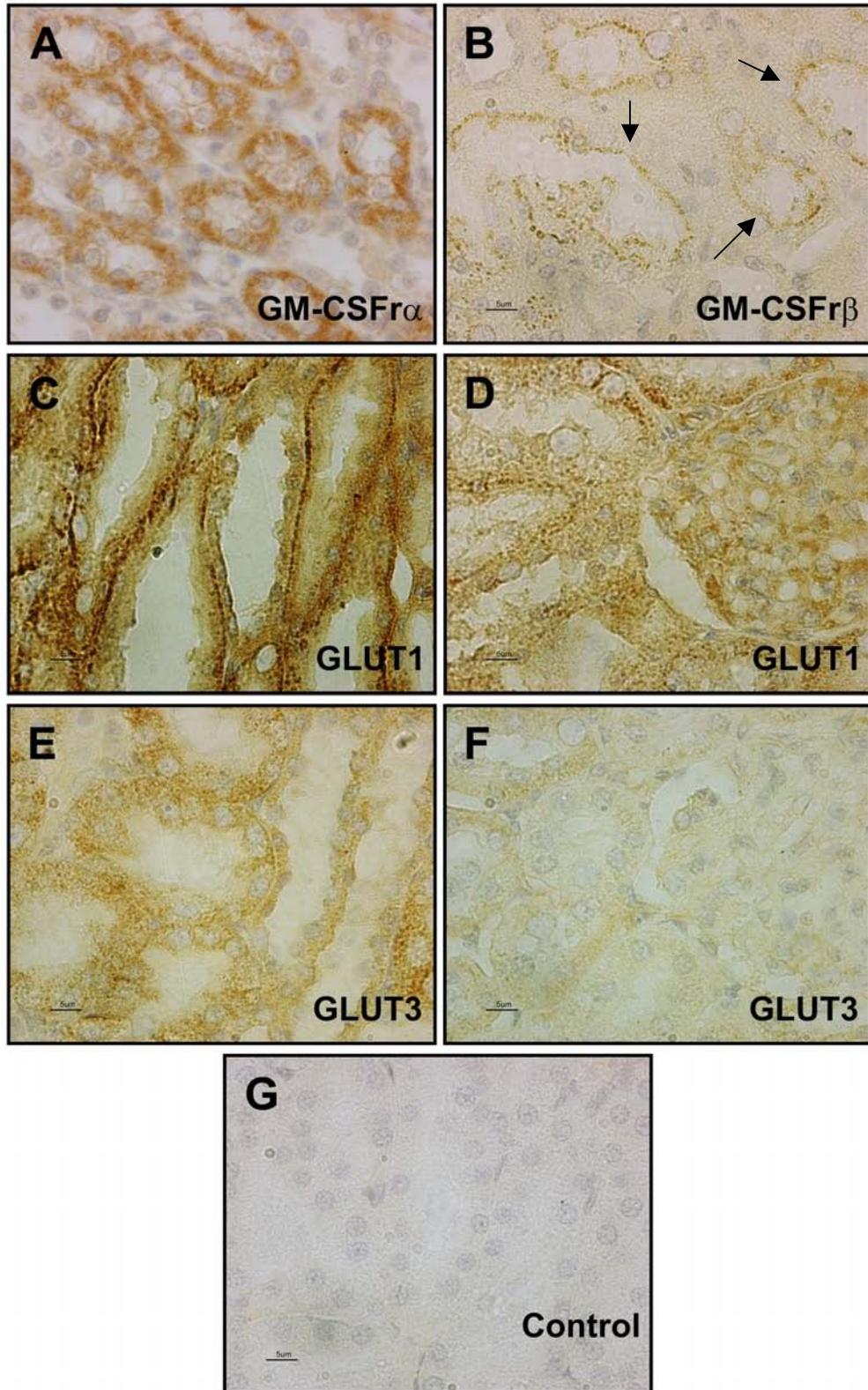
El receptor para GM-CSF es expresado tanto en células progenitoras hematopoiéticas, cómo en algunos tipos celulares no hematopoiéticos. En la mayoría de los órganos la expresión de este receptor se limita a macrófagos, sin embargo, se ha reportado la presencia del mensajero y la proteína en tejido fetal de riñón humano a partir de la octava semana de edad gestacional (Dame *et al.*, 1999). Debido a estos hallazgos, se quiso indagar si el receptor de GM-CSF estaba presente en etapas adultas. Se realizó un análisis de inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata con el fin de determinar la presencia y localización de ambas subunidades del receptor para GM-CSF ( $\alpha$  y  $\beta$ ), así como también de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3. De esta manera, cortes de riñón de rata normales adultos embebidos en parafina fueron analizados mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-GM-CSFr $\alpha$ , anti-GM-CSFr $\beta$ , anti-GLUT1 y anti-GLUT3. La inmunohistoquímica para la subunidad  $\alpha$  del receptor de GM-CSF (**Figura 7, panel A**), evidenció que esta subunidad se detecta en etapas adultas y se localiza en la médula del riñón, específicamente en los túbulos colectores. La marca inmunorreactiva positiva para esta proteína resultó ser muy marcada en esta zona, indicando que esta proteína se encuentra altamente expresada en esta región del riñón. Para la subunidad  $\beta$  del receptor de GM-CSF, la localización de células inmunorreactivas positivas solo fue posible encontrarla en epitelio que se encuentra próximo a los túbulos colectores, tal

como lo indican las flechas (**Figura 7, panel B**), sin embargo, a diferencia de la marca de la subunidad  $\alpha$ , la marca de la subunidad  $\beta$  es muy débil.

Con respecto a los transportadores facilitativos de glucosa, el transportador de glucosa GLUT1 ha sido descrito como un transportador universal debido a que siempre es posible encontrar muy bajos niveles de proteína o mRNA en prácticamente todos los tejidos. La mayor expresión de este transportador se da en el tejido cerebral. Por otro lado, el transportador facilitativo de glucosa GLUT3, se expresa abundantemente en cerebro, placenta y riñón, y junto a GLUT1 son transportadores de alta afinidad por glucosa. En el caso de GLUT1, éste fue inmunodetectado en la médula del riñón, en los túbulos colectores (**Figura 7, panel C**) y en la corteza a nivel de los glomérulos (**Figura 7, panel D**). En el caso del transportador GLUT3, se pudo apreciar inmunorreacción positiva en zonas similares a las observadas para GLUT1, en los túbulos colectores (**Figura 7, panel E**) y en los glomérulos (**Figura 7, panel F**), siendo la inmunorreacción positiva de GLUT3 menor a la de GLUT1, lo que sugiere que este último transportador es expresado en mayor cantidad que GLUT3 en riñón adulto de rata. Se puede apreciar además que la detección tanto de GLUT1 como de GLUT3 es mayor en la zona de los túbulos colectores que en la región de los glomérulos, puesto que hay una mayor inmunorreacción positiva en esta zona. Ya que tanto las subunidades del receptor de GM-CSF ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 fueron detectados en zonas similares en cortes de riñón de rata, esto sugiere que estas proteínas se encontrarían estrechamente relacionadas para llevar a cabo su (s) función (s) en este tejido.

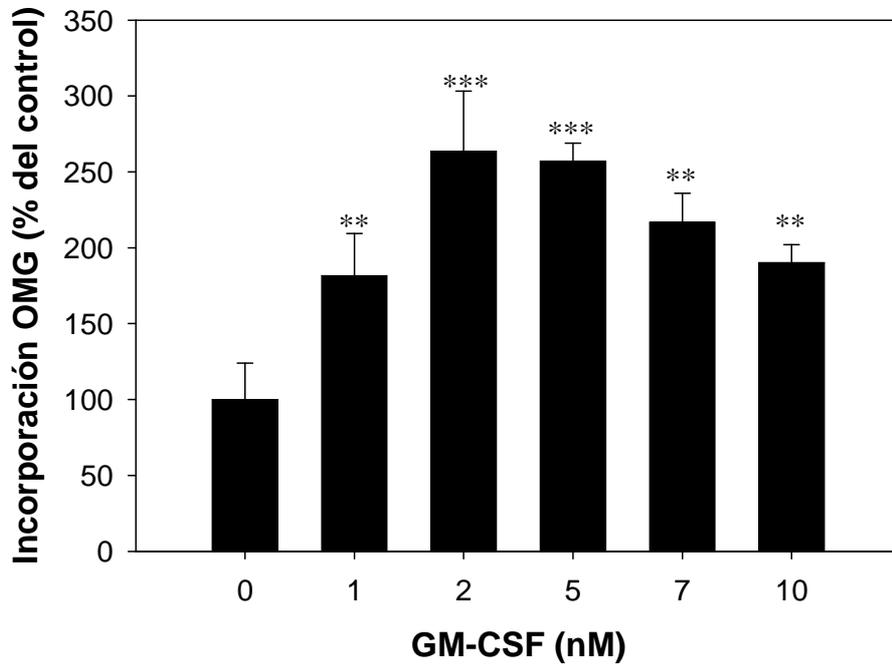
Como control negativo (**Figura 7, panel E**) se utilizó solución de bloqueo sin primer anticuerpo, no observándose inmunorreacción positiva en el tejido.

**Figura 7. Inmunolocalización del receptor de GM-CSF y de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en cortes de riñón de rata. A, B.** Análisis inmunohistoquímico de transportadores de glucosa utilizando un anticuerpo anti-GM-CSFr $\alpha$  (A) y anti-GM-CSFr $\beta$  (B). **C, D, E, F.** Análisis de la expresión de los transportadores de glucosa utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (C, D) y anti-GLUT3 (E, F). **G.** Control negativo sin primer anticuerpo. Magnificación 1250X.



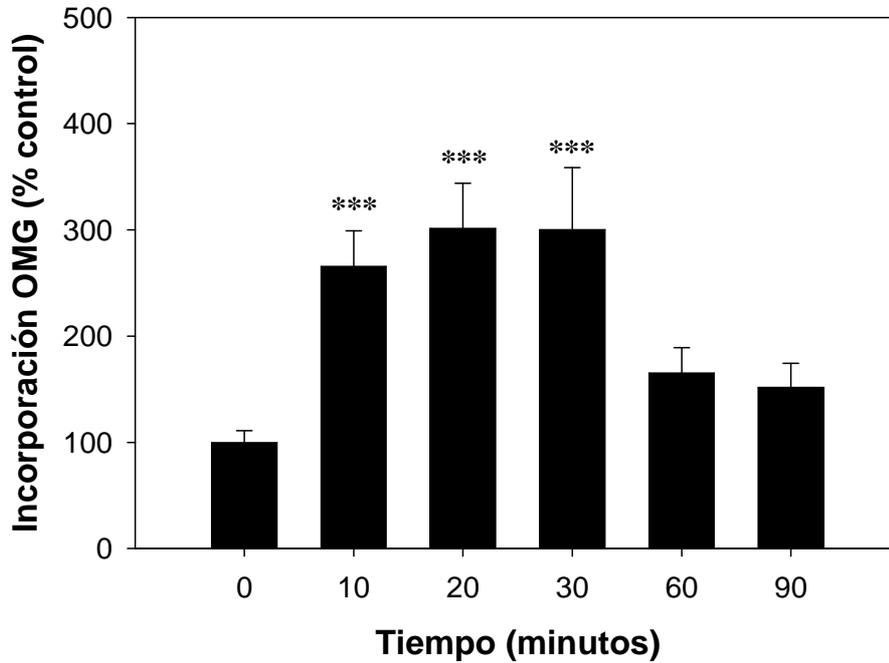
#### 4.4 Efecto de GM-CSF sobre el transporte de 3-*o*-metil-D-glucosa en células HEK293

GM-CSF es conocida como una citoquina que es capaz de aumentar la captación de glucosa en células hematopoiéticas (interesantemente posee el mismo efecto en líneas no hematopoiéticas como la línea germinal masculina [Zambrano *et al.*, 2001]). Por ello se investigó el efecto de GM-CSF en la línea celular HEK293, derivada de células embrionarias de riñón humano, que como se pudo apreciar en los resultados anteriores, expresa ambas subunidades del receptor para GM-CSF además de presentar transportadores facilitativos de glucosa funcionales. Para estudiar el efecto de GM-CSF se usó la captación de un análogo que no es metabolizado por la célula, 3-*o*-metil-D-glucosa, como una medida de la captación de glucosa. En un primer paso las células fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación y luego tratadas durante 30 minutos con diferentes concentraciones de GM-CSF (0-10 nM). Como se puede apreciar en la **Figura 8**, la adición de la citoquina causa un importante incremento de la captación de metilglucosa con respecto a las células control. Además se puede observar que a partir de bajas concentraciones de 3-*o*-metil-D-glucosa, como lo es 1 nM, el aumento en la captación del análogo es evidente, manteniéndose este aumento hasta una concentración de citoquina de 2 nM, para luego decaer levemente a partir de una concentración de GM-CSF de 5 nM. Sin embargo, el aumento en la incorporación de OMG inducida por todas las concentraciones de GM-CSF testeadas fue en cada caso significativamente diferente con respecto al control.



**Figura 8. Efecto de GM-CSF sobre el transporte de OMG en células HEK293.** Las células HEK293 fueron preincubadas en tampón de incubación durante 1 hora previo al tratamiento por un período de 30 minutos con un rango de concentraciones de GM-CSF (0-10 nM). El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .

Para investigar el tiempo en que ocurre la máxima respuesta a GM-CSF, las células HEK293 fueron tratadas como se describió anteriormente e incubadas con GM-CSF 6,6 nM. La concentración de citoquina utilizada será discutida más adelante. Como se puede apreciar en **la Figura 9**, la concentración de factor utilizado causa un rápido incremento (10 minutos) en el transporte de metilglucosa, que fue mantenido durante 20 y hasta 30 minutos después de la incubación con GM-CSF. Después de 1 hora de tratamiento, la incorporación de metilglucosa disminuyó significativamente, alcanzando valores cercanos a los obtenidos en las células control. Similar situación fue observada en aquellas células que fueron tratadas durante 90 minutos con GM-CSF. El aumento observado tanto a los 10, 20 y 30 minutos de tratamiento con GM-CSF fue significativo con respecto a las células no tratadas con GM-CSF, pero no fue significativo entre estos tiempos de tratamiento.



