

Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dra. Itona I. Concha
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

Profesor Copatrocinante
Dra. Angara H. Zambrano
Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias

**EFEECTO DE INTERLEUQUINA-3 (IL-3) SOBRE EL
TRANSPORTE DE GLUCOSA. PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS
DE SEÑALIZACIÓN JAK2, PI3K/Akt Y MAPK**

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

PAOLA PATRICIA MURGAS ALCAINO

VALDIVIA – CHILE

2007

Gracias a Dios, a mi ángel Raúl, a mis padres y hermano, por que son el motivo de mi sonrisa y la bandera de lucha en mi vida.

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 Denisse Valladares, Maite Castro, Constanza Angulo y Danai Bücher. Quiero agradecer además a las Doctoras Angara Zambrano y Angélica Hidalgo por toda la ayuda y apoyo brindados durante este trabajo.

También quisiera agradecer de manera muy especial y afectuosa a quienes les debo la fuerza para seguir en los momentos más difíciles, mis amigos y compañeros: Daniella Carretta, Yerko Quitral, Valeria Larenas, Paola Montecinos, Alejandro Barrientos y Víctor Barrientos, por todo su apoyo, fe, cariño, alegría, amistad y consejos brindados a lo largo de estos años de universidad y del desarrollo de este trabajo.

Gracias a todas las personas del Instituto de Bioquímica que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis, especialmente a la Sra Marlys y Eli, por sus palabras de afecto y apoyo.

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

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCION	3
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 Materiales	22
3.1.1 Material biológico	22
3.1.2 Reactivos químicos	22
3.2 Métodos	24
3.2.1 Cultivo de la Línea Celular Embrionaria Humana de Riñón HEK293	24
3.2.2 Cultivo de la Línea Celular de Sertoli inmortalizadas de ratón 42GPA9	24

	Página
3.2.3 Extracción de RNA	25
3.2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa acoplada a Transcripción Reversa (RT-PCR)	25
3.2.5 Inmunofluorescencia	27
3.2.6 Inmunohistoquímica	27
3.2.7 Extracción de proteínas totales	28
3.2.8 Separación electroforética de proteínas	29
3.2.9 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	29
3.2.10 Análisis de <i>Western Blot</i>	30
3.2.11 Ensayos de transporte	31
3.2.12 Análisis estadístico	32

3.2.13 Efecto de Interleuquina 3	32
3.2.14 Efecto de los inhibidores AG490, LY294002 y UO126	33
4. RESULTADOS	33
4.1 Expresión del Receptor de Interleuquina-3 en Células HEK293	33
4.2 Expresión de los Transportadores Facilitativos de Hexosas GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	35
4.3 Expresión del Receptor para IL-3 y de los Transportadores Facilitativos de Hexosas, GLUT1 y GLUT3 en cortes histológicos de riñón de rata adulto	40
4.4 Funcionalidad de los Transportadores Facilitativos de glucosa GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	44
4.5 Efecto de Interleuquina-3 en el transporte de 3- <i>o</i> -metil-D-glucosa en Células HEK293	48

4.6 Efecto de IL-3 sobre la abundancia relativa de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	53
4.7 Efecto de IL-3 sobre la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	57
4.8 Efecto de IL-3 sobre la distribución subcelular de las subunidades α y β del Receptor de IL-3 en Células HEK293	61
4.9 Activación de JAK2 por estimulación de IL-3 en Células HEK293	65
4.10 Participación de JAK2 en el transporte de glucosa inducido por IL-3 en Células HEK293	69
4.11 Participación de PI3-quinasa en el transporte de glucosa por estimulación con IL-3 en Células HEK293	71

4.12 Activación de Akt inducida por estimulación con IL-3 en Células HEK293	74
4.13 Análisis de la activación de la vía PI3K generada por IL-3 en presencia del inhibidor LY294002	77
4.14 Efecto de IL-3 en la localización subcelular de p-Akt en las Células HEK293	79
4.15 Análisis de la participación de la vía PI3K en la abundancia relativa de los Transportadores Facilitativos GLUT1 y GLUT3	82
4.16 Análisis de la participación de PI3K en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293 en respuesta a IL-3	85
4.17 Participación de la vía de señalización MAPK en el transporte de OMG en Células HEK293	89
4.18 Expresión de las subunidades α y β del Receptor para IL-3 en Células de Sertoli 42GPA9	93

	Página
4.19 Expresión de los Transportadores Facilitativos de Hexosas GLUT1 y GLUT3 en Células de Sertoli 42GPA9	97
4.20 Efecto de IL-3 en el transporte de OMG en Células de Sertoli 42GPA9	101
4.21 Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de los Transportadores GLUT1 y GLUT3 en Células de Sertoli 42GPA9	103
5. DISCUSION	107
6. BIBLIOGRAFIA	131

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Tabla que resume las características principales de los Transportadores Facilitativos de glucosa de clase I	19

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Esquema que representa la estructura del Receptor para IL-3	7
FIGURA 2: Modelo que muestra las vías de transducción de señales estimuladas por IL-3	11
FIGURA 3: Esquema que representa la estructura de los Transportadores Facilitativos de Hexosas de Clase I: GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4	18
FIGURA 4: Análisis de la expresión del Receptor para IL-3 en la línea celular HEK293	35
FIGURA 5: Análisis de la expresión de los Transportadores Facilitativos de Hexosas, GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	38
FIGURA 6: Inmunilocalización del Receptor de IL-3 y de los Transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en cortes de riñón de	

	Página
rata adulta	42
FIGURA 7: Caracterización del transporte de OMG en Células HEK293	46
FIGURA 8: Efecto de IL-3 sobre el transporte de OMG en Células HEK293	50
FIGURA 9: Efecto tiempo-dependiente de IL-3 en la incorporación de OMG en Células HEK293	52
FIGURA 10: Efecto de IL-3 sobre la abundancia relativa de los Transportadores, GLUT1 y GLUT3	55
FIGURA 11: Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	59
FIGURA 12: Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de las	

	Página
subunidades α y β del Receptor de IL-3	63
FIGURA 13: Análisis de la activación de la proteína Janus-quinasa-2, JAK2 en Células HEK293 estimuladas por IL-3	67
FIGURA 14: Participación de JAK2 en la estimulación del transporte de OMG inducido por IL-3	70
FIGURA 15: Participación de PI3-quinasa en la estimulación del transporte de OMG inducido por IL-3	73
FIGURA 16: Efecto de IL-3 en la activación de Akt río abajo de PI3-quinasa en Células HEK293	76
FIGURA 17: Efecto de IL-3 en presencia de LY294002 en la fosforilación de Akt en Células HEK293	78