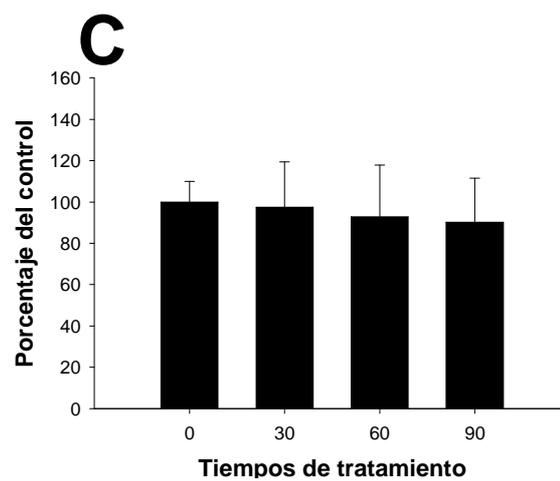
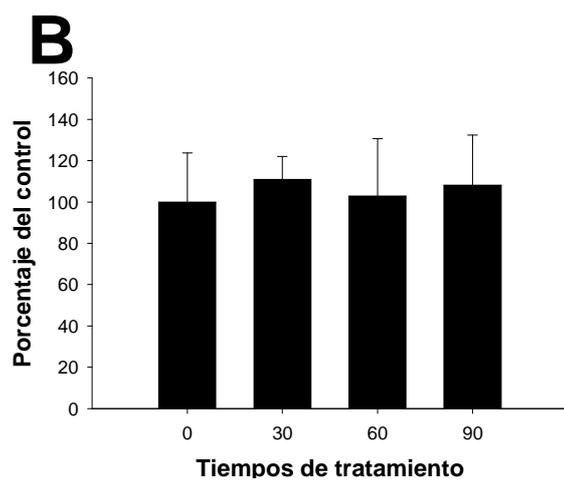
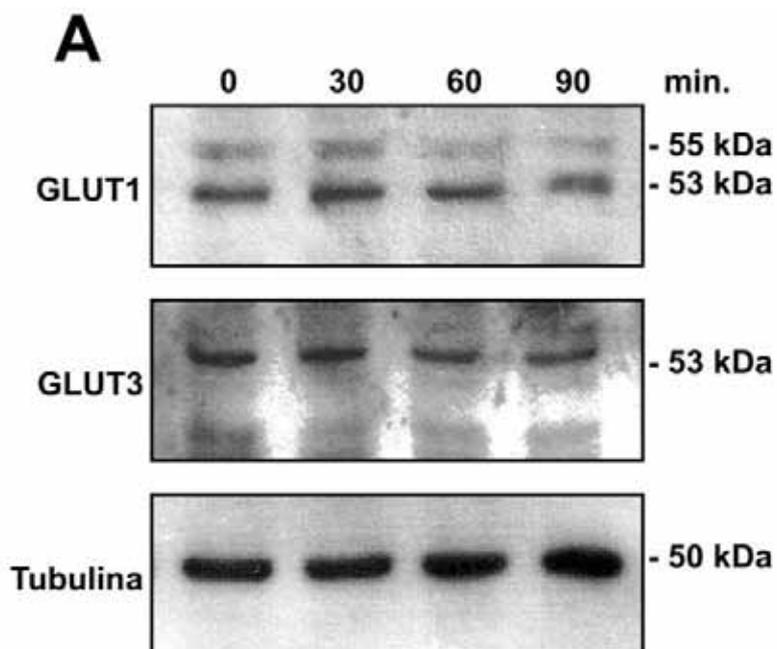
**Figura 9. Efecto tiempo-dependiente de GM-CSF en la incorporación de OMG.** Las células HEK293 fueron preincubadas en tampón de incubación durante 1 hora previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.5 Efecto de GM-CSF sobre los niveles de expresión de GLUT1 y GLUT3

Una posible explicación para la estimulación del transporte de metilglucosa en células HEK293 estimuladas con GM-CSF es que esta citoquina produzca un aumento en la expresión de los transportadores de glucosa.

Para explorar esta posibilidad se realizaron análisis de *Western blot*. De esta forma, las células HEK293 fueron preincubadas en tampón de incubación por un período de 1 hora previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM durante 30, 60 y 90 minutos. En el caso de las células control, éstas fueron tratadas de igual forma que las células estimuladas con GM-CSF, solo que en lugar de la citoquina se les adicionó un volumen equivalente de PBS. A continuación, se les realizó extracción de proteínas totales y posterior análisis de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3. Los resultados fueron sometidos a análisis densitométricos y normalizados utilizando como control de proteínas totales  $\beta$ -Tubulina. Como se puede apreciar en la **Figura 10, panel A**, los niveles de cada una de las proteínas inmunodetectadas, GLUT1 y GLUT3 no difirieron significativamente entre las células tratadas en ausencia o presencia de GM-CSF. El análisis densitométrico y normalización de proteínas se muestran en los histogramas de abajo, en **B** para GLUT1 y en **C** para GLUT3.

**Figura 10. Efecto de GM-CSF sobre la abundancia relativa de GLUT1 y GLUT3.** Las células HEK293 fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con GM-CSF 6,6 nM durante 30, 60 y 90 minutos. Los extractos proteicos fueron preparados como se describió en materiales y métodos, separados por SDS-PAGE e inmunodetectados utilizando anticuerpos específicos anti-GLUT1 y anti-GLUT3. **A.** Análisis de *Western blot* para la expresión de GLUT1, GLUT3 y  $\beta$ -Tubulina. **B, C.** Normalización de proteínas utilizando como control  $\beta$ -Tubulina (A). Histograma del análisis densitométrico de la expresión de GLUT1 (B) y de GLUT3 (C).



#### 4.6 Efecto de GM-CSF sobre la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3.

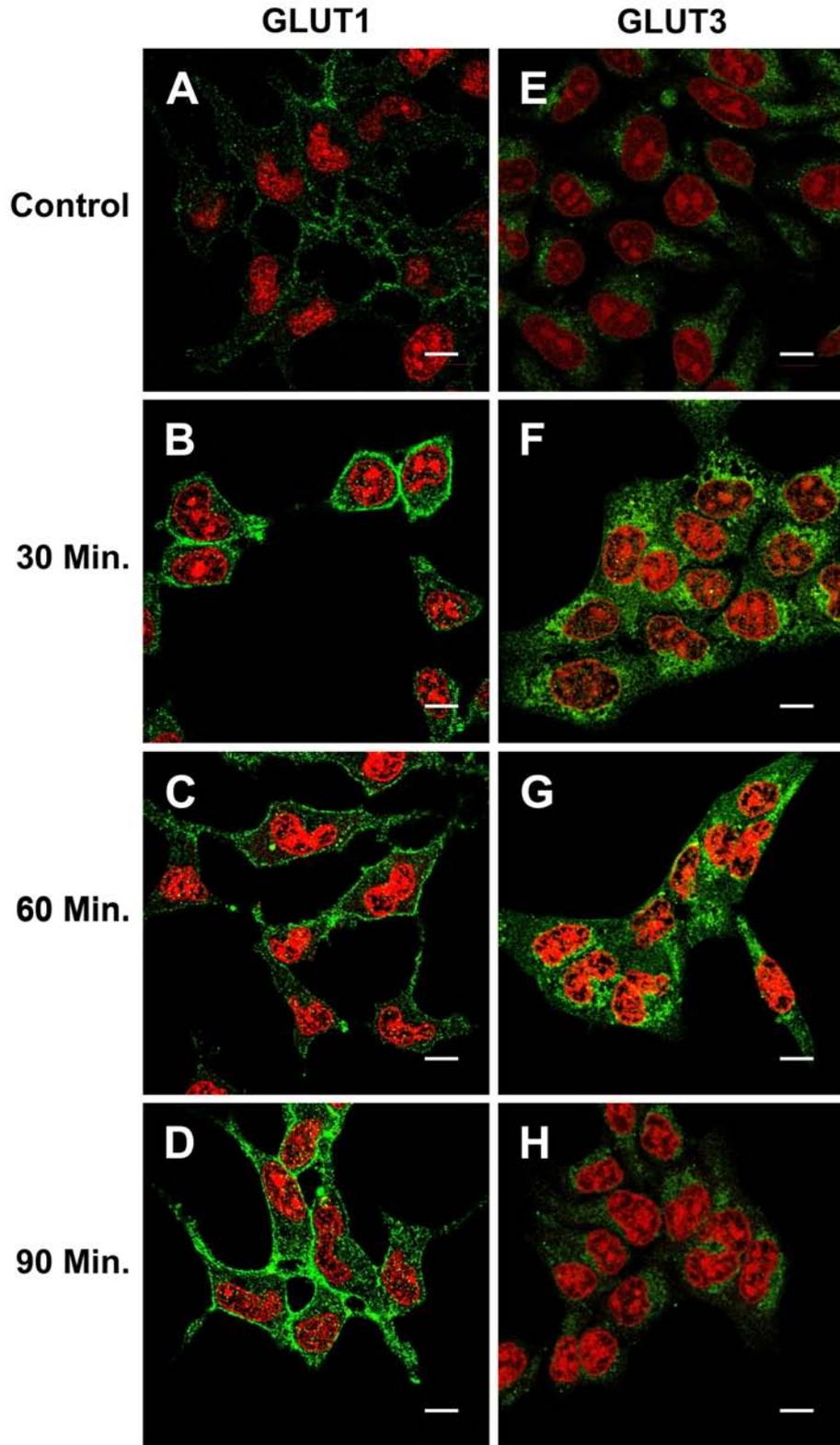
Aunque el contenido celular total de los transportadores de glucosa no fue afectado por el tratamiento con GM-CSF en células HEK293, una segunda explicación potencial es una posible redistribución de los transportadores entre el interior de la célula y la superficie. Para distinguir entre esta posibilidad, fueron investigados los efectos de GM-CSF sobre la distribución subcelular de los transportadores de glucosa. Para esto, las células HEK293 tratadas como se describió anteriormente fueron sometidas a estudios de inmunofluorescencia y analizadas por microscopía confocal.

El análisis de las células marcadas con el anticuerpo específico para el transportador facilitativo de glucosa GLUT1 reveló que después de un período de 1 hora en tampón de incubación, GLUT1 se encuentra localizado tanto en la región intracitoplasmática como en la membrana celular plasmática, con una intensidad de fluorescencia débil, pues se puede apreciar bajos niveles de este transportador en ambas regiones (**Figura 11, panel A**). El tratamiento de las células HEK293 con GM-CSF 6,6 nM durante 30 minutos causa un aumento en la intensidad de fluorescencia intracelular de GLUT1 y un aumento sustancial para este transportador en la superficie celular (**Figura 11, panel B**), situación que se torna similar durante 60 y 90 minutos de estimulación con GM-CSF (**Figura 11, panel C y D**). Similar análisis usando un anticuerpo específico contra GLUT3 reveló que en las células control, el transportador GLUT3 se encuentra localizado en la región intracitoplasmática, en zonas muy cercanas al núcleo (**Figura 11, panel E**). Luego de 30 minutos de tratamiento con la citoquina, se puede observar un aumento en la intensidad de fluorescencia de GLUT3 en toda la

región intracitoplasmática y la llegada de una cantidad mínima de transportador GLUT3 a la membrana plasmática (**Figura 11, panel F**). La situación observada a los 30 minutos se mantiene luego de 60 minutos de estimulación con GM-CSF (**Figura 11, panel G**). Pero, tras la estimulación de las células durante 90 minutos con GM-CSF, el transportador GLUT3 es observado nuevamente en regiones cercanas al núcleo, similar a lo observado en las células control (**Figura 11, panel H**).

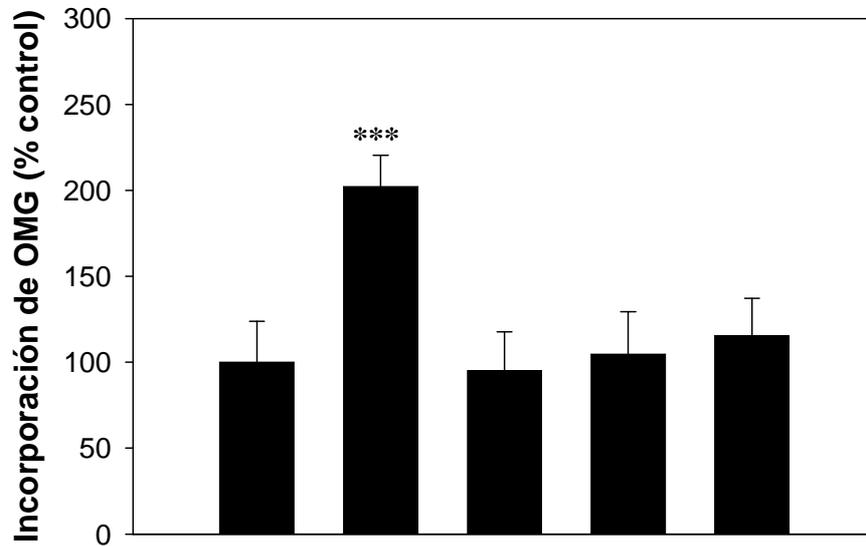
**Figura 11. Efecto de GM-CSF en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3.**

Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (verde, *A, B, C, D*) y anti-GLUT3 (verde, *E, F, G, H*). Las células HEK293 fueron incubadas durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM durante 30, 60 y 90 minutos. **A, E.** Células no estimuladas (control), detección de GLUT1 (*A*) y GLUT3 (*E*). **B, F.** Células estimuladas durante 30 minutos, detección de GLUT1 (*B*) y GLUT3 (*F*). **C, G.** Células HEK293 estimuladas durante 60 minutos con GM-CSF, detección de GLUT1 (*C*) y GLUT3 (*G*). **D, H.** Células estimuladas con GM-CSF durante 90 minutos, detección de GLUT1 (*D*) y GLUT3 (*H*). Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu\text{m}$ .



#### **4.7 Participación de PI 3-quinasa en la estimulación del transporte de glucosa inducido por GM-CSF**

Son múltiples las vías de señalización que son activadas por el receptor de GM-CSF, siendo una de las más importantes la vía PI 3-quinasa/Akt y cuya activación es una de las respuestas celulares inmediatas a la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas. Sin embargo, todo lo relacionado a este tema ha sido ampliamente estudiado en el sistema hematopoiético, resultando interesante por ello, estudiar dicha vía en un modelo tal como la línea celular HEK293. Para determinar si esta vía se encuentra involucrada en el aumento del transporte de glucosa estimulado por GM-CSF, se utilizó el inhibidor sintético de PI 3-quinasa LY294002. Para ello, las células fueron preincubadas durante una hora en tampón de incubación para luego ser incubadas durante 30 minutos con LY294002 10  $\mu$ M, previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM por 30 minutos. Como se puede observar en la **Figura 12**, el inhibidor de PI 3-quinasa inhibe significativamente el transporte de OMG estimulado por GM-CSF a la concentración testada, lo que nos da cuenta de que la enzima PI 3-quinasa se encontraría involucrada en la señalización para el aumento del transporte de glucosa en este tipo celular. Por otra parte, se puede observar que el solvente utilizado para el inhibidor LY294002, que en este caso corresponde a DMSO, no ejerce ningún efecto sobre el transporte de OMG.



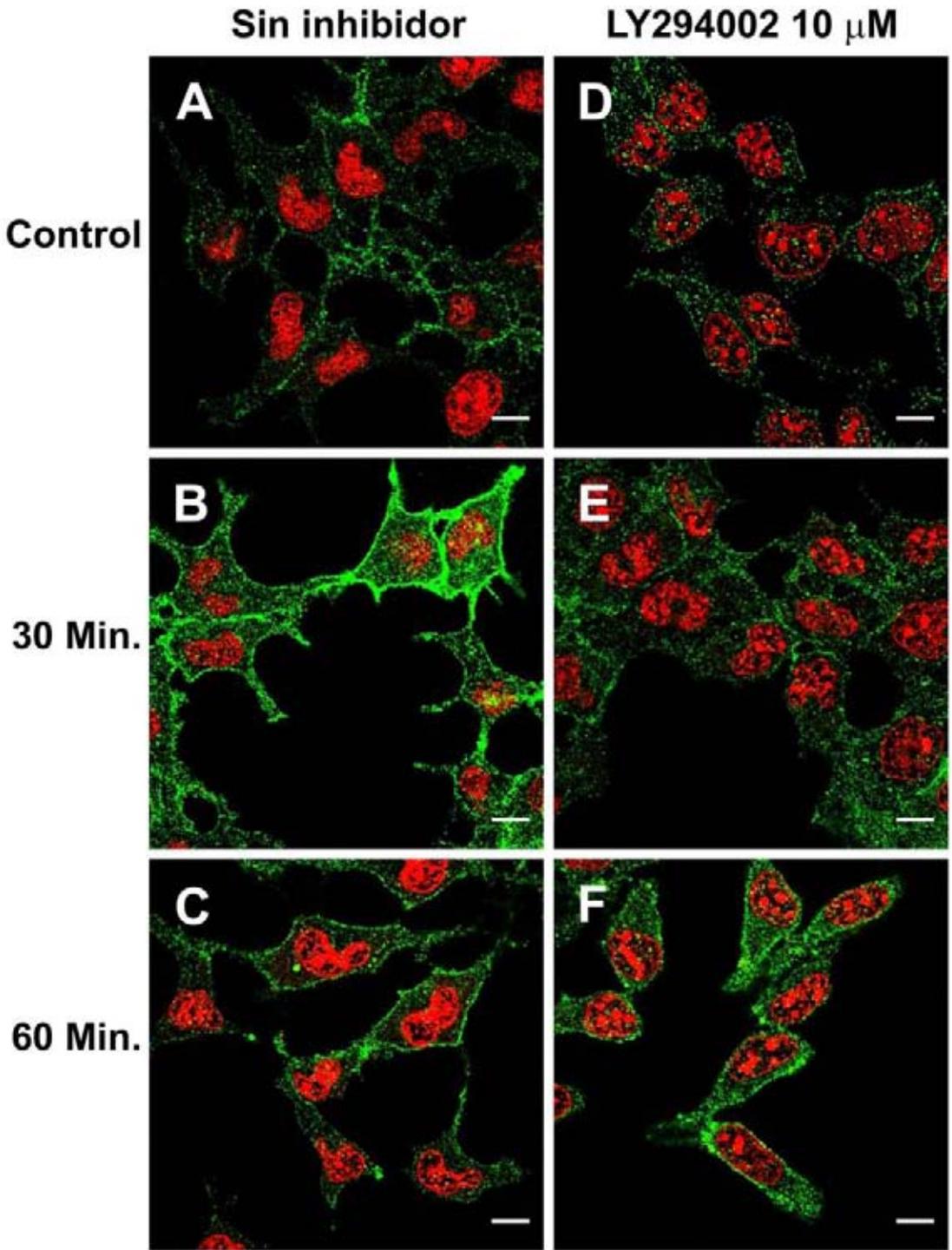
|          |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|
| GM-CSF   | - | + | + | - | - |
| LY294002 | - | - | + | + | - |
| DMSO     | - | - | - | - | + |

**Figura 12. Participación de PI 3-quinasa en la estimulación del transporte de OMG inducido por GM-CSF.** Las células HEK293 fueron preincubadas por 1 hora en tampón de incubación y tratadas con GM-CSF 6,6 nM en presencia de LY294002 10  $\mu$ M. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.8 Participación de PI 3-quinasa en la distribución subcelular de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en respuesta a GM-CSF.**

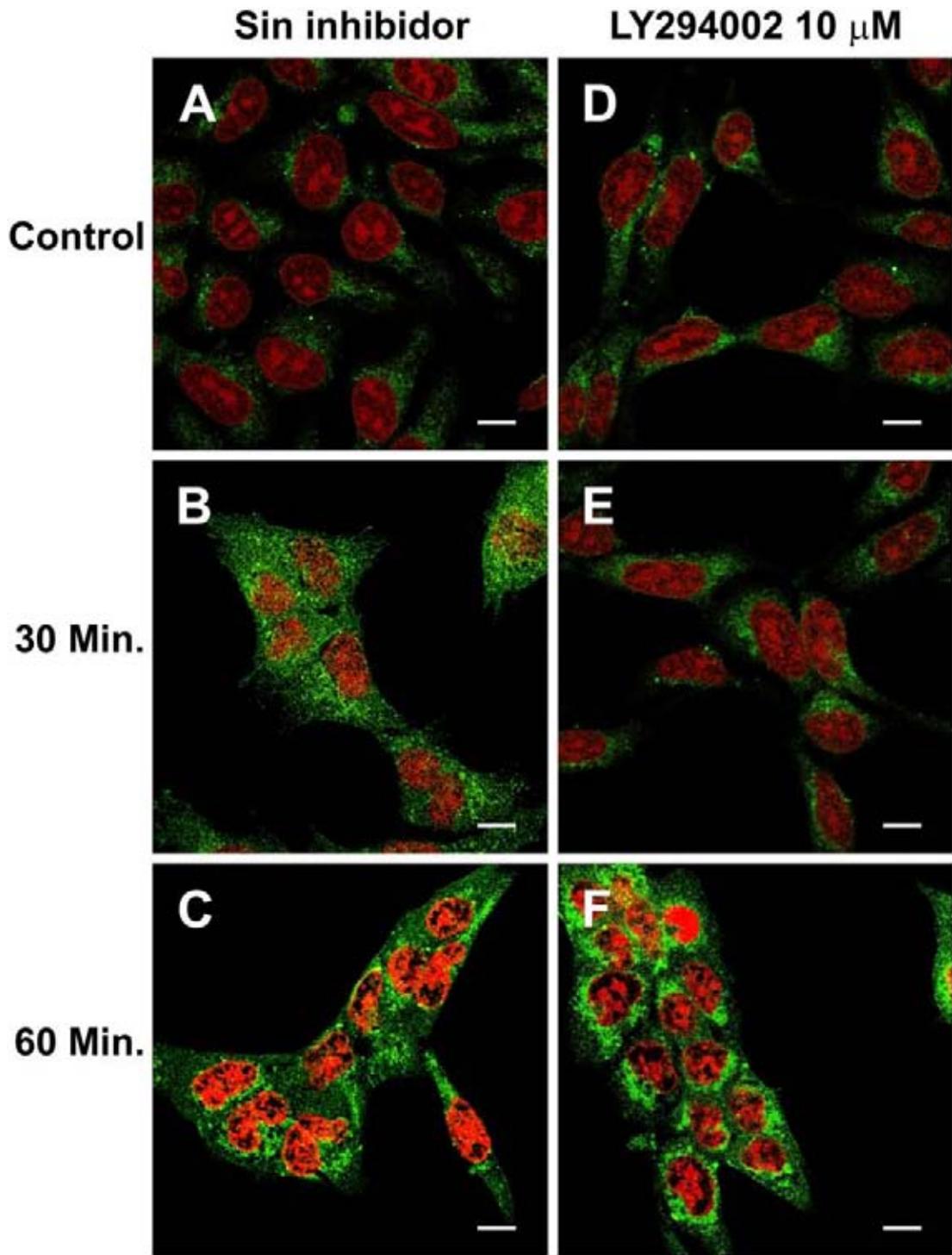
Para determinar si la inhibición del transporte estimulado por GM-CSF en presencia del inhibidor de PI 3-quinasa, LY294002, refleja una inhibición de la redistribución de los transportadores facilitativos de hexosas regulado por GM-CSF, se analizó la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en células HEK293 tratadas con el inhibidor. El análisis de inmunofluorescencia a través de microscopía confocal reveló que la intensidad de fluorescencia de GLUT1 en células tratadas con GM-CSF durante 30 minutos en presencia de LY294002 10  $\mu$ M disminuye intracelularmente, provocando además una disminución considerable del transportador a nivel de la membrana plasmática (**Figura 13, panel E**), situación muy similar a lo que se puede observar en las células HEK293 control (**Figura 13, panel A**). Por otra parte, las células tratadas durante 60 minutos con GM-CSF 6,6 nM en presencia del inhibidor a una concentración de 10  $\mu$ M (**Figura 13, panel F**), no presentan diferencia sustancial con aquellas células que fueron tratadas solo con GM-CSF (**Figura 13, panel C**), sugiriendo que el inhibidor de PI 3-quinasa, no es capaz de inducir cambios en la distribución subcelular de GLUT1.

**Figura 13. Participación de PI 3-quinasa en la distribución subcelular de GLUT1 inducida por GM-CSF.** Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (verde). Las células HEK293 fueron incubados durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con GM-CSF 6,6 nM durante 30, 60 y 90 minutos en presencia o ausencia de LY294002 10  $\mu$ M. **A.** Células no estimuladas con GM-CSF (control). **B, C.** Células estimuladas con GM-CSF durante 30 y 60 minutos, respectivamente. **D.** Células incubadas con el inhibidor LY294002 durante 30 minutos. **E, F.** Células HEK293 estimuladas con GM-CSF durante 30 y 60 minutos en presencia de LY294002 10  $\mu$ M. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m.



En cuanto a la localización del transportador facilitativo de glucosa GLUT3, el análisis de inmunofluorescencia muestra que en células tratadas durante 30 minutos con GM-CSF 6,6 nM en presencia de LY294002 10  $\mu$ M (**Figura 14, panel E**), este transportador se encuentra localizado preferentemente en regiones cercanas al núcleo, disminuyendo considerablemente la fluorescencia a nivel intracitoplasmático, observándose de esta manera, un patrón muy similar a aquellas células que no han sido tratadas con GM-CSF (**Figura 14, panel A**), las cuales también muestran al transportador GLUT3 localizado muy cercano al núcleo celular. Las células HEK293 que fueron estimuladas con GM-CSF por 60 minutos en presencia del inhibidor (**Figura 14, panel F**), no presentan diferencia evidente en la localización de GLUT3 respecto a las células que fueron estimuladas solo con la citoquina (**Figura 14, panel C**), concluyendo que el inhibidor no sería capaz de producir cambios en la distribución de GLUT3 en este período de tiempo y a la concentración de inhibidor testada.

**Figura 14. Participación de PI 3-quinasa en la distribución subcelular de GLUT3 en respuesta a GM-CSF.** Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GLUT3 (verde). Las células HEK293 fueron incubados durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con GM-CSF 6,6 nM durante 30, 60 y 90 minutos en presencia o ausencia de LY294002 10  $\mu$ M. **A.** Células no estimuladas con GM-CSF (control). **B, C.** Células estimuladas con GM-CSF durante 30 y 60 minutos, respectivamente. **D.** Células incubadas con el inhibidor LY294002 durante 30 minutos. **E. F.** Células HEK293 estimuladas con GM-CSF durante 30 y 60 minutos en presencia de LY294002 10  $\mu$ M. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m.



#### 4.9 Activación de Akt en células estimuladas por GM-CSF ocurre a través de la vía PI 3-quinasa.

Uno de los blancos mejor estudiados de la enzima PI 3-quinasa es la proteína serina/treonina quinasa Akt o también conocida como PKB. Por esta razón, el paso siguiente fue analizar si Akt podría ser activada a través de la estimulación de las células HEK293 con GM-CSF y además si esta activación estaría mediada por la enzima PI 3-quinasa. Para que Akt/PKB posea actividad tanto *in vivo* como *in vitro*, es necesaria la fosforilación de residuos tales como Thr 308 y Ser 473 (Anjelkovic y col., 1996; Bellacosa y col., 1991; Burgering y Coffey, 1995; Coffey y Woodgett, 1991).