Página

FIGURA 18: Análisis de la activación de la Serina/Treonina quinasa, Akt en Células HEK293 estimuladas con IL-3 a través de la vía PI3-quinasa	80
FIGURA 19: Análisis de la vía PI3K/Akt sobre la distribución relativa de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293	83
FIGURA 20: Participación de la vía PI3K/Akt en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 inducida por IL-3	87
FIGURA 21: Participación de la vía MAP-quinasa en la estimulación del transporte de OMG en Células HEK293 inducido por IL-3	91
FIGURA 22: Inmunolocalización de las subunidades α y β del Receptor de IL-3 en Células de Sertoli 42GPA9 y en cortes de testículo de rata	95
FIGURA 23: Análisis de la expresión de Transportadores de glucosa	

	Página
GLUT1 y GLUT3 en Células de Sertoli 42GPA9	99
FIGURA 24: Estudio cinético de la incorporación de OMG en Células de Sertoli 42GPA9 estimuladas a diferentes tiempos con IL-3	102
FIGURA 25: Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en Células de Sertoli 42GPA9	104
FIGURA 26: Posible mecanismo por el cual IL-3 induce un incremento en la captación de glucosa en la línea celular HEK293	130

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	: Albúmina sérica de bovino
DMSO	: Dimetilsulfóxido
EDTA	: Acido etilendiaminotetracético
GLUT	: Transportador Facilitativo de Hexosa
GM-CSF	: Factor Estimulador de Granulocitos y Macrófagos
GM-CSFr	:Receptor del Factor estimulador de Colonias de Granolicitos y Macrófagos
Hepes	: [N-(2-hidroxietil) piperazina-N`-(2-ácido etansulfónico)]
IL-3	: Interleuquina-3
IL-3r	: Receptor de Interleuquina-3
IL-5	. Interleuquina-5

IL-5r	: Receptor de Interleuquina-5
OMG	: 3- <i>o</i> -metil-D-glucosa
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
Tritón X-100	: Octil fenoxi polietoxietanol

1. RESUMEN

Interleuquina-3 (IL-3) es una citoquina pleiotrópica y su función principal es regular la proliferación y diferenciación de células precursoras linfoides y mieloides así como estimular el funcionamiento de células del sistema inmune maduras. En células no hematopoiéticas, IL-3 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, α y β , y se expresa en precursores y células linfoides maduras, así como en algunas células no hematopoiéticas.

La expresión del receptor de IL-3 en la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) fue demostrada en este estudio. La adición de IL-3 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 Janus quinasa-2, fosfatidilinositol 3-quinasa y MAP-quinasa por AG490, LY294002 y UO126, respectivamente, reveló que estas enzimas son requeridas para la estimulación del transporte de glucosa y la redistribución de estos transportadores. Concluimos que IL-3 está involucrada en la redistribución subcelular de los transportadores facilitativos de hexosas en una forma dependiente de JAK2, PI3K/Akt y MAPK, asegurándose de la administración de un substrato metabólico clave.

SUMMARY

Interleukin-3 (IL-3) is a pleiotropic cytokine and its main function is to regulate the proliferation and differentiation of lymphoid and myeloid precursor cells as well as to stimulate the functioning of mature lymphocytes. In non-hematopoietic cells, IL-3 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, α and β , and it is expressed in precursor and mature lymphoid cells, as well as in some non-hematopoietic cells.

The expression of IL-3 receptor in the human embryonic kidney cell line (HEK293) was demonstrated in this study. The addition of IL-3 signaled an increased glucose uptake through changes in the subcellular redistribution of hexose transporters GLUT1 and GLUT3. The inhibitory effect of Janus kinase-2, phosphatidylinositol 3-kinase and MAP-kinase by AG490, LY294002 and UO126, respectively revealed that this enzyme is required for both IL-3 stimulation of glucose transport and redistribution of these transporters. We conclude that IL-3 is involved in the subcellular redistribution of hexose transporters in a JAK2, PI3K/Akt and MAPK-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 producidas y liberadas por una gran variedad de tipos celulares de diferentes tejidos (Nicola, 1997). Dentro de las citoquinas se agrupan: interleuquinas, quimioquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral (Nicola, 1997). Algunos autores consideran las citoquinas como inmunohormonas que ejercen su acción en forma autocrina o paracrina, permitiendo la comunicación entre células de distintos órganos y produciendo efectos muy variables que comprenden la modulación de la respuesta inmune mediante proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoiéticas así como, la regeneración tisular y la angiogénesis.

Entre las interleuquinas con mayor participación en la maduración de las células hematopoiéticas de la médula ósea se encuentra la Interleuquina-3 (IL-3), conocida también como: factor estimulador de colonias de multi-linajes, factor estimulador persistente, factor estimulador de mastocitos, factor estimulador de crecimiento de células hematopoiéticas, estimulador de la producción celular de histamina, factor estimulador de células madres, hemopoyetina-2, activador sinérgico, entre otras denominaciones (Gasson, 1991). Interleuquina-3, es una citoquina pleiotrópica que participa en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células hematopoiéticas en diversos estados de maduración y regula funciones efectoras de las células mieloides diferenciadas en su estado terminal (Gasson, 1991). Es sintetizada por variados tipos celulares como son los linfocitos T activados, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos entre otros. Su concentración en suero es casi indetectable a excepción de aquellos casos en que ocurran daños extensos, enfermedades infecciosas por parásitos, bacterias o virus, en las cuales hay una masiva activación de linfocitos T y mastocitos.

Esta citoquina 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 IL-3 es su participación en la regulación de la respuesta oxidativa en neutrófilos, estimulando además, la captación de glucosa en células mieloides (McCoy y col., 1997).

IL-3 se encuentra codificada en el cromosoma 5q21-q32 en el humano (Yang et al. 1988); en el ratón está en el cromosoma 11 (Barlow y col. 1987). El tamaño del gen de IL-3, es cercano a los 2,2 kb, y posee 5 exones, su mRNA posee un tamaño de 1 kb y es rico en la secuencia AU en una región no traducible hacia el extremo 3'. Una vez sintetizada esta citoquina es secretada como una glicoproteína relativamente pequeña con una cadena polipeptídica de 140 residuos aminoacídicos en el ratón y 133 en el humano y es altamente glicosilada. Este polipéptido sintetizado tiene una masa molecular de 14 kDa, pero la IL-3 liberada desde su fuente natural tiene un masa molecular de 20 a 40 kDa. Esta variación en la masa se debe a diferencias en el grado de glicosilación (Schrader, 1991) el cual no tiene aparentemente efectos detectables sobre la actividad biológica específica *in vitro* ni *in vivo* y la función de estas extensas modificaciones es aún desconocida. IL-3 es un monómero cuya estructura tridimensional consiste en cuatro α -hélices antiparalelas asociadas por dos puentes disulfuros intramoleculares que le confiere una forma de ovillo, presenta dos sitios activos altamente conservados, en uno de ellos las aminoácidos Pro33 y Leu34 son esenciales para la modulación de su actividad biológica, al igual que la Leu111 ubicada en el segundo sitio activo cerca del C-terminal y que además junto a la Lys110 es fundamental para la unión de la citoquina a la subunidad α del receptor (Lokker y col., 1991).

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 citoplasmáticos 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 y col., 1990).

El receptor para IL-3 (IL-3r) ha sido estudiado intensamente en células progenitoras hematopoiéticas en las cuales fue detectado originalmente. Es un heterodímero que consta de dos subunidades denominadas α (CD123) y β (CDw131), las cuales son proteínas de transmembrana, miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I (Moretti y col. 2001) (Figura 1). Estos miembros contienen dominios extracelulares bastante conservados, los que se denominan módulos de receptor de citoquina (CRMs) (tres en α y cuatro en β) que corresponden a dos repeticiones de un dominio como el de fibronectina tipo II. Estas repeticiones llevan dos conjuntos de motivos típicos muy conservados en esta familia de receptores, el primero de ellos contiene cuatro cisteínas espacialmente conservadas que formarían puentes disulfuros, los que serían importantes para la mantención de la integridad estructural, mientras que la segunda repetición contiene un motivo WSXWS importante para el correcto plegamiento del dominio extracelular de estas proteínas (Moretti y col. 2001).

La subunidad α del receptor de IL-3 tanto en ratón como en humano posee un péptido señal de 16 y 18 aminoácidos, seguido de 396 y 378 residuos aminoacídicos, un dominio extracelular de 315 y 288 aminoácidos, con un único segmento transmembrana de 24 y 20 aminoácidos junto con un dominio citoplasmático de 41 y 52 aminoácidos, respectivamente, en ambas especies (Moretti y col. 2001). La masa molecular deducida es de 41.254 y de 41.215 Da para humano y ratón respectivamente, pero en análisis de SDS-PAGE es de 60-70 kDa. Esto se debe a que posee cinco sitios N-glicosilacilados deducidos (Nicola, 1997). En el dominio N-terminal ubicado en el lado extracelular de la membrana se encuentran sus dos CRMs, uno de los cuales es fundamental para la asociación con su ligando, IL-3; el C-terminal ubicado en la cara intracelular de la membrana plasmática se cree que es importante para el proceso de señalización asociado a

la subunidad β . Esta subunidad α se encuentra codificada en una región pseudoautosomal de los cromosomas X e Y en los seres humanos, específicamente en la región Xp22.3 e Yp11.3, posee 12 exones de aproximadamente 40 kb. La secuencia que codifica para CD123 en ratón se encuentra en el cromosoma 14.

Por otra parte, la subunidad β 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 y col., 1990), posee una secuencia líder de 116 aminoácidos, una única región transmembrana de 27 aminoácidos y una cola citoplasmática de 359 aminoácidos. La masa molecular de la subunidad β es de 110 kDa y en geles de SDS-PAGE su masa molecular aparente es de 120 kDa, hecho que sugiere una leve glicosilación (Kitamura y col., 1991). La subunidad β es compartida por los receptores para GM-CSF, IL-3 e IL-5 (Miyajima y col., 1993) (Figura 1), por ende es denominada subunidad β común (β_c); los ratones y ratas tienen dos subunidades β para IL-3, una subunidad β específica para IL-3 ($IL-3\beta_{IL-3}$) y la subunidad β común ($IL-3\beta_c$). El porqué ambas subunidades β están presentes en las células de murinos aún se desconoce, sólo se sabe que $IL-3\beta_{IL-3}$ a diferencia de $IL-3\beta_c$, es capaz de unir a IL-3 con baja afinidad, aun cuando ambas poseen una identidad de 91% a nivel aminoacídico (Nicola, 1997). Contrariamente a lo que ocurre en murinos, los humanos tienen sólo la subunidad β_c (Kitamura y Miyajima, 1992). Las secuencias génicas para ambas subunidades β en ratón se encuentran estrechamente asociadas en el cromosoma 15 y el gen de β_c humano está en el cromosoma 22q12-13. La estructura exón-intrón de los genes de las β de ratón y rata son 90% idénticas, lo que induce a pensar que ambos genes surgen probablemente por una duplicación luego de la divergencia de los linajes de humano y ratón.

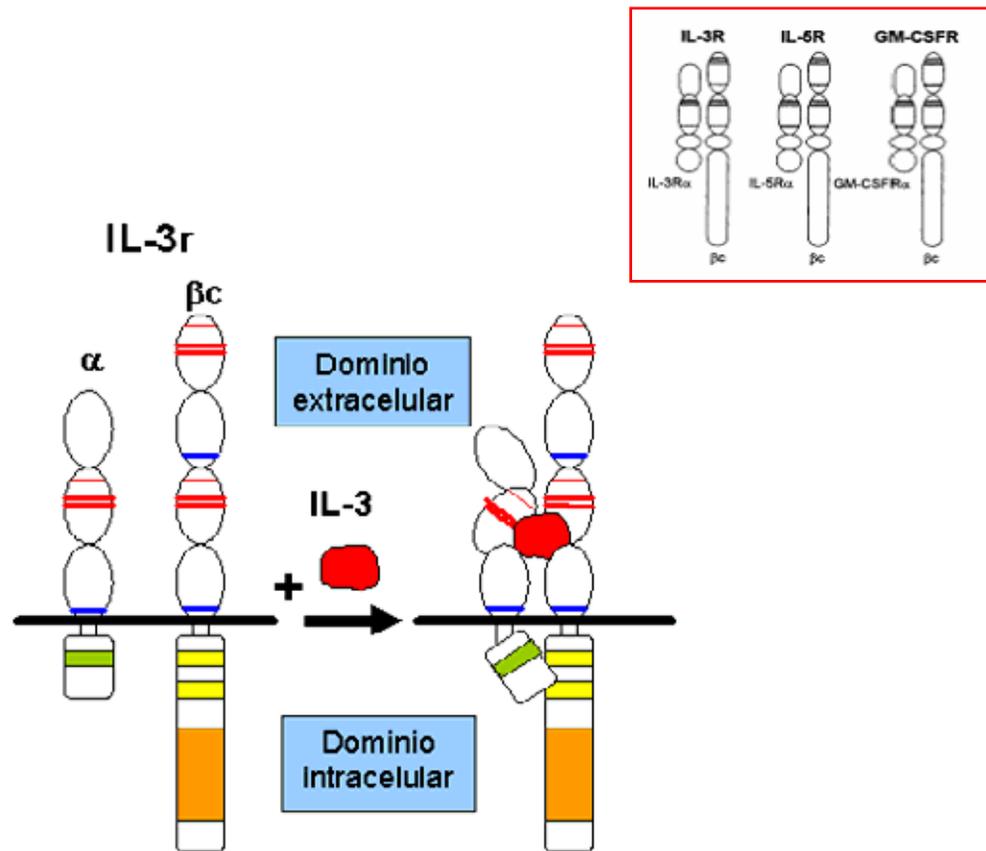


Figura 1. Esquema que representa la estructura del Receptor para IL-3. La figura muestra un esquema del receptor para IL-3, el cual consta de dos subunidades; la subunidad α , que es específica para este receptor, y la subunidad β , que en la mayoría de las especies es compartida con otras citoquinas como GM-CSF e IL-5 (ver recuadro superior). La unión del ligando induce cambios en el receptor que permiten su activación. Adaptado de Miyajima y col., (1993).