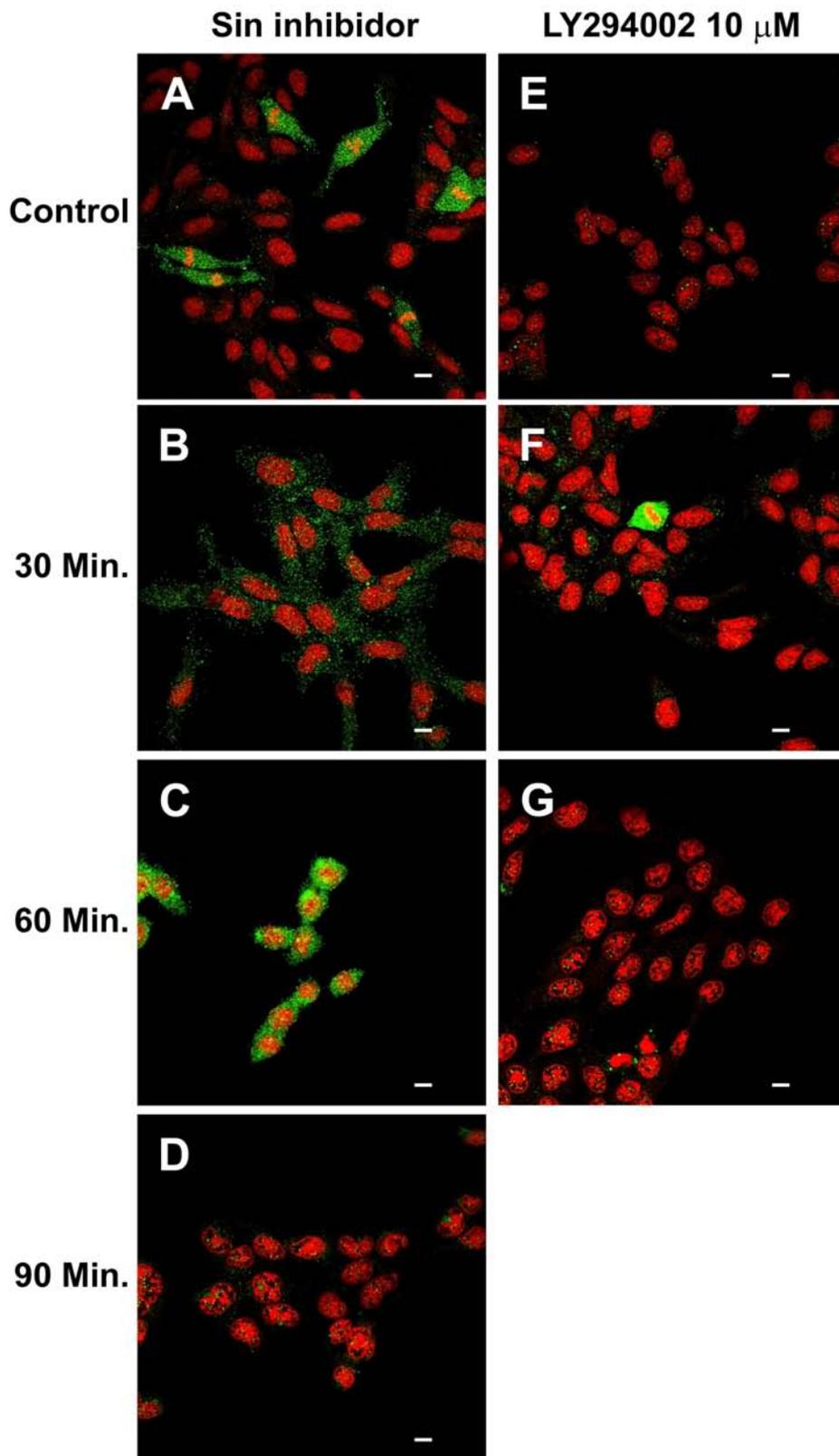
En este caso se realizó una inmunofluorescencia, como lo muestra la **Figura 15**, utilizando para ello un anticuerpo anti-Akt fosforilada dirigido contra el residuo Ser 473, indicador del grado de fosforilación de la proteína. Como se puede apreciar, en células que no han sido tratadas con GM-CSF, la proteína Akt se encuentra inactiva a excepción de aquellas células que se encuentran en un evidente estado de mitosis (**Figura 15, panel A**). Según lo que se puede observar en la **Figura 15, panel B**, GM-CSF es capaz de producir la activación de Akt cuando han sido tratadas con esta citoquina por un período de 30 minutos, activación que es capaz de mantenerse luego que las células han sido estimuladas con GM-CSF durante 60 minutos (**Figura 15, panel C**), siendo esta activación más marcada que la producida a los 30 minutos. Además, la activación producida tras 60 minutos de tratamiento con GM-CSF sugiere la translocación de Akt hacia el núcleo de la célula. Por otra parte, la incubación de las células HEK293 con GM-CSF por 90 minutos (**Figura 15, panel D**) da cuenta de que

Akt ya no se encuentra activa, situación comparable a la observada en las células control (**Figura 15, panel A**).

Para continuar, se realizó el mismo análisis de inmunofluorescencia en el cual esta vez, las células HEK293 fueron preincubadas durante 30 minutos con el inhibidor de PI 3-quinasa LY294002 a una concentración de 10  $\mu$ M previo a la incubación con GM-CSF, de tal manera de investigar si la activación de Akt producida por GM-CSF es mediada por PI 3-quinasa.

Como se puede observar, la activación de Akt producida por GM-CSF tanto a los 30 (**Figura 15, panel F**) y 60 minutos (**Figura 15, panel G**) es inhibida por LY294002, apreciándose un patrón similar a lo observado en las células control, sugiriendo de esta forma que la activación de Akt se encuentra mediada por PI 3-quinasa en este tipo celular.

**Figura 15. Activación de proteína serina/treonina quinasa Akt en células HEK293 estimuladas con GM-CSF ocurre a través de la vía PI 3-quinasa.** Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-pAkt dirigido contra Serina 473 (verde). Las células HEK293 fueron incubadas durante una hora en tampón de incubación previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM en ausencia o presencia del inhibidor LY294002. **A.** Células no estimuladas con GM-CSF (control). **B, C, D.** Células HEK293 tratadas con GM-CSF durante 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. **E.** Células incubadas con LY294002 10  $\mu$ M. **F, G.** Células HEK293 tratadas con GM-CSF durante 30 y 60 minutos en presencia de LY294002 10  $\mu$ M respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m.



## RESULTADOS ANEXOS

### 4.10 Expresión del receptor para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) en la línea de células de Sertoli 42GPA9

Además de estudiar la expresión del receptor del factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago en la línea celular HEK293, se indagó si este receptor es expresado en la línea de células de Sertoli 42GPA9, un tipo celular, que al igual que las células HEK293, no pertenece al sistema hematopoiético.

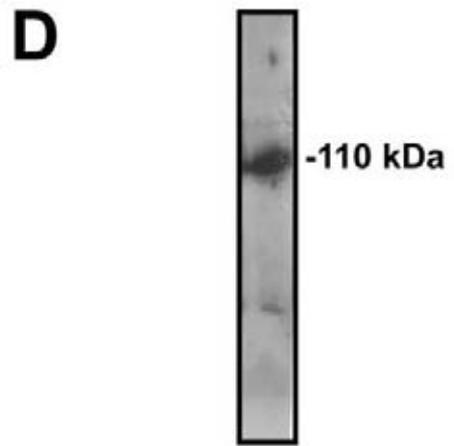
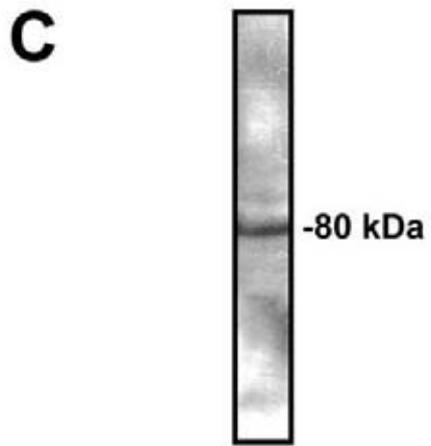
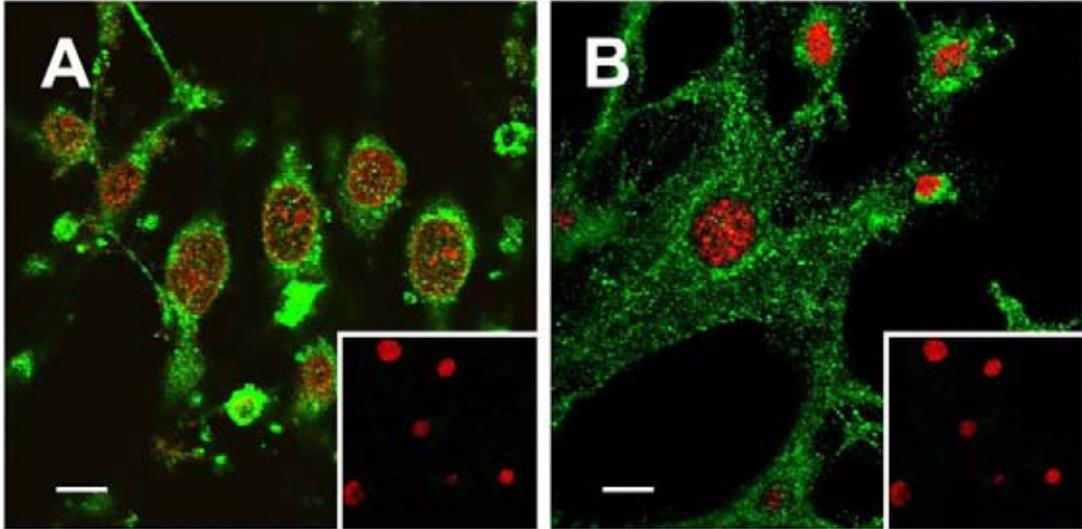
En testículo de mamíferos, las células de Sertoli controlan la proliferación y diferenciación de las células germinales a través de comunicación célula-célula y conforman la barrera hemato-testicular. Estas células juegan un papel fundamental en la regulación de la diferenciación y el metabolismo de las células germinales.

Para estudiar si estas células expresan el receptor de GM-CSF, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en células de Sertoli 42GPA9 para determinar de esta forma, la presencia de las proteínas correspondientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para GM-CSF, para lo cual se utilizaron los anticuerpos anti-GM-CSFr $\alpha$  y anti-GM-CSFr $\beta$  descritos en materiales y métodos. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488. La inmunofluorescencia para GM-CSFr $\alpha$  y GM-CSFr $\beta$  (**Figura 16, panel A y B**), evidenció que estas proteínas son expresadas en las células de Sertoli 42GPA9. De esta forma se pudo determinar que en este tipo celular la subunidad  $\alpha$  del receptor de GM-CSF presenta un patrón inmunorreactivo positivo en la región intracitoplasmática, muy cercano al núcleo celular (**Figura 16,**

**panel A).** Por otra parte, la subunidad  $\beta$  de este receptor (**Figura 16, panel B**) presenta un patrón inmunorreactivo positivo localizado también en el compartimento intracelular, aunque a diferencia de la subunidad  $\alpha$ , su expresión sería mucho mayor.

A continuación se confirmó la presencia del receptor en esta línea celular por análisis de *Western blot*. Para ello, extractos proteicos totales provenientes de células de Sertoli en cultivo, fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalantes y posteriormente electrotransferidas a membranas de PVDF para el análisis de inmunodetección. La **Figura 16, panel C y D**, muestran la inmunodetección de la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ , respectivamente, del receptor para GM-CSF. La masa molecular aparente para la subunidad  $\alpha$  fue aproximadamente de 80 kDa y para la subunidad  $\beta$  fue de 110 kDa, lo que concuerda con lo descrito para otros tipos celulares en la literatura.

**Figura 16. Análisis de la expresión del receptor para GM-CSF en la línea de células de Sertoli 42GPA9. A, B.** Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-GM-CSFr $\alpha$  (A, verde) y anti-GM-CSRr $\beta$  (B, verde). El control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (inserto). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m. **C, D.** Western blot para detectar GM-CSFr $\alpha$  (C) y GM-CSRr $\beta$  (D) a partir de extractos totales de células de Sertoli 42GPA9.



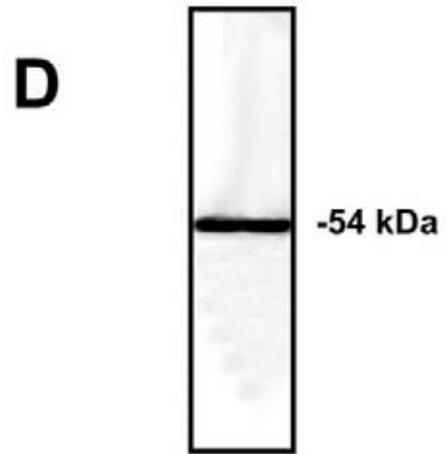
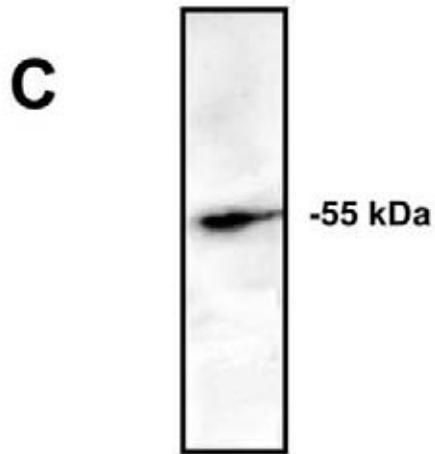
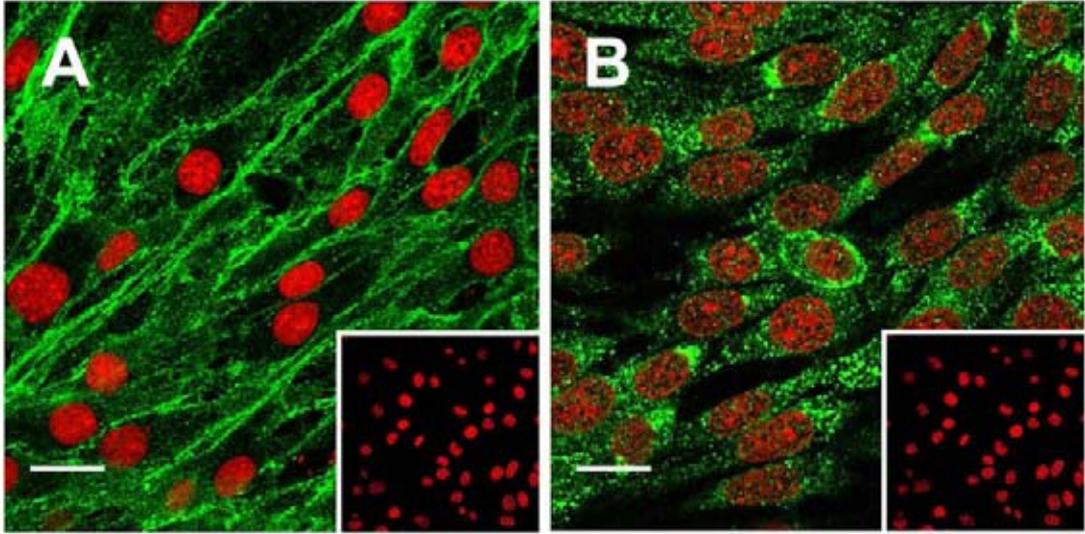
#### **4.11 Análisis de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células de Sertoli 42GPA9**

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio a través de análisis de inmunofluorescencia, *Western blot* y RT-PCR, indican que las células de Sertoli 42GPA9 en cultivo, expresan los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5 y GLUT8 (Datos no publicados).

Por ello, se procedió a ratificar la presencia de dos de estos transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT3, dos de los transportadores que muestran mayor afinidad por glucosa.