IL-3 se une con baja afinidad ($K_d \sim 5 \times 10^{-9} M$) (Gearing y col., 1989) a la subunidad α específica aislada. La subunidad β , que es fosforilable, es incapaz de unir a la citoquina por sí sola, sin embargo, lo hace en complejo con la subunidad α y forma un receptor de alta afinidad ($K_d \sim 10^{-11} M$). La subunidad α es específica para el receptor de IL-3, mientras que la subunidad β , como ya se dijo es compartida con los receptores de GM-CSF e IL-5 (Nicola y Metcalf, 1991), por lo que es denominada subunidad β común (β_c). El dominio C-terminal de la subunidad β del receptor (residuos 626 – 763) es responsable de la fosforilación en tirosina y la activación de las diferentes vías de señalización (Nicola, 1997). Varios estudios en que se han usado dominantes negativos, quimeras o receptores mutantes, demuestran que para generar la activación del receptor y la generación de una cascada de señalización intracelular es necesario que al menos dos subunidades β estén asociadas, es decir que una vez que se ha ensamblado el receptor ocurre una dimerización con otro complejo también de alta afinidad (Mark y col., 1998), por lo que el modelo del receptor estaría formado por 2 ligandos, 2 α y 2 β (2:2:2) (Figura 2). Cuando ocurre esta heterodimerización los dominios de las subunidades β que miran hacia la cara citoplasmática de la membrana celular son capaces de activar diversas rutas de señalización. Es así como IL-3 es conocida por activar a lo menos tres vías de transducción de señales: la vía JAK/STAT, la vía de Ras/MAP-quinasa y la vía de PI 3-quinasa, estas vías no son mutuamente excluyentes y pueden superponerse sustancialmente. Como se dijo anteriormente la subunidad β_c del receptor de IL-3 posee una larga cola citoplasmática la cual es importante para la transducción de señales. Aunque esta subunidad por sí sola no contiene secuencias de consenso o dominios característicos de las proteínas quinasas o proteínas fosfatasa, IL-3 induce una rápida fosforilación en tirosina de la subunidad β y de varias otras proteínas celulares citoplasmáticas, activando genes de respuesta temprana. Entre las proteínas fosforiladas por inducción de IL-3 se incluyen quinasas, como PI 3-quinasa; proteínas adaptadoras, como Grb2; factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, tal como Vav; fosfatasa como SHPTP2 y factores de transcripción como STAT5. Estas fosforilaciones están mediadas por quinasas de

la familia Src asociadas a receptores, de las cuales JAK2 es la más estudiada. JAK2 es uno de los miembros de la familia Janus de tirosinas quinasas que también incluye JAK1, JAK3 y TYK2. Se asocian con la subunidad βc por medio de dos regiones conservadas próximas a la membrana, conocidas como "box1" y "box2". El dominio box1 es el sitio de unión de JAK2, es rico en prolinas y se encuentra en la región más próxima a la membrana (Quelle y col., 1994). El dominio citoplasmático de βc contiene ocho tirosinas, seis de las cuales son conservadas entre los receptores de ratón y el humano. Luego de la activación y fosforilación del receptor por JAK2 y otras tirosinas quinasas, estos residuos de fosfotirosina actuarían como posibles sitios de unión para proteínas con dominios SH2 (Src homólogo 2) o PTB (dominios de unión a fosfotirosinas) (Pawson y Scott, 1997). Un ejemplo de proteína con estos dominios es la molécula transdutora de señal y activador de la transcripción STAT. Estas proteínas STAT al ser fosforiladas se disocian del receptor formando homo y heterodímeros, siendo luego translocados al núcleo, donde son capaces de unirse a sitios específicos en el DNA y activar la transcripción génica. IL-3 es conocida por activar STAT5, demostrándose que seis de los ocho residuos de tirosina de βc llevan al anclaje de STAT5 y su posterior activación.

La vía Ras-Raf-MAP-quinasa (proteína quinasa activada por mitógenos) es otra de las vías de señalización más importantes activada en respuesta a IL-3. Mediante el uso de mutantes en tirosina de βc se ha demostrado la implicancia de Tyr577, Tyr612 y Tyr695 en la activación de esta vía Ras/MAP-quinasa (Sato y col., 1993). La fosforilación en tirosina de estos residuos lleva a la activación de varios componentes incluyendo, Shc, Ras, Raf y MAP-quinasas, donde además participan las proteínas adaptadoras Grb2 y SOS. Esta vía lleva a la regulación de la actividad de diversas proteínas y factores de transcripción relacionados con actividades como la supervivencia, diferenciación y proliferación de las células frente al estímulo producido por IL-3.

La activación de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) es una de las respuestas celulares inmediatas a la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo IL-3. Existen importantes evidencias que implican a PI3K en la

supervivencia celular al prevenir apoptosis (Franke y col., 1997). La activación de PI3K por IL-3 lleva a la fosforilación de fosfoinositoles presentes en la membrana celular, los cuales regulan la actividad de proteínas quinasas, tal como Akt/PKB (Proteína serina/treonina quinasa). PI3K es un heterodímero compuesto por dos subunidades: una proteína reguladora de 85 kDa que contiene 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, ésto es mediado por la unión de los dominios SH2 de p85 a motivos consenso pYXXM en receptores tirosina quinasa activados; por ejemplo el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La p110 es la subunidad catalítica de PI3K, ya que es la que permite la fosforilación de fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP2-4,5) a fosfatidil-inositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3-3,4,5), este último se considera un segundo mensajero ya que es capaz de atraer a la proteína serina/treonina quinasa Akt, hacia la membrana celular y reclutarla para que esta a su vez sea fosforilada en Thr-308 y Ser-473; mientras que los residuos Ser-124 y Thr-450 ya se encuentran fosforiladas de forma basal (Alessi y col., 1996). La fosforilación por la quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) en Thr-308 seguido de una segunda fosforilación en Ser-473 por la quinasa 2 dependiente de fosfoinosítidos (PDK2), activa por completo a Akt y es necesaria para la actividad de Akt tanto *in vitro* como *in vivo* (Anjelkovic y col., 1996; Bellacosa y col., 1991; Burgering y Coffey, 1995; Coffey y Woodgett, 1991). La actividad principal de Akt es continuar con la cascada de fosforilación río abajo de substratos, que pueden incluir Bad, Caspasa 9, miembros de la familia Forkhead, la quinasa I κ B, la quinasa glicógeno sintasa-3, regular además la función de p53, hasta llegar a la activación de factores de la transcripción que estimularán la expresión de proteínas involucradas con la proliferación, supervivencia, diferenciación y motilidad, entre otras actividades.