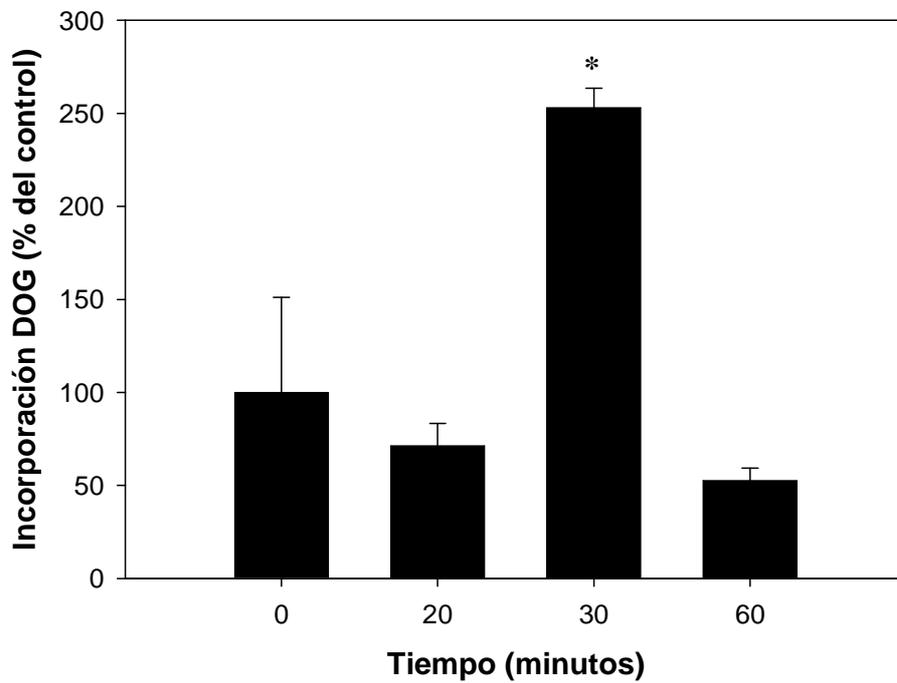
Según los análisis de inmunofluorescencia realizados en células de Sertoli 42GPA9, la proteína GLUT1 (**Figura 17, panel A**) muestra una reacción positiva localizada en la región intracitoplasmática y también a nivel de la membrana plasmática, en donde se encuentra abundantemente expresada. A través del mismo análisis, fue posible detectar la presencia de GLUT3 (**Figura 17, panel B**), localizándose mayoritariamente en la zona intracitoplasmática. Además, la inmunorreacción positiva observada para GLUT3 se presentó en forma de gránulos, lo que sugiere que este transportador se encontraría almacenado al interior de vesículas. A continuación, se confirmó la presencia de dichas proteínas mediante ensayos de *Western blot* realizados a partir de extractos proteicos totales de células en cultivo. Se detectó una banda de aproximadamente 55 kDa con el anticuerpo anti-GLUT1 (**Figura 17, panel C**), mientras que para el caso de la proteína GLUT3 (**Figura 17, panel D**), fue posible detectar una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 54 kDa.

**Figura 17. Análisis de la expresión de transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células de Sertoli 42GPA9. A, B.** Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (A, verde) y anti-GLUT3 (B, verde). El control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (inserto). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10  $\mu$ m. **C, D.** Western blot para detectar GLUT1 (C) y GLUT3 (D) a partir de extractos totales de células de Sertoli 42GPA9.



#### 4.12 Efecto de GM-CSF sobre el transporte de DOG en células de Sertoli 42GPA9

Para estudiar un posible efecto de GM-CSF en la línea de células de Sertoli 42GPA9 derivadas de ratón, éstas fueron incubadas sin o con GM-CSF 6,6 nM durante 20, 30 y 60 minutos. Tras este estímulo, se midió la incorporación de 2-desoxiglucosa (DOG) a 20°C durante 15 segundos (Datos no publicados). Como se puede observar en los resultados preliminares de la **Figura 18**, tras 20 minutos de incubación con la citoquina, no se produce aumento en la incorporación de DOG, observándose una situación similar a la de las células control, las cuales no fueron estimuladas con el factor. Luego de 30 minutos de incubación con GM-CSF, el transporte de DOG se ve aumentado en forma significativa respecto a las células control, situación similar a la que fue observada en las células HEK293. Sin embargo, tras 60 minutos de incubación con GM-CSF, el transporte de DOG decayó significativamente hasta alcanzar valores cercanos a los obtenidos en las células no estimuladas con la citoquina.



**Figura 18. Efecto tiempo-dependiente de GM-CSF en la incorporación de DOG en células de Sertoli 42GPA9.** Las células de Sertoli 42GPA9 fueron incubadas durante 15 minutos en tampón de incubación previo al tratamiento con GM-CSF 6,6 nM. El transporte de 0,5 mM de DOG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de un experimento por triplicado  $\pm$  DS. \*  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSION

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo determinar si GM-CSF es capaz de inducir un aumento en la captación de glucosa mediante la redistribución de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) hacia la membrana celular y si en este proceso participa la vía de supervivencia celular PI 3-quinasa, utilizando para ello como modelo la línea celular derivada de riñón embrionario humano HEK293.

Como ya es conocido, el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago GM-CSF es una citoquina que participa en el desarrollo de la línea hematopoiética mediando la proliferación, maduración y función de estas células a través de la interacción con receptores de la superficie celular. El receptor de GM-CSF se encuentra compuesto de dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  por sí sola es capaz de unir a GM-CSF con una baja afinidad, mientras que en conjunto con la subunidad  $\beta$ , se transforma en un receptor de alta afinidad para GM-CSF. Por otra parte, la subunidad  $\beta$  es además compartida con los receptores de interleuquina 3 (IL-3) e interleuquina 5 (IL-5) (Hayashida *et al.*, 1990; Kitamura *et al.*, 1991).

El factor estimulador de colonias granulocito-macrófago es capaz de activar diversas vías de supervivencia celular, entre las cuales una de las más importantes es PI 3-quinasa. La activación de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) es una de las respuestas celulares inmediatas a la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas, dentro de las cuales se encuentra incluida GM-CSF.

Es importante destacar que ambas subunidades del receptor para GM-CSF no sólo son expresadas en células de origen hematopoiético, en donde fueron descritas por primera vez (Gasson, 1991), sino que son expresadas además en varias células no

hematopoiéticas, incluyendo células de la línea germinal, células endoteliales y células neuronales (Colotta *et al.*, 1993; Konishi *et al.*, 1999; Rauch *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 1998), sin embargo, la significancia biológica de la expresión de estos receptores en células no hematopoiéticas aún no ha sido clarificada. En algunos casos se ha demostrado que induce la migración y proliferación de células endoteliales humanas (Busolino *et al.*, 1991; Colotta *et al.*, 1993), de algunas líneas celulares tumorales, pero la importancia fisiológica y los mecanismos moleculares implicados en estos roles no se conocen.

En el año 1988, Hamilton y colaboradores, estudiaron el efecto del aumento en la incorporación de glucosa en macrófagos, producidos por factores de crecimiento, entre ellos GM-CSF, sugiriendo que esta captación ocurría vía los transportadores facilitativos de hexosas. Asimismo, se ha demostrado que el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF), es capaz de señalar un aumento para el transporte de glucosa en células hematopoiéticas no proliferativas.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha demostrado que en células no hematopoiéticas, como es el caso de las células germinales masculinas, GM-CSF al unirse a su receptor, es capaz de inducir una serie de eventos que conducen finalmente al aumento de la captación de glucosa e incluso de vitamina C, todo esto a través de los transportadores facilitativos de hexosa (Zambrano *et al.*, 2001).

A la fecha han sido descritos catorce isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), dentro de los cuales destacan GLUT1 y GLUT3, que poseen una alta afinidad por glucosa. El primero de ellos, GLUT1, se expresa prácticamente en todos los tejidos, encontrándose en grandes cantidades en los eritrocitos, en tejido fetal,

placenta y riñón, mientras que GLUT3 se encuentra abundantemente en cerebro, placenta y riñón (Uldry & Thorens, 2004).

Se ha observado, por ejemplo, que el transportador facilitativo de glucosa GLUT1, es capaz de translocarse desde compartimentos intracelulares hasta la membrana plasmática en respuesta a IL-3, miembro de la familia de receptores de GM-CSF, como un mecanismo de supervivencia, en un proceso que dependería del citoesqueleto y de la activación de la vía de PI 3-quinasa (Bentley *et al.*, 2003).

Es importante destacar que hasta la fecha los datos recopilados sobre la participación de GM-CSF en el aumento de la supervivencia y los mecanismos inducidos por éste son en células de origen hematopoiético, teniéndose solo algunos datos que sugieren que esta citoquina tendría un papel similar en otros tejidos que expresan su receptor, sin embargo, nada se conoce acerca de las vías de señalización involucradas en sistemas no hematopoiéticos.

Por ello, conociendo antecedentes en los cuales se involucra a GM-CSF como una citoquina capaz de aumentar la supervivencia celular mediante la captación de nutrientes, activando para ello mecanismos de señalización intracelular, se escogió a la línea celular embrionaria de riñón humano HEK293, la cual, según antecedentes previos obtenidos en nuestro laboratorio expresaba el receptor para GM-CSF. De esta forma resultó ser un buen modelo para llevar a cabo estudios sobre el rol que cumpliría el receptor de GM-CSF en células diferentes a las encontradas en el sistema hematopoiético.

El receptor para GM-CSF ha sido ampliamente descrito en el sistema hematopoiético donde fue reportado por primera vez y aunque se pensaba que sólo era

parte de este sistema, se ha logrado demostrar su expresión y funcionalidad en otros tipos celulares. Nuestro laboratorio ha descrito la expresión del receptor para GM-CSF y para los otros miembros de la familia de este receptor como es IL-3 e IL-5, demostrándose además que este receptor es activado y responde al estímulo con el ligando (Rauch *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2003; Zambrano *et al.*, 2001).

En este trabajo se demostró por primera vez mediante análisis de inmunofluorescencia y *Western blot* la presencia de ambas subunidades del receptor para GM-CSF en células HEK293 en cultivo. Los análisis de inmunofluorescencia muestran que GM-CSFr $\alpha$  se encuentra localizado de manera abundante en la región intracitoplasmática y en mucha menor cantidad a nivel de la membrana plasmática celular. Por otro lado, GM-CSFr $\beta$ , presenta una localización muy similar a GM-CSFr $\alpha$ , localizándose en el compartimento intracelular y con un patrón de inmunorreacción punteado, lo que sugiere que esta proteína se encontraría en forma de vesículas al interior de las células, lugar de donde podría ser liberada frente a determinados estímulos extracelulares como GM-CSF.

Una vez determinada la presencia de estas proteínas en células HEK293, fue necesario corroborar la expresión tanto de GM-CSFr $\alpha$  como de GM-CSFr $\beta$  en extractos proteicos totales mediante análisis de *Western blot* y saber además, si la masa molecular obtenida corresponde a la descrita en la literatura para otros tipos celulares. Es así, como los análisis de *Western blot* mostraron la presencia de una señal inmunorreactiva de aproximadamente 80 kDa para la subunidad  $\alpha$  de GM-CSF, masa molecular que concuerda con los datos presentes en la literatura. En ella, se señala que la subunidad  $\alpha$  del receptor de GM-CSF puede presentar diferentes pesos moleculares,

en un rango que va desde los 44 a los 85 kDa, pues es una glicoproteína que posee 11 sitios potenciales de N-glicosilación en su dominios extracelulares (Nicola, 1997). Para la subunidad  $\beta$  de este receptor, mediante esta técnica se obtuvo una banda de 120 kDa, hecho que sugeriría una leve glicosilación de la proteína (Kitamura *et al.*, 1991).

Del mismo modo, se realizaron análisis de inmunofluorescencia y de *Western blot* para detectar la presencia de los transportadores facilitativos de glucosa GLUT1 y GLUT3, dos de los transportadores que presentan mayor afinidad por glucosa con una Km de 5-10 y de 1-2 nM respectivamente. De acuerdo a los antecedentes contenidos en la literatura, las células HEK293 expresan los transportadores GLUT1, GLUT9 (Augustin *et al.*, 2004) y GLUT3 (Datos no publicados).

A través de los análisis de inmunofluorescencia se pudo corroborar que las células HEK293 expresan GLUT1 y GLUT3. En el caso del transportador GLUT1, se observó inmunolocalización positiva tanto a nivel de la membrana plasmática como en la región intracitoplasmática, presentándose en forma de un patrón punteado que hace suponer que este transportador se encontraría contenido al interior de vesículas, en espera de estímulos extracelulares que permitan su liberación. Por su parte, el transportador de glucosa GLUT3 se encontró localizado en regiones muy cercanas al núcleo celular, hecho que sugiere que se encontraría almacenado en el retículo endoplásmico o Golgi, siendo liberado desde allí según los requerimientos metabólicos de la célula. Sin embargo, esta idea es sólo una sugerencia, ya que para su corroboración es necesario utilizar marcadores celulares para este organelo y colocalizar la señal obtenida con la señal observada para el transportador. A continuación, se procedió a confirmar la presencia de estos dos transportadores a

través de análisis de *Western blot*, detectándose dos bandas inmunorreactivas para GLUT1, una de 53 y otra de 55 kDa. La presencia de dos bandas para esta proteína puede deberse a una leve glicosilación, ya que se ha descrito en la literatura que la estructura de GLUT1 y en general de los transportadores de glucosa poseen dos posibles sitios de N-glicosilación, uno ubicado en la posición 45, localizado en el loop extracelular que conecta los segmentos de transmembrana 1 y 2, y un segundo sitio de glicosilación en la posición 411 y que se encuentra ubicada dentro del segmento de transmembrana 11. En ambos casos, el residuo comprometido es una asparragina. De esta forma, GLUT1 puede presentar diferentes pesos moleculares dependiendo del tejido o del tipo celular en que se exprese (Mueckler, 1985). Con respecto al análisis de *Western blot* del transportador de glucosa GLUT3, éste arrojó la presencia de una única banda inmunorreactiva de aproximadamente 53 kDa.

Con el fin de confirmar la expresión de transportadores de glucosa y estudiar las características funcionales de éstos, se realizaron ensayos de transporte basados en el uso de radioisótopos. Para ello se utilizó 3-*o*-metil-D-glucosa (OMG), un análogo de glucosa que no es metabolizado intracelularmente por la célula (Carruthers, 1990; Simpson y Cushman, 1986).

A partir de la cinética de incorporación de 3-*o*-metil-D-Glucosa en células HEK293, se determinó que 15 segundos era el tiempo de incorporación en el cual el proceso se encontraba en la etapa lineal de transporte (velocidad inicial). Posteriormente, se realizó el estudio de saturación de transporte de 3-*o*-metil-D-glucosa utilizando concentraciones crecientes de OMG y midiendo el transporte durante 15 segundos a 20°C. Este análisis arrojó la presencia de un componente saturable con una

Km aparente derivada del ajuste de los datos a una hipérbola rectangular de aproximadamente 1 mM. Debido a que GLUT1 y GLUT3 presentan afinidades muy cercanas con una Km de 1 y 5 mM, respectivamente, se puede sugerir que la Km observada en este análisis corresponde a la suma de las actividades de ambos transportadores, ya que según los análisis de inmunofluorescencia realizados, la expresión de GLUT3 sería algo mayor que la expresión de GLUT1 en células HEK293 en cultivo. Similar resultado se pudo obtener cuando los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de Eadie-Hofstee, resolviendo un solo componente cinético, con una Km muy similar a la obtenida a partir de la hipérbola rectangular. El hecho de observar un solo componente cinético y no dos como hubiera sido de esperar, debido a la presencia de dos transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT3, puede deberse a un problema en la técnica, ya que OMG es un substrato que no se acumula en la célula y que es transportado rápidamente, obteniéndose de esta manera datos que presentan una mayor dispersión que los datos que se podrían obtener con substratos que a diferencia de OMG son acumulables, como es el caso de 2-desoxi-D-glucosa (DOG), siendo mucho más difícil el análisis de los resultados.

Volviendo a la expresión del receptor de GM-CSF, antecedentes en la literatura han reportado la presencia de GM-CSFr en riñón humano de fetos de 8 semanas de gestación a través de análisis de PCR, mientras que la proteína es detectable a partir de la semana 16 de gestación por medio de inmunohistoquímica. Por otra parte, el riñón humano no sería una fuente de producción del factor GM-CSF (Dame *et al*, 1999). Considerando estos datos y para tener un acercamiento fisiológico de la expresión del receptor de GM-CSF en etapas adultas del desarrollo, se realizó un análisis de

inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata. Es así como la inmunohistoquímica mostró que ambas subunidades del receptor de GM-CSF son expresados en etapas adultas del desarrollo. En el caso de GM-CSFr $\alpha$ , ésta se localizó en la médula del riñón, en la región correspondiente a los túbulos colectores. En cuanto a la subunidad  $\beta$  del receptor, ésta solo pudo ser detectada en el epitelio cercano a los glomérulos. En cuanto a la inmunolocalización positiva de las proteínas, la señal inmunorreactiva fue mayor para GM-CSFr $\alpha$  que para GM-CSFr $\beta$ , lo que indicaría que la expresión de la subunidad  $\alpha$  es mayor a la expresión de la subunidad  $\beta$  en el riñón de rata adulta. De igual forma, la literatura ha documentado la expresión tanto de GLUT1 como de GLUT3 en riñón. Por ello, se corroboró esta información realizando un estudio de inmunohistoquímica, el cual mostró que ambos transportadores, GLUT1 y GLUT3 se encuentran localizados en los túbulos colectores, siendo la señal de GLUT1 mayor que la señal observada para GLUT3, lo que estaría indicando que en etapas adultas y en este tejido, GLUT1 se encontraría en mayor abundancia que GLUT3. Con estos resultados se puede sugerir que al expresarse estas proteínas en zonas similares en riñón, ellas se encontrarían estrechamente relacionadas para llevar a cabo sus funciones.

Con respecto a la citoquina, GM-CSF es una glicoproteína con función pleiotrópica que participa en el desarrollo de las células de la línea mieloide. En células humanas, los factores estimulantes de colonias, entre ellos GM-CSF, estimulan el incremento de la captación de glucosa en células blanco, presumiblemente para proveer a la célula de una fuente metabólica para aumentar la actividad celular. En el caso de GM-CSF, estudios en células expresando sólo la subunidad  $\alpha$ , así como el complejo  $\alpha/\beta$  indican que la señalización para aumentar la captación de glucosa es mediada a través de la subunidad

$\alpha$  del receptor de GM-CSF (Spielholz *et al.*, 1995; Nicola, 1997). Así mismo, se ha demostrado que el factor GM-CSF es capaz de estimular el transporte de azúcares y vitamina C en neutrófilos, monocitos humanos, la línea celular HL-60 e incluso en espermatozoides (Rauch *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 1998; Zambrano *et al.*, 2001), todo esto mediado por los transportadores facilitativos de hexosas (Angulo *et al.*, 1998; Vera *et al.*, 1998).

En este punto es importante mencionar, que según análisis de *Western blot* e inmunofluorescencia realizados a las células HEK293 en cultivo, éstas no serían capaces de producir GM-CSF. No obstante, hay que considerar que GM-CSF *in vivo* circula en muy bajas concentraciones, siendo prácticamente indetectable (Hamilton *et al.*, 2004). Por ende, las técnicas utilizadas pueden no haber sido capaces de detectar la presencia del factor, debido a que no son lo suficientemente sensibles para detectar niveles tan bajos de la citoquina. Para ello, existen análisis con mayor sensibilidad, entre los cuales pueden realizarse ensayos de ELISA, que cuenten con estándares de concentración conocida para GM-CSF (Jasper *et al.*, 1996, Brännström *et al.*, 19994). Otra alternativa es realizar análisis de hibridación *in situ* para determinar al menos si las células cuentan con el mensajero para GM-CSF (Robertson *et al.*, 1994).

Luego de haber realizado los análisis de expresión correspondientes y haber establecido las condiciones óptimas para la realización de los estudios cinéticos (15 segundos de captación de OMG a 20°C), se procedió a estudiar un posible efecto de GM-CSF sobre el transporte de OMG en células HEK293, pues como se mencionó anteriormente, este factor ha sido descrito en otros tipos celulares como una citoquina capaz de gatillar una serie de eventos que permiten el aumento de la captación de

glucosa e incluso de vitamina C a través de los transportadores facilitativos de hexosas (Rauch *et al.*, 2004; Spielholz *et al.*, 1995; Vera *et al.*, 1998; Zambrano *et al.*, 2001). Con este fin, se determinó la incorporación de OMG en respuesta a diferentes concentraciones de GM-CSF en un rango de 0 a 10 nM.

Con los experimentos realizados se observó que en células HEK293, GM-CSF es capaz de producir un aumento significativo en la captación de OMG, aumentando su incorporación en prácticamente un 100% en comparación a las células control, todo esto a una concentración de factor de 1 nM. A concentraciones de 2 y 5 nM de GM-CSF, la incorporación de OMG sigue siendo significativamente mayor a la observada en las células no tratadas con la citoquina, aumentando la captación del análogo en aproximadamente 150%. Además se pudo apreciar que a concentraciones más elevadas de GM-CSF, tal como 7 y 10 nM, la incorporación de metilglucosa respecto a las células controles presenta diferencias significativas, aunque disminuye levemente si es comparada con la captación de OMG a concentraciones de 2 y 5 nM de factor. Esta leve disminución podría encontrar su explicación en la internalización del receptor de GM-CSF, producto de su desensibilización a altas concentraciones de su ligando. Así, a través de este análisis se confirmó además que los receptores para GM-CSF son funcionalmente activos en la línea celular HEK293.

Luego de conocer que GM-CSF efectivamente era capaz de gatillar un aumento en el transporte de metilglucosa, se procedió a escoger una concentración fija de GM-CSF y que sea adecuada para la estimulación de las células. De esta forma, el paso siguiente fue determinar el tiempo en que ocurría la máxima respuesta al factor. Con este propósito las células HEK293 fueron incubadas con GM-CSF a una concentración

aproximada de 6 nM a diferentes tiempos, midiéndose la incorporación de OMG en las condiciones ya establecidas. Los resultados indicaron que el factor es capaz de causar un rápido incremento en el transporte de metilglucosa (10 minutos), el cual fue significativo con respecto a las células que no fueron estimuladas con la citoquina. El aumento en la captación de OMG continuó siendo significativo tras 20 y 30 minutos del tratamiento de las células con GM-CSF. En células tratadas con GM-CSF durante 1 hora, la captación de metilglucosa disminuyó significativamente alcanzando valores cercanos a los obtenidos en las células control (no estimuladas con GM-CSF), situación que se mantuvo tras 90 minutos de estimulación de las células con el factor.

Luego de realizado estos experimentos, se concluyó que las condiciones adecuadas para realizar los análisis posteriores eran una concentración aproximada de GM-CSF 6 nM y un tiempo de estimulación de 30 minutos, debido a que en este tiempo se produce la máxima respuesta a la citoquina.

El paso siguiente fue investigar las posibles explicaciones para dar respuesta al aumento en la incorporación de OMG en respuesta a GM-CSF. Una de ellas, fue que la citoquina fuese capaz de producir un aumento en la expresión de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y/o GLUT3. Para ello, las células HEK293 fueron tratadas como se describió en materiales y métodos Sección 3.2.9, para realizar extracción de proteínas totales, separarlas por SDS-PAGE y someterlas a análisis de *Western blot*. Como se pudo apreciar en los resultados, no se observó variaciones en la cantidad total de transportador GLUT1 ni GLUT3 en células estimuladas con GM-CSF respecto a las células control.

Aunque no ocurren cambios en el contenido celular total de los transportadores, el aumento en la incorporación de metilglucosa observado a los 30 minutos de estimulación con el factor, puede explicarse por una redistribución de los transportadores de glucosa en la célula, tal como se ha observado en otros tipos celulares, especialmente en estudios realizados en células de la línea blanca (Bentley *et al.*, 2003). De esta forma, las células fueron sometidas a análisis de inmunofluorescencia para estudiar un posible cambio en la distribución de los transportadores en respuesta al factor. El análisis de las células marcadas con anticuerpo anti-GLUT1 revelaron que a los 30 minutos de estimulación con el factor, las células muestran un alza en la intensidad de fluorescencia intracelular, la cual se presenta en forma de gránulos, además de un notable aumento del transportador GLUT1 en la membrana celular plasmática, al compararlas con las células control. El hecho de que el aumento de fluorescencia se presente en forma de gránulos en la región intracitoplasmática, sugiere que en ausencia de estímulos extracelulares como GM-CSF, las células presentan una reserva del transportador GLUT1 contenido en vesículas intracelulares y que tras la estimulación con el factor, éste puede ser liberado, permitiendo su llegada a la membrana celular plasmática, lo cual explicaría también el aumento de GLUT1 en la superficie de la membrana celular. Este hecho se correlaciona perfectamente con el aumento en la incorporación de OMG producido a los 30 minutos de estimulación con GM-CSF, ya que al existir una mayor disponibilidad del transportador GLUT1 en la membrana, esto permitiría una mayor captación de metilglucosa. También se observó que tras 60 minutos de tratamiento con GM-CSF, GLUT1 aún puede ser encontrado en la membrana celular plasmática, pero en menor

cantidad a la encontrada a los 30 minutos de estimulación. Esto puede correlacionarse en parte con la drástica disminución en la captación de metilglucosa que se observa a los 60 minutos. Sin embargo, esto puede ser explicado también por la internalización de los receptores para GM-CSF, pues es posible que tras 60 minutos de tratamiento con la citoquina, éstos se hayan desensibilizado a la unión de su ligando, por lo cual no se estaría generando una correcta señalización que indique a la célula seguir incorporando metilglucosa. Por otra parte, tras 90 minutos de incubación de GM-CSF, se puede observar que el transportador GLUT1 sigue encontrándose en la membrana, incluso en mayor cantidad que lo apreciado a los 60 minutos, aunque el transporte de OMG revela que no hay un aumento en la incorporación de metilglucosa. Si bien puede haber ocurrido un recambio de los receptores de GM-CSF en la membrana que permita la llegada de más transportador a la superficie celular, hay que considerar que la imagen obtenida por microscopía confocal representa la condiciones de algunas células, mientras que el ensayo de transporte da cuenta de la situación de una población celular.

Del mismo modo, se realizó un análisis de inmunofluorescencia para el transportador GLUT3. Las células estimuladas con GM-CSF por 30 minutos mostraron un aumento considerable en la intensidad de fluorescencia intracelular para este transportador, al compararlas con las células control, en las cuales GLUT3 se encuentra localizado en forma perinuclear, con un patrón granular, sugiriendo que en ausencia de estímulos extracelulares, se encuentra en Golgi y contenido en vesículas, siendo liberado luego que se ha producido el estímulo con la citoquina. Al analizar los resultados de la inmunofluorescencia tras 60 minutos de tratamiento con el factor se

puede observar que la diferencia de localización de GLUT3 en comparación a la encontrada a los 30 minutos no difiere mayormente. El hecho de que se esté pesquisando una mayor intensidad de fluorescencia tras estimular a las células con GM-CSF puede dar cuenta de que en células control, el epítipo contra el cual va dirigido el anticuerpo se encuentre en una determinada conformación y que luego de tratar a las células con GM-CSF el epítipo cambie la conformación que habitualmente posee, permitiendo en ese momento su detección, lo que se ve reflejado entonces en el incremento de la fluorescencia, a cual se suma además a la liberación de los transportadores desde vesículas intracelulares. Por otro lado y tras 90 minutos de incubación con GM-CSF, GLUT3 puede ser observado en regiones cercanas al núcleo celular, imagen similar a lo encontrado en las células control, lo que indicaría que el transportador ha sido internalizado tras haber transportado el OMG, por lo cual no se observa un incremento en la incorporación de metilglucosa.

Con los análisis de *Western blot* e inmunofluorescencia realizados se pudo concluir que el aumento en la incorporación de OMG observada a los 30 minutos en respuesta a GM-CSF es producto a una redistribución de los transportadores de glucosa, especialmente de GLUT1 a la membrana celular plasmática.

En el caso de otras citoquinas como IL-3, miembro de la familia del factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago, ésta ha sido reportada por tener efectos similares que GM-CSF, siendo capaz de mantener proteínas en la superficie celular, no solo a transportadores de glucosa, sino que también a transportadores de aminoácidos, hierro y lipoproteínas de baja densidad (Edinger *et al.*, 2002).

Se sabe además, que la captación de glucosa es crítica para el mantenimiento de los niveles de ATP intracelular y que los diferentes tipos celulares tienen implementadas algunas estrategias para regular estos procesos. Así, la redistribución celular de los transportadores de glucosa en respuesta a GM-CSF en células HEK293 podría ser una de estas estrategias.

Por ejemplo, se ha observado una situación similar a la ocurrida en la línea celular HEK293 en respuesta a GM-CSF, esta vez en adipocitos, en respuesta a insulina, en donde el transportador de glucosa GLUT4 y en menor grado GLUT1 son translocados rápidamente a la superficie celular desde reservas intracelulares (Watson *et al.*, 2004).

Son múltiples las vías de transducción de señales que son activadas por GM-CSF, entre las cuales una de las más importantes es la vía PI 3-quinasa, cuya activación es una de las respuestas celulares inmediatas a la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas. Son cada día más los reportes que implican a PI 3-quinasa en la supervivencia celular al prevenir la apoptosis en varios tipos celulares. Sin embargo, nada se sabe de la activación de estas vías en células no pertenecientes a la línea hematopoiética. Así, el siguiente paso fue establecer si PI-3-quinasa se encontraba involucrada en los eventos inducidos por GM-CSF en células HEK293. Con este fin se utilizó el inhibidor LY294002, un inhibidor sintético de la enzima PI 3-quinasa. Para esto, las células HEK293 preincubadas con el inhibidor LY294002, previo al tratamiento con GM-CSF, para luego medir el transporte de OMG. Los resultados revelaron que en presencia del inhibidor, el transporte de OMG inducido por GM-CSF disminuyó significativamente, alcanzando los valores observados en las células control.