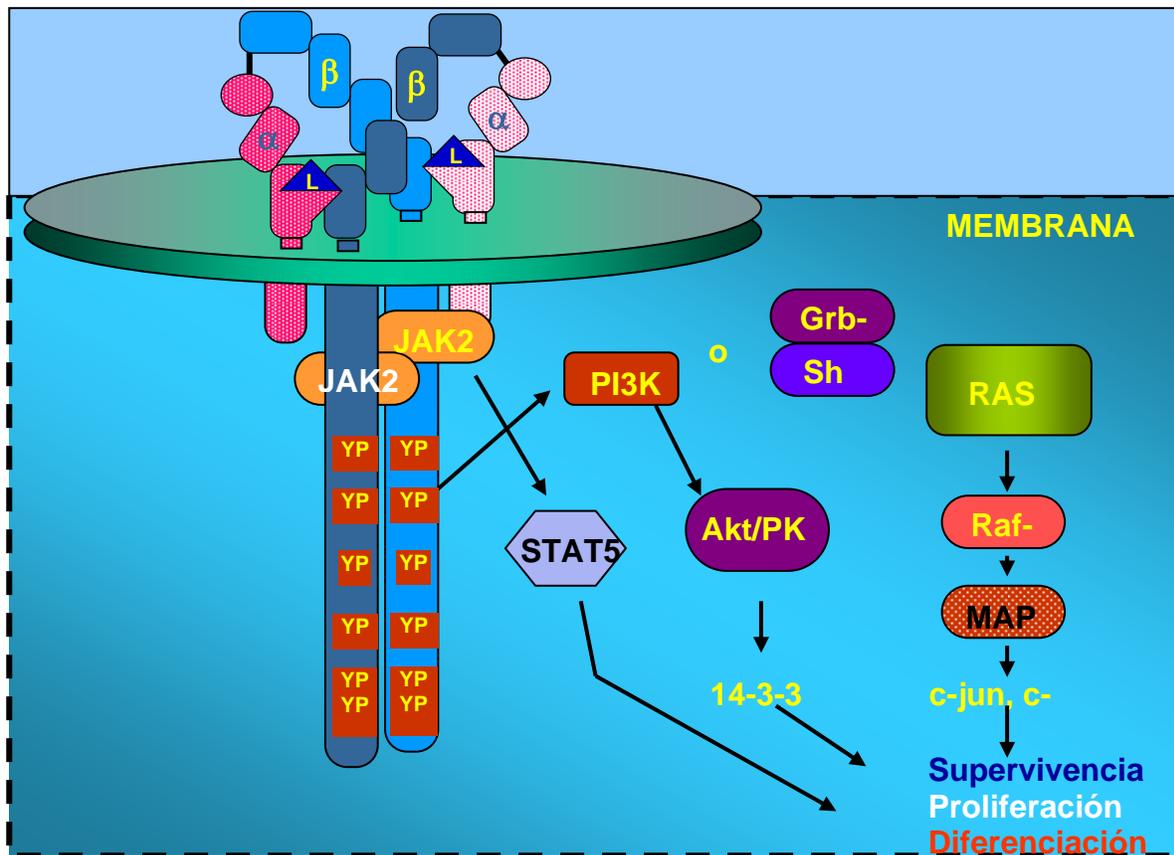


Figura 2. Modelo que muestra las vías de transducción de señales estimuladas por IL-3. La unión de IL-3 a su receptor induce la activación de a lo menos tres vías de transducción de señales, las que incluyen; la vía JAK/STAT, la vía MAP-quinasas y la vía PI 3-quinasa. La fosforilación de varios residuos de tirosina de la subunidad β del este receptor, permite el reclutamiento y subsecuente activación de una variedad de proteínas adaptadores y efectoras. (Guthridge y col., 1998)

Todo lo relacionado a IL-3 y su receptor ha sido ampliamente estudiado en la línea hematopoiética, por ello es importante destacar que ambas subunidades del receptor de IL-3 no sólo son expresadas en células de origen hematopoiético, si no que también son expresadas en varias células no hematopoiéticas incluyendo células endoteliales humanas, trofoblastos de placenta, y células dendríticas (Nicola y col., 1994), algunas neoplasias y líneas celulares tumorales como sarcoma osteogénico, de líneas celulares de carcinoma y de adenocarcinoma, donde puede estimular la proliferación celular. Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado la expresión del receptor de IL-3 en células pertenecientes al sistema nervioso y en espermatozoides (Zambrano y col., 2004). Sin embargo, el papel fisiológico y los mecanismos moleculares implicados en estos roles no se conocen.

A pesar de ser muy escasos los estudios que describen una posible función de IL-3 en sistemas no hematopoiéticos, los pocos resultados parecen ser muy interesantes, evidencias que apuntan por ejemplo, a que IL-3 podría tener un papel trófico en el sistema nervioso central. Existen hallazgos que indican que IL-3 puede afectar a neuronas GABA-érgicas al aumentar significativamente la actividad de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Es así como Moroni y Rossi (1995) describen que IL-3 facilita significativamente la supervivencia de neuronas sensoriales y estimula la formación de la red neural *in vitro*. Hoy en día el estudio de citoquinas no está restringido solamente a sistemas hematopoiéticos, 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 y col., 2005; Kretz y col., 2005; Siren y col., 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 glucosa en la superficie, 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 ésto, 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 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 y col., 2003). En un estudio anterior Bentley y col., (2001) postularon que el aumento de la incorporación de glucosa se debe a un posible aumento en la V_{max} para el sustrato, a través del transportador de glucosa, GLUT1. A modo de ejemplo, 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 α posee sitios de unión a esta quinasa, permitiendo su activación (Dhar-mascareño y col., 2003). Además en este mismo estudio se postula 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, ciertos autores determinaron el aumento de la incorporación de glucosa en macrófagos producido por factores de crecimiento hematopoiéticos, entre ellos, IL-3, demostrándose que el aumento de la captación de glucosa se debe a un efecto sobre los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) (Hamilton y col., 1988). Por otra parte, se ha demostrado que IL-3 y GM-CSF son capaces 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 y col., 1998; Zambrano y col., 2001; Vilanova y col., 2003; Rauch y col., 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 V_{max} o también un incremento en la afinidad de los transportadores (cambios en la K_m), aumento en su expresión o bien cambios en la distribución subcelular de éstos.

Todas las células necesitan energía suficiente para llevar a cabo sus funciones. Uno de los mecanismos de obtención de energía, sería mediante la incorporación de glucosa, la cual es capaz de cruzar las membranas plasmáticas de las células en general gracias a dos sistemas de captación. El primero comprende a un transporte de tipo facilitado que involucra a proteínas transportadoras de glucosa, los GLUTs o SLC2 y el segundo corresponde a un transporte de tipo activo y por lo tanto que requiere de energía, el cual es llevado a cabo por los transportadores de sodio-glucosa o SGLTs. Los transportadores facilitativos de hexosas, constituyen una familia de proteínas de membrana de entre 45 a 55 kDa, de las cuales se han identificado 14 isoformas funcionales, GLUT 1-14 (Doege y col., 2000a; Doege y col., 2000b; Doege y col., 2001; Ibberson y col., 2000; Joost y col., 2002; Joost y Thorens, 2001; Lisinski y col., 2001; Mueckler, 1994; Phay y col., 2000; Rogers y col., 2002; Uldry y col., Wu y Freeze, 2002; Vie-Wyle y col., 2001). Estas proteínas tienen 12 dominios transmembrana con el carboxilo y el amino terminal hacia el lado intracelular de la membrana. El extremo amino terminal posee asociaciones con oligosacáridos localizadas en el primer o quinto "loop" (Figura 3). Basados en su secuencia, las isoformas de GLUTs, se pueden agrupar en tres clases: la clase I comprende del GLUT1 al GLUT4 (Figura 3), la clase II al GLUT6, 8,10 y 12, y la clase III GLUT5, 7, 9, 11 y HMIT, este último perteneciente a la familia génica de este grupo, pero no es un GLUT en sí.

Los GLUTs son capaces de translocar a través de la membrana plasmática sólo los D-enantiómeros de glucosa a favor de un gradiente químico no

dependiente de energía. Todas las células del organismo poseen una o más isoformas de transportadores de glucosa. GLUT1 se encuentra ampliamente distribuido, siendo responsable del suplemento basal de glucosa para muchas células (Thorens y col., 1988). El nivel de su expresión se relaciona con el metabolismo celular de la glucosa por eso es común encontrarlo en células tumorales (Flier y col., 1987) como hepatomas, pero en hepatocitos normales no. Se encuentra además en células normales como el tejido renal (Vestir y col., 2001). GLUT2 ha sido determinado en la membrana basolateral del intestino y también en las células absorbentes del riñón (Thorens y col., 1990); en estas células participa con SGLT1 en el transporte de glucosa en la membrana apical. GLUT3 se expresa principalmente en neuronas y tejido testicular, transportando dicha azúcar a una velocidad aproximadamente siete veces mayor que GLUT1 (Nagamatsu y col., 1993) y además se ha detectado su expresión en espermatozoides (Angulo y col., 1998), músculo esquelético (Stuart y col., 1999) y en los gránulos α de las plaquetas humanas (Heijnen y col., 1997). GLUT4 es el mayor transportador de glucosa en tejidos como el adiposo, tanto pardo como blanco y además del músculo esquelético y cardíaco (Uldry y col., 2003), y también ha sido descrito en cerebelo (Choeiri y col., 2002), mientras que GLUT5 se ha determinado en la región del yeyuno en el intestino delgado, en testículo y espermatozoides, en eritrocitos y su RNA mensajero se ha visto en bajos niveles en tejido renal, músculo esquelético y en adipocitos (Angulo y col., 1998; Concha y col., 1997; Uldry y col., 2003) y también se encuentra en la corteza cerebelar en desarrollo (Nualart y col., 1999). El mRNA de GLUT6 (inicialmente llamado GLUT9) ha sido localizado predominantemente en cerebro, bazo y leucocitos periféricos, pero la expresión proteica no ha sido determinada (Doege y col., 2000b). GLUT7 se ha identificado como un transportador de fructosa similar a GLUT5, pero aún no ha sido investigada su localización (Uldry y col., 2003). GLUT8 se expresa en neuronas excitatorias e inhibitorias del hipocampo (Reagan y col., 2002) y su mRNA se observa en altos niveles en testículo y en niveles bajos en cerebelo, glándula adrenal, hígado, bazo, tejido adiposo y pulmón (Uldry y col., 2003). El mRNA del GLUT9 se ha identificado casi exclusivamente en el tejido

renal y en hígado y en niveles muy bajos en intestino delgado, placenta, pulmón y leucocitos (Phay y col., 2000). El mRNA del GLUT10 se ha detectado en corazón humano, pulmón, cerebro, hígado, músculo esquelético, páncreas, placenta y riñón (Uldry y col., 2003). El mRNA del GLUT11 se ha encontrado en abundancia en músculo cardíaco y esquelético y en niveles no determinados en cerebro, intestino delgado, pulmón, leucocitos periféricos y en niveles bajos en hígado, placenta y riñón (Uldry y col., 2003). La expresión del GLUT12 se ha visto en corazón, músculo esquelético, tejido adiposo pardo, prostático y durante el embarazo en ratas, en la glándula mamaria (Macheda y col., 2003). HMIT, una proteína de transmembrana codificada por el gen SLC2A13, el cual pertenece a la familia de genes de los GLUTs (familia SLC2A), se encuentra altamente expresado en cerebro y en niveles bajos se ha visto en tejido adiposo epididimal pardo y blanco y en tejido renal (Uldry y col., 2003). Sin embargo, HMIT es un transportador de *mio*-inositol y no presenta afinidad por glucosa (Uldry y col., 2001) (Figura 4).

El segundo mecanismo de captación de glucosa corresponde a un sistema de transporte activo, el cual se impulsa por un gradiente electroquímico de sodio, cuya principal función se relaciona con la transferencia de glucosa a través de barreras de células epiteliales, como es el caso de los enterocitos del intestino delgado. Hasta ahora, se han clonado cinco miembros de la familia de co-transportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLTs), SGLT1-5, y se conocen al menos 6 secuencias relacionadas (Kong y col., 1993; McKenzie y col., 1994; You y col., 1995; Wright y col., 2004).

En el tejido renal se ha descrito la expresión de SGLT1, específicamente en los túbulos proximales rectos de este órgano, presentando una alta afinidad por la glucosa, pero una baja capacidad de incorporación; el SGLT2, se encuentra en los túbulos contorneados proximales del riñón, posee una baja afinidad, pero una alta capacidad de incorporación de este azúcar, es el co-transportador que absorbe el mayor volumen de glucosa desde el filtrado glomerular, dejando una mínima cantidad para SGLT1. El SGLT3 es un co-transportador de glucosa-aminoácidos, descrito inicialmente en el riñón de cerdo, en humanos se definió como un co-

transportador de baja afinidad para glucosa, sin embargo aún está siendo estudiado. Para el SGLT4 se desconoce si posee afinidad por esta hexosa, el SGLT5 aún se encuentra en el proceso de caracterización funcional y estructural, por último para el SGLT6 se sabe que posee afinidad por una variedad de sustratos, entre los cuales se cuenta glucosa (Stuart y col., 2003; Wright y col., 2004).