Con esto se concluye que PI 3-quinasa es fundamental para la señalización que provoca el incremento en la incorporación de metilglucosa estimulada por el factor. De esta forma, el siguiente paso fue determinar si la disminución del transporte de OMG inducido por GM-CSF en presencia de LY294002 se veía reflejado en una inhibición de la redistribución de los transportadores GLUT1 y GLUT3. Con este fin se realizó un análisis de inmunofluorescencia a las células tratadas con la citoquina durante 30 y 60 minutos en presencia del inhibidor. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal revelaron que en células estimuladas por 30 minutos con GM-CSF en presencia de LY294002 10  $\mu$ M, la localización subcelular del transportador GLUT1 se asemeja a la de las células control, con una menor intensidad de fluorescencia intracelular y una menor cantidad de transportador ubicado en la membrana plasmática. De este modo los datos sugieren que en presencia del inhibidor de PI 3-quinasa se estaría previniendo la liberación de GLUT1 desde compartimentos intracelulares, por lo que la señalización producida a través de PI 3-quinasa sería fundamental para la liberación de este transportador hacia la membrana celular plasmática. Este hecho se correlaciona con los estudios de transporte realizados en presencia del inhibidor, pues bajo estas condiciones hay una menor cantidad de GLUT1 disponible en la membrana, con lo cual hay una menor incorporación del análogo por parte de las células. El mismo análisis de inmunofluorescencia se realizó para GLUT3, el cual mostró que en células estimuladas con el factor por 30 minutos en presencia del inhibidor, la distribución del transportador es la misma observada en las células control, localizándose en regiones cercanas al núcleo celular.

Los efectos del inhibidor LY294002 observados en los ensayos de transporte y de inmunofluorescencia sugieren fuertemente que la enzima PI 3-quinasa se encuentra involucrada en la regulación del transporte de metilglucosa inducido por GM-CSF, ya que este inhibidor es capaz de prevenir los cambios en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3, produciendo como consecuencia una menor incorporación de OMG.

Aunque en células tratadas con GM-CSF durante 60 minutos no se observó un aumento en la incorporación de OMG, el análisis de inmunofluorescencia reveló la presencia de transportador GLUT1 en la membrana y de aumento en la fluorescencia para ambos transportadores. Por esta razón, se decidió hacer un estudio de inmunofluorescencia para ambos transportadores en presencia del inhibidor. En ambos casos la distribución de éstos, no se vio afectada por LY294002, pesquisándose una situación similar a la encontrada en células solo tratadas con GM-CSF. Estos resultados nos indican varias posibilidades. Una de ellas es que el inhibidor haya perdido actividad luego de haber permanecido 90 minutos en solución. Otra es que la concentración de inhibidor utilizada para este ensayo, es decir, 10  $\mu\text{M}$ , no haya sido suficiente para abolir completamente la actividad de PI 3-quinasa, siendo la actividad residual de esta enzima la que permita que aun sea posible la liberación de ambos transportadores desde compartimentos intracelulares y la presencia de GLUT1 en la membrana celular. Esto puede encontrar apoyo en la literatura, ya que en ella se ha descrito que para terminar completamente con la actividad de PI 3-quinasa se requiere una concentración de LY294002 de 50  $\mu\text{M}$  (Walter *et al.*, 2000). Otra posibilidad es que los mecanismos activados por GM-CSF a los 60 minutos de estimulación y que producen la relocalización de los transportadores en la célula ocurra a través de otras vías de

señalización, como por ejemplo JAK/STAT o MAP/QUINASAS, es por ello que no se observarían cambios con el inhibidor utilizado.

En este punto es importante mencionar los hallazgos encontrados en el trabajo de Bentley *et al.* del año 2003. En este trabajo realizado en un tipo celular derivado de la línea blanca, se encontró que IL-3, un miembro de la familia de citoquinas de GM-CSF es capaz de inducir un aumento en la captación de DOG, mediante la translocación del transportador GLUT1 a la membrana plasmática. Además, se encontró que en presencia de los inhibidores de PI 3-quinasa, LY294002 y Wortmanina, GLUT1 es mantenido en compartimentos intracelulares, con lo cual no se produce el aumento en la captación de DOG. Estos datos sugirieron fuertemente que la activación de PI 3-quinasa es importantísima en los eventos desencadenados por IL-3.

Al comparar los resultados hasta aquí obtenidos en esta tesis, nos podemos dar cuenta de la similitud de algunos resultados, obtenidos esta vez en una línea celular no hematopoiética, en donde, en respuesta ahora a GM-CSF, preferentemente GLUT1 es capaz de cambiar su distribución subcelular, aumentando de esta forma la incorporación de OMG. Por otro lado, también está el hecho de que la incorporación de OMG inducida por GM-CSF disminuya a los valores alcanzados por las células control en presencia del inhibidor de PI 3-quinasa, LY294002.

Interesantemente, la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en los adipocitos también se debe a la estimulación de la actividad de PI 3-quinasa, en este caso inducida por insulina (Khan *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2004).

Los efectores río abajo relevantes de PI 3-quinasa en adipocitos incluyen la proteína serina/treonina quinasa Akt. Esta quinasa es capaz de regular aspectos

esenciales en los procesos de supervivencia regulando el transporte de glucosa en respuesta a insulina, promoviendo que el transportador de glucosa GLUT4 llegue a la superficie celular (Foran *et al.*, 1999).

Conociendo entonces que Akt es un mediador importante en la vía PI 3-quinasa, el paso siguiente fue investigar si esta serina/treonina quinasa es activada en respuesta a GM-CSF y si esta activación ocurre efectivamente a través de esta vía. Con este propósito, se realizaron análisis de inmunofluorescencia a células tratadas con GM-CSF en ausencia o presencia de LY294002, utilizando para ello un anticuerpo dirigido contra el residuo serina 473, indicador del grado de fosforilación de esta proteína.

El análisis de inmunofluorescencia mostró que en células HEK293 estimuladas con GM-CSF durante 30 minutos, la proteína Akt se encuentra activa, lo cual no ocurre en células control y en donde sólo aquéllas en un claro proceso de mitosis tienen a Akt activa. Dicha activación no se produce cuando las células han sido tratadas previamente con el inhibidor de PI 3-quinasa. Estos resultados indican que la activación de Akt se relaciona estrechamente con el aumento en la incorporación de glucosa y la redistribución de los transportadores producida tras el tratamiento por 30 minutos con GM-CSF. Por otro lado, los resultados mostraron que en células estimuladas por 60 minutos con GM-CSF, Akt se encuentra aun más activa y al parecer se estaría translocando al núcleo. Al igual que en el caso anterior, la fosforilación de Akt es prevenida por el inhibidor de PI 3-quinasa. Sin embargo, esta vez, la fosforilación de Akt no se correlacionaría con los eventos inducidos por el factor, pues a los 60 minutos no se produjo un aumento en la incorporación de OMG, al contrario, disminuyó hasta

alcanzar los valores de las células control. Ahora bien, a los 90 minutos de tratamiento con la citoquina no se observó la activación de Akt.

Además, en esta tesis se incorporaron resultados preliminares obtenidos en células de Sertoli 42GPA9, que al igual que las células HEK293, no pertenecen al sistema hematopoiético. Mediante análisis de inmunofluorescencia, fue posible determinar que en este tipo celular también se expresan ambas subunidades del receptor de GM-CSF. En el caso de la subunidad  $\alpha$ , se observó una inmunorreacción positiva en la región intracitoplasmática, cercana al núcleo celular. Por otro lado la subunidad  $\beta$  de GM-CSFr presentó una inmunorreacción positiva en el compartimento intracelular y mucho mayor a la detectada para la subunidad  $\alpha$ , sugiriendo de esta forma, que la subunidad  $\beta$  sería mayoritariamente expresada en este tipo celular. A continuación, se procedió a confirmar la presencia de estas dos subunidades a través de análisis de *Western blot*, detectándose una banda inmunoreactiva para la subunidad  $\alpha$  de 80 kDa y una banda de 110 kDa para la subunidad  $\beta$ .

Por otro lado, y al igual que los estudios realizados en células HEK293, se procedió a ratificar la expresión de dos de los transportadores de mayor afinidad por glucosa, GLUT1 y GLUT3, ya que según antecedentes obtenidos en nuestro laboratorio estos transportadores son expresados en esta línea celular. Así, el análisis de inmunofluorescencia realizado, mostró que el transportador de glucosa GLUT1 se encuentra localizado tanto en la región intracitoplasmática como a nivel de la membrana celular plasmática, expresándose mayoritariamente en esta última región. En el caso del transportador GLUT3, éste se localizó preferentemente en la región intracelular y su patrón inmunoreactivo positivo se presentó en forma de gránulos, sugiriendo que se

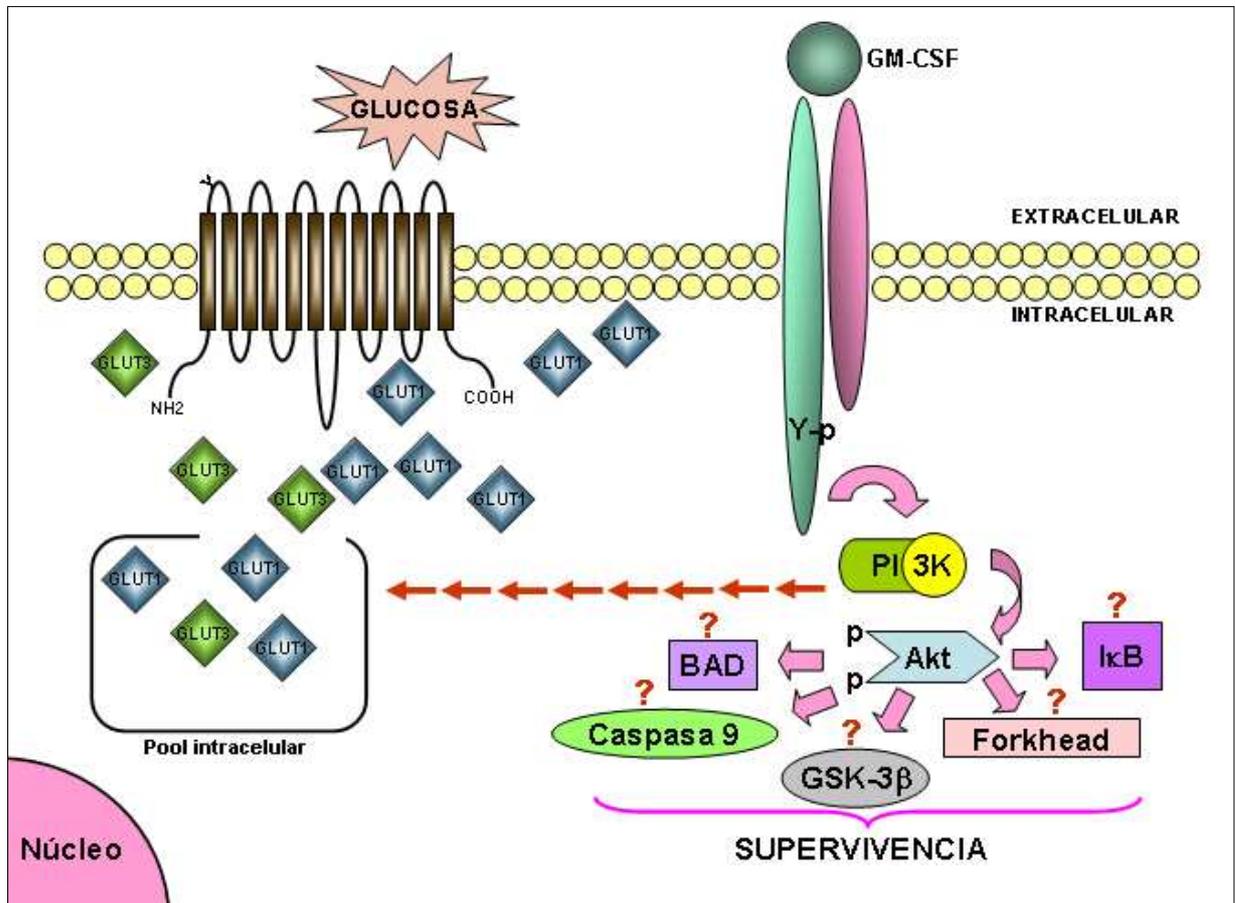
encontraría almacenado en vesículas al interior de las células, en espera de estímulos extracelulares que permitan su liberación. Para ratificar la presencia de ambos transportadores en células de Sertoli 42GPA9, se realizó un análisis de *Western blot* a partir de extractos de proteínas totales, detectándose una única banda de 55 kDa para el transportador GLUT1 y una banda de 54 kDa para GLUT3.

Luego de confirmar la presencia tanto del receptor de GM-CSF como de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, el paso siguiente fue analizar un posible efecto de GM-CSF sobre el transporte de DOG (2-desoxiglucosa) en este tipo celular. Los resultados mostraron que en células de Sertoli 42GPA9, la adición de GM-CSF 6,6 nM es capaz de aumentar significativamente la incorporación de DOG tras 30 minutos de estimulación con GM-CSF, con respecto a las células que no han sido tratadas con la citoquina (células control), similar a lo observado en las células HEK293.

Con estos resultados obtenidos en dos diferentes tipos celulares, se puede sugerir que en células no hematopoiéticas en las cuales se expresa el receptor para GM-CSF, la citoquina sería capaz de aumentar la incorporación de glucosa, de tal forma de promover un aumento de la viabilidad. Para futuros experimentos resta estudiar si el incremento en la incorporación de DOG en estas células tras la estimulación con la citoquina, involucra la translocación de transportadores de glucosa hacia la superficie celular.

Con los resultados obtenidos en esta tesis, se demostró por primera vez que en células HEK293 se expresa el receptor para el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago y que éste es capaz de gatillar un aumento en el transporte de análogos de glucosa, convirtiéndose de esta manera en una gran fuente de energía

para la actividad de las células y por lo tanto, un aumento en la viabilidad celular. Por otra parte, los datos soportan la hipótesis que GM-CSF mediaría principalmente la redistribución de GLUT1 a la membrana celular, regulada por PI 3-quinasa con la participación río abajo de Akt (Ver Fig. 19).



**Figura 19. Posible mecanismo por el cual GM-CSF induce un incremento en la captación de glucosa.** La unión de GM-CSF a su receptor en la superficie de células HEK293 provoca la activación de PI 3-quinasa y de Akt. Esta regulación permite la liberación de transportadores facilitativos de hexosas (GLUT1) desde vesículas intracelulares hacia la membrana celular plasmática, produciéndose un aumento en la incorporación de glucosa y consecuentemente un aumento de la viabilidad celular. (Caspasa: CysteinyI – directed aspartate – specific proteases; GSK-3β: glycogen synthase kinase-3; IκB: Inhibitor of nuclear factor κB).

## 6. BIBLIOGRAFIA

Adachi, T., Alam, R. (1998). The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am. J. Physiol.*, 275, 623-633.

Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.F., Han, J.W., Hemmings, B.A. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 5699-5704.

Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, M., Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.*, 272, 31515-31524.

Angulo, C., Rauch, M.C., Droppelmann, A., Reyes, M.A., Slebe, J.C., Delgado-López, F., Guaiquil, V.H., Vera, J.C. and Concha, I.I. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.*, 71, 189-203.

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Cudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. y Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insuline and IGF-1. *EMBO J.*, 15, 6541-6551.

Al-Shami, A., Naccache, P. (1999). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-activating signaling pathway in human neutrophils. Selective activation of Jak2, STAT 3, and STAT 5. *B. J. Biol. Chem.*, 274, 5333-5338.

Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., García, M.A., Reinicke, K., Rodríguez, F., Vera, J.C., Millan, C., Ulloa, V., Low, M., Martinez, F., Nualart, F. (2005). Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 79, 146-156.

Augustin, R., Carayannopoulos, M.O., Dowd, L.O., Phay, J.E., Moley, J.F., Moley, K.H. (2004). Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J. Biol. Chem.*, 279, 16229-16236.

Baldwin, G.C., Gasson, J.C., Kaufman, S.E., Quan, S.G., Williams, R.E., Avalos, B.R., Gazdar, A.F., Golde, D.W. and DiPersio, J.F. (1989). Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood*. 73, 1033-1037.

Baldwin, G.C., Golde, D.W., Widhopf, G.F., Economou, J. and Gasson, J.C. (1991). Identification and characterization of a low-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary and cultured human melanoma cells. *Blood*. 78, 609-615.

Baldwin, G.C., Benveniste, E.N., Chung, G.Y., Gasson, J.C. and Golde, D.W. (1993). Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood*. 82, 3279-3282.

Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. y Tschlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 254, 274-277.

Bentley, J., Itchayanan, D., Barnes, K., McIntosh, E., Tang, X., Downes, C.P., Holman, G.D., Whetton, A.D., Owen-Lynch, P.J., and Baldwin, S.A. (2003). Interleukin-3 mediated cell survival signals include phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of the glucose transporter GLUT1 to the cell surface. *J Biol. Chem.*, 278, 39337-39348.

Brannstrom, M., Norman, R.J., Seemark, R.F. and Robertson, S.A. (1994). Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol. Reprod.*, 50, 88-94.

Brosnan, C.F., Shafit-Zagardo, B., Aquino, D.A. and Berman, J.W. (1993). Expression of monocyte/macrophage growth factors and receptors in the central nervous system. *Adv. Neurol.*, 59, 349-361.

Burgering, B.M. y Coffey, P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 376, 599-602.

Bussolino, F., Wang, J.M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C.J., Aglietta, M., Arese, P. and Mantovani, A. (1989). Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*. 337, 471-473.

Bussolino, F., Ziche, M., Wang, J.M., Alessi, D., Morbidelli, L., Cremona, O., Bosia, A., Marchisio, P.C., Mantovani, A. (1991). In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J. Clin. Invest.*, 87, 986-995.

Carruthers, A. (1990). Facilitated diffusion of glucose. *Physiol. Rev.*, 70, 1135-1176.

Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Vasquez, O., Aguayo, L.G., Nualart, F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J. Neurochem.*, 7, 815-823.

Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P., Layton, J., Dühren, U., Burgess, A.W., Nice, E. and Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocyte. *J. Biol. Chem.*, 265, 4483-4491.

Coffer, P.J. y Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.*, 201, 475-481.

Colotta, F., Bussolino, F., Polentarutti, N., Guglielmetti, A., Sironi, M., Bocchietto, E., DeRossi, M., Mantovani, A. (1993). Differential expression of the common beta and specific alpha chains of the receptors for GM-CSF, IL-3, and IL-5 in endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 206, 311-317.

Concha, I.I., Velásquez, F.V., Martínez, J.M., Angulo, C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Vera, J.C. and Golde, D.W. (1997). Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood*. 89, 4190-4195.

Crainie, M., Guilbert, L.J. and Wegmann, T.G. (1990). Expression of novel cytokine transcripts in the mouse placenta. *Biol. Reprod.*, 43, 999-1005.

Crosier, K.E., Wong, G.G., Mathey-Prevot, B., Nathan, D.G. and Sieff, C.A. (1991). A functional isoform of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor has an unusual cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 88, 7744-7748.

Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P., Cohen, P., Alessi, D.R. y Lucocq, J. (1999). Role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in regulating the activity and localization for 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.*, 337, 575-583.

Dame, J.B., Christensen, R.D. and Juul, S.E. (1999). The distribution of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Its Receptor in the Developing Human Fetus. *Ped. Res.*, 46, 358-366.

Datta, K., Franke, T.F., Chan, T.O., Makris, A., Yang, S.I., Kaplan, D.R., Morrison, D.K., Golemis, E.A. y Tschlis, P.N. (1995). AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2304-2310.

Dhar-Mascreño, M., Chen, J., Zhang, R.H., Cárcamo, J.M. and Golde D.W. (2003). Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Signals for Increased Glucose Transport via Phosphatidylinositol 3-Kinase- and Hydrogen Peroxide-dependent Mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 13, 11107-11114

Ding, D.X., Rivas, C.I., Heaney, M.L., Raines, M.A., Vera, J.C. and Golde, D.W. (1994). The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 2537-2541.

Doege, H., Bocianski, A., Joost, H.G., Schurmann, A. (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.*, 350, 771-776.

Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., Joost, H.G. (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.*, 275, 16275-16280.

Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G., Schurmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter GLUT 11 encoded by SLC2A11, a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.*, 359, 443-449.

Edinger, A.L. and Thompson, C.B. (2002). Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake. *Mol. Biol. Cell.* 7, 2276-2288.

Fuhrmann, G.F., Volver, B. (1993). Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. *Biochim. Biophys. Acta.* 1145, 180-182.

García, M.A., Salazar, K., Millan, C., Rodríguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Aguayo, L.G., Olate, J., Molina, B., Nualart, F. (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia.* 50, 32-47.

Gasson, J.C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood.* 77, 1131-1145.

Gearing, D.P., King, J.A., Gough, N.M. and Nicola, N.A. (1989). Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J.*, 8, 3667-3676.

Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. and Bell, G.I. (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*. 30, 5139-5145.

Guthridge, M.A., Stomski, F.C., Thomas, D., Woodcock, J.M., Bagley, C.J., Berndt, M.C., Lopez, A.F. (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 family of receptors. *Stem Cells*. 16, 301-313.

Haber, R.S., Weinstein, S.P., O'Boyle, E. and Morgello, S. (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *The Endocrine Society*. 132, 2538-2543.

Hamilton, J.A., Whitty, G.A., Stanton, H. and Meager, A. (1988). Effects of macrophage-colony stimulating factor on human monocytes: Induction of expression of urokinase-type plasminogen activator, but not secretes prostaglandin E2, interleukin-1, or tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Leukoc. Biol.*, 53, 707-714.

Hamilton, J. A., Anderson, G., P. (2004). GM-CSF Biology. *Growth Factors*. 22, 225-231

Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D.M., Arai, K., Yokota, T. and Miyajima, A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87, 9655-9659.

Hirata, A., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Fujita, M., Tsukamoto, O., Wakeno, M., Myoishi, M., Okada, K., Koyama, H., Komamura, K., Takashima, S., Shinozaki, Y., Mori, H., Tomoike, H., Hori, M., Kitakaze, M. (2005). Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 19, 33-40.

Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B. (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Bio. Chem.*, 275, 4607-4612.

Imakawa, K., Helmer, S D., Nephew, K.P., Meka, C.S. and Christenson, R.K. (1993). A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production ovine trophoblast protei-1. *Endocrinology*. 132, 1869-1872.

Joost, H.G. and Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.*, 18, 247-256.

Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chan, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S., Thorens, B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 282, 974-976.

Jung, C.Y. (1996). The facilitative glucose transporter and insulin action. *Exp. Mol. Med.*, 28(4), 153-160.

Kamegai, M., Konoshi, Y., Tabira, T. (1990). Trophic effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on central cholinergic neurons in vitro. *Brain Res.*, 532(1-2), 323-325.

Kanakura, Y., Druker, B., Cannistra, S., Furukawa, Y., Torimoto, Y., Griffin, J. (1990). Signal transduction of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 receptor involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmatic proteins. *Blood*. 76, 706-715.

Kannan, Y., Moriyama, M., Sugano, T., Yamate, J., Kuwamura, M., Kagaya, A., Kiso, Y. (2000). Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor n murine sympathetic neurons. *Neuroimmunomodulation*. 8(3), 132-141.

Kanzaki, H., Crainie, M., Lin, H., Guilbert, L.J., Mori, T. and Wegmann, T.G. (1991). The in situ expression of granulocyte-macrophage colony-estimulating factor (GM-CSF) mRNA at the maternal-fetal interface. *Growth Factors*. 5, 69-74.

Kitamura, T., Sato, N., Arai, K., Miyajima, A. (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell*. 66, 1165-1171.

Kretz, A., Happold, C.J., Marticke, J.K., Isenmann, S. (2005). Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol. Cell. Neurosci.*, 29(4), 569-579.

Kubota, N., Orita, T., Hattori, K. (1990). Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biochem.*, 107(3), 486-492.

Li, Y., Shen, B., Karanes, C., Sensenbrenner, L., Chen, B. (1995). Association between Lyn protein tyrosine kinase (p53/56) and the  $\beta$  subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptors in a GM-CSF-dependent human megakaryocytic leukemia cell line (M-07c). *J. Immunol.*, 154, 2165-2174.

Marks, J., Carvou, N.J., Debnam, E.S., Srani, S.K., Unwin, R.J. (2003). Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *J. Physiol.*, 553, 137-145.

Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., y Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signalling proteins. *Cell*. 73, 629-630.

Medina, R.M. and Owen, G.I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.*, 35, 9-26.

Metcalf, D., Nicola, N. A., Gearing, D. P. and Gough, N. M. (1990). Low affinity placenta-derived receptors for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor can deliver a proliferative signal to murine hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87, 4670-4674.

Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., Arai, K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 295-331.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. and Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 229, 941-945.

Mueckler, M. (1990). Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes*. 39, 6-11.

Nagamatsu, S., Sawa, H., Wakisaka, A. and Hoshino, T. (1993). Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors. *J. Neurochem.*, 61, 2048-2053.

Nicola, N. A. and Metcalf, D. (1991). Subunit promiscuity among hemopoietic growth factor receptors. *Cell*. 67,1-4.

Nicola, N.A. (1997). Guidebook to cytokines and their receptors. New York: Oxford University Press, Sambrook and Tooze Publication. pp 171-177.

Noli, C. (1999). Receptor del factor de estimulación granulocito-macrófago (GM-CSF) en células de la línea germinal masculina. Tesis, Escuela Bioquímica. Facultad de Ciencia. Universidad Austral de Chile, 74 pp.

Rauch, M.C., Brito, M., Zambrano, A., Espinoza, M., Perez, M., Yanez, A., Rivas, C.I., Slebe, J.C., Vera, J.C., Concha, I.I. (2004). Differential signalling for enhanced hexose uptake by interleukin (IL)-3 and IL-5 in male germ cells. *Biochem. J.*, 381(Pt 2):495-501.

Rivas, C.I., Vera, J.C., Delgado-López, F., Heaney, M.L., Guaiquil, V.H., Zhang, R.H., Scher, H.I., Concha, I.I., Nualart, F., Cordon-Cardo, C. and Golde, D.W. (1998). Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in human prostate cancer. *Blood*. 91, 1037-1043.

Roberson, S.A. and Seemark, R.F. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the murine reproductive tract, stimulation by seminal factors. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2, 359-369.

Simpson, I. A. and Cushman, S.W. (1986). Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 1059-1089.

Siren, A.L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., Mennini, T., Heumann, R., Cerami, A.,

Ehrenreich, H., Ghezzi, P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98(7), 4044-4049.

Spielholz, C., Heaney, M.L., Morrison, M.E., Houghton, A.N., Vera, J.C. and Golde, D.W. (1995). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood*. 85, 973-980.

Thorens, B. (1993). Facilitative glucose transporters in epithelial cells. Review *Ann. Rev. Physiol.*, 55, 591-608.

Tsang, V.C., Peralta, J.M. and Simona, A.R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.*, 92, 377-391.

Uldry, M. and Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Eur. J. Physiol.*, 447, 480–489.

VanderHeiden, M.G., Plas, D.R., Rathmell, J.C., Fox C.,J., Harris, M.H. and Thompson, G.B. (2001). Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5899-5912.

Vanhaesebroeck, B., Alessa, D.R. (2000). The PI3K–PDK1 connection : more than just a road to PKB. *J. Biochem.*, 346, 561-576.

Vera, J., Rivas, C., Fischbarg, J. and Golde, D. (1993). Mammalian facilitative hexosetransporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature*. 364, 79-82.

Vera, J.C., Rivas, C.I., Zhang, R.H. and Golde, D.W. (1998). Colony-stimulating factors signal for increased transport of vitamin C in human host defense cells. *Blood*. 91, 2536-2546.

Vestri, S., Okamoto, M.M., de Freitas, H.S., parecida Dos, S.R., Nunes, M.T., Morimatsu, M., Heimann, J.C., Machado, U.F. (2001). Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. *J. Membr. Biol.*, 182, 105-112.

Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, M.P. and Williams, R.L. (2000). Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Cell Press*. 6, 909-919.

Xing, W. & Sairam, M. (2001). Characterization of Regulatory Elements of Ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Receptor Gene: The Role of E-Box in the Regulation of Ovine FSH Receptor Expression. *Biol. Reprod.*, 64, 579-589.

Zambrano, A., Noli, C., Rauch, M.C., Werner, E., Brito, M., Amthauer, R., Slebe, J.C., Vera, J.C. and Concha, I.I. (2001). Expression of GM-CSF receptors in male germ cells and their role in signaling for increased glucose and vitamin C transport. *J. Cell. Biochem.*, 80 (4), 625-634.

Zhang, X. y Vik, T.A. (1997). Growth factor stimulation of hematopoietic cells leads to membrane translocation of Akt1 protein kinase. *Leuk. Res.*, 21, 849-856.