Transportador de glucosa

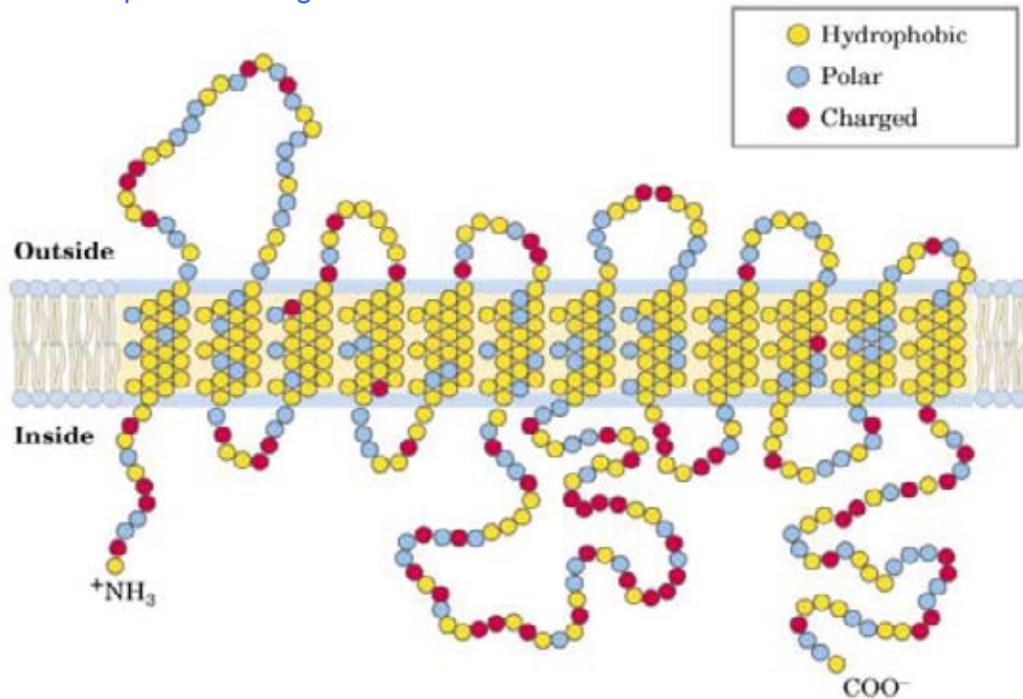


Figura 3. Esquema que representa la estructura de los Transportadores Facilitativos de Hexosas de la clase I: GLUT1, GLUT2, GLUT3 y GLUT4. Como se observa en el esquema estos transportadores de hexosas, presentan los grupos amino y carboxilos terminales hacia la cara intracitoplasmática de la célula. Además esta clase de transportadores se caracteriza por poseer un loop glicosilado entre los dominios 1 y 2 más cercanos al grupo amino terminal. (adaptado de Epanand y col., 2001).

Tabla 1. Tabla que resume las características principales de los Transportadores Facilitativos de glucosa de clase I. Adaptado de Uldry y col., 2004.

Isoformas	Ubicación tisular	Localización cromosomal	Km (mM)	Sustrato de transporte
GLUT1	Universal, eritrocitos, tejido fetal, placenta, cerebro	1p35 – 31.3	5-10	Glucosa, galactosa, manosa y glucosamina
GLUT2	Hígado, células β , riñón, intestino y cerebro	3q26.2 – 27	11-16 / 67	Glucosa, fructosa, galactosa, manosa y glucosamina
GLUT3	Cerebro, placenta, riñón y testículo	12p13.3	1-2	Glucosa, galactosa, manosa y xilosa
GLUT4	Músculo esquelético, corazón y adipocitos	17p13	5	Glucosa y glucosamina

Entre los transportadores de clase I, GLUT3 y GLUT1 parecen estar involucrados en el transporte constitutivo de glucosa, con una Km aparente 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 y col., 1993; Haber y col., 1993), mientras que GLUT1 puede ser encontrado virtualmente en todos los tejidos, principalmente en eritrocitos, tejido fetal, placenta y cerebro (Mueckler y col., 1985; Gould y col., 1991). Se ha observado 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. Además, este proceso dependería del citoesqueleto y la activación de PI 3-quinasa (Bentley y col., 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 podrían participar a la vez, en el aumento de su captación. Es muy importante resaltar que hasta la fecha los datos que se tienen sobre la participación de IL-3 en cuanto a supervivencia y a los mecanismos moleculares inducidos por ésta, se han reportado sólo en células de origen hematopoiético. Se tienen algunos datos que sugieren fuertemente que IL-3 tendría un papel similar en otros tejidos que expresan su receptor, pero nada se conoce acerca de vías de señalización inducidas por esta citoquina en sistemas no hematopoiéticos.

Por ello, teniendo en cuenta que IL-3 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 estudios preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, expresa transportadores de glucosa funcionales. De esta manera, contando con un modelo de trabajo apropiado, se propone la siguiente hipótesis: **“IL-3 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 las vías de señalización JAK2, PI 3-quinasa y MAP-quinasa en células HEK293”**.

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

1.- Demostrar la presencia y localización del receptor de IL-3 y de los transportadores facilitativos de glucosa GLUT1 y GLUT3 en células HEK293.

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

3.- Estudiar el efecto de IL-3 sobre el transporte de hexosas en este modelo.

4.- Estudiar la participación de las vías JAK2, PI 3-quinasa/Akt y MAP-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, Francia.

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-Lisina (masa 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 States Biological (Swampscott, MA, USA)** se obtuvo medio Dulbecco'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 α (V-18) y β (C-20) del receptor de Interleuquina-3, también para la detección de p-JAK2 (Tyr-1007/1008) y p-Akt (Ser-473) se obtuvieron anticuerpos IgG de conejos policlonales contra los residuos fosforilados de ambas proteínas y por último un IgG de conejo policlonal dirigido contra Akt en ausencia de fosforilación. Todos estos anticuerpos a una concentración de 100 mg/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, también los inhibidores de las rutas JAK2, AG490; PI3K, LY294002 y MAPK, UO126, 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® HRP, peroxidasa policlonal.

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- ^3H] glucosa (^3H -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® 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^a, sistema de electroforesis y transferencia Mini Protean® III y Mini Trans Blot de BIO RAD, bomba de vacío GAST® 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™, cámara de flujo laminar Nuaire™ Class II.

3.2 METODOS

3.2.1 CULTIVO DE LA LINEA 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 estreptomicina y 2 mM de L-glutamina. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C y en un ambiente de CO₂ al 5%.

3.2.2 CULTIVO DE LA LINEA CELULAR DE SERTOLI INMORTALIZADAS DE RATON 42GPA9

Las células 42GPA9 fueron cultivadas en DMEM conteniendo suero bovino fetal 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 mg/ml a 34°C y CO₂ 5% (Xing y Sairam, 2001).

3.2.3 EXTRACCION DE RNA

Se obtuvo RNA total a partir de los distintos tipos de cultivos celulares, usando el método de Trizol según lo descrito por Chadderton y col., (1997). Se homogeneizaron $4-10 \times 10^6$ células aproximadamente en 1 ml de reactivo. Se agregó 0,2 ml de cloroformo, agitando las muestras vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y el RNA fue precipitado con isopropanol durante 12 horas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. El RNA fue recuperado por centrifugación a $12,000 \times g$ por 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, se lavó con etanol 75% frío y una vez seco se resuspendió en $50 \text{ } \mu\text{l}$ de agua bidestilada tratada con DEPC. Para determinar la concentración y pureza del RNA se determinó el espectro de absorción entre 230 y 320 nm. Para el cálculo de la concentración se supuso que una unidad de absorbancia a 260 nm es equivalente a $38 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de RNA. Las preparaciones de RNA así obtenidas mostraron una razón de absorbancia 260 nm/280 nm en el rango de 1,9-2,0.

3.2.4 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA ACOPLADA A TRANSCRIPCION REVERSA (RT-PCR)

Para la transcripción reversa, de acuerdo a lo descrito por Castro y col., (2001) se obtuvo $1 \text{ } \mu\text{g}$ de RNA total extraído de las células HEK293 y de Sertoli, se incubaron en $20 \text{ } \mu\text{l}$ de volumen de reacción que contiene 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTPs, 200ng de hexanucleótidos y 50 unidades de la enzima transcriptasa reversa (M-MuLV) a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, luego a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min y $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. En forma paralela se realizó el mismo procedimiento en ausencia de la enzima transcriptasa reversa para descartar la presencia de contaminación con DNA (cDNA RT(-)).

Para la reacción de amplificación, se utilizaron partidores diseñados para amplificar segmentos internos de rGLUT1, rGLUT3, rIL-3 α e rIL-3 β . Para controlar la integridad de los cDNAs, se llevaron a cabo reacciones de amplificación

utilizando partidores diseñados para amplificar el gen que codifica para β -actina. En todos los casos, se incubó una alícuota de cDNA en un volumen de 12,5 μ l que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 0,6 mM, 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa y los partidores específicos que se detallan a continuación:

GLUT1	Sentido: 5' cat gta tgt ggg gga ggt gt 3'
	Antisentido: 5' gac gaa cag cga cac cac ag 3'
GLUT3	Sentido: 5' ggg cat gat tgg ctc ttt tt 3'
	Antisentido: 5' ggg ctg cgc tct gta gga ta 3'
IL-3r α	Sentido: 5' tgacctcgacactgtccttg 3'
	Antisentido: 5' cgtagccactgaagtcacca 3'
IL-3r β	Sentido: 5'atacacgattttccatcacaacg3'
	Antisentido: 5'tagatgctgttggttaggaatag3'

Para cada reacción de amplificación se siguieron los siguientes protocolos:

- i) GLUT1: Se realizaron 35 ciclos incubando a 94°C durante 15 segundos, a 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos.
- ii) GLUT3: Se realizaron 35 ciclos incubando a 94°C durante 45 segundos, a 60°C durante 45 segundos y 72°C durante 30 segundos.
- iii) IL-3r α : Se realizaron 30 ciclos incubando a 94 °C durante 50 segundos, a 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto.
- iv) IL-3r β : Se realizaron 30 ciclos incubando a 94 °C durante 50 segundos, a 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto.

Los productos de amplificación obtenidos se resolvieron en geles de agarosa al 1,5% que contenían bromuro de etidio 0,2 mg/ml.

3.2.5 INMUNOFLUORESCENCIA

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, previamente cubiertos con poli-L-lisina. Las preparaciones fueron fijadas con Histochoice, previo lavado con PBS 0,1M (pH 7,4, 320 mOsm). Posteriormente se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 al 0,3% en PBS 0,1M, de manera de facilitar el acceso a antígenos intracelulares. Los preparados celulares fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (BSA 1% y leche descremada 5% en PBS 0,1M). 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, anti IgG de pollo conjugado a Alexa fluor 488, anti IgG de cabra conjugado a Alexa fluor 488 o anti-IgG de ratón conjugado a Alexa fluor 596, según fuera el caso, en una dilución 1/300 en solución de bloqueo. En algunos casos, los núcleos fueron teñidos utilizando ioduro de propidio 1,7 µg/ml. Las muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia DAKO y visualizadas utilizando un microscopio confocal invertido (García y col., 2005).

3.2.6 INMUNOHISTOQUIMICA

La localización de diferentes proteínas fue analizada por estudios de inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata y ratón incluidos en parafina (Zambrano y col., 2001). Se procedió a desparafinizar 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 H₂O 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 citratada y se lavó con H₂O destilada durante 5 minutos. La peroxidasa

endógena del tejido fue inactivada por la incubación con H_2O_2 al 3% por 5 minutos a temperatura ambiente, con un posterior lavado con H_2O destilada y otro con PBS 1X. Posteriormente, los cortes fueron bloqueados por 1 hora a $37^\circ C$ con solución de PBS 1X conteniendo 1% BSA, 5% leche descremada y 0.3% Triton X-100. Los cortes fueron incubados toda la noche a $4^\circ C$ con los diferentes anticuerpos primarios. Los anticuerpos fueron diluidos a 1:500 en solución de PBS conteniendo 1% BSA, 5% leche descremada y 0,3% Triton X-100. La incubación del segundo anticuerpo y el revelado fue realizado por la utilización del sistema *DAKO^R 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/cabra biotinilados para luego ser incubadas con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa. La reacción se completa al incubarse la muestra con un sustrato cromógeno, desarrollándose la reacción de color usando 3,3'-diaminobenzidina (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 CitosealTM y cubreobjetos, para ser observados bajo microscopía óptica a 100 y 250 X de magnificación en un microscopio marca 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 se tiñeron con hematoxilina, y posterior a esto se realizó un viraje de color con borato de sodio.

3.2.7 EXTRACCION DE PROTEINAS TOTALES

Las células en cultivo, previamente lavadas con PBS 1X (pH 7,4, 320 mOsm), fueron despegadas de las placas de cultivo utilizando tripsina-EDTA 0,25% (p/v). El sedimento celular fue resuspendido en tampón A (Tris/HCl 20 mM [pH 7,2], MgCl 2mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150mM y DTT 1mM, PMSF 100 µg/ml, aprotinina 2 g/ml, peptatina A 1µg/ml y leucepeptina 2 µg/ml) y se dejó en

reposo a 4°C hasta disgregar completamente. Los homogeneizados fueron centrifugados a 14.000 x g durante 15 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*.

3.2.8 SEPARACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS

Se realizaron las separaciones electroforéticas de las proteínas extraídas en geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al procedimiento descrito por Angulo y colaboradores (1998). 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 10% conteniendo Tris (pH 8,8) 375 mM; SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. 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 50µg a 100µg y se les agregó tampón muestra (Tris 500 mM pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 700 mM, pironina 0,8 mg/ml) a cada una. Las muestras fueron colocadas en el gel realizándose la electroforesis a 30 mA por 1 hora en tampón Tris [pH 8,3] 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1%. Las proteínas separadas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF.

3.2.9 TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANAS DE PVDF

Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransfirieron a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno; 0,45 micrones de poro, 100-145 µm de espesor), según lo descrito por Rauch y col., (2004). Para ello, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris [pH 8,3] 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% y metanol 20%) se depositó secuencialmente: un trozo de papel de filtro (Whatman n° 1), la membrana de nitrocelulosa, el gel a transferir y otro papel de filtro. 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 fue teñido con solución de azul de Coomassie (30% metanol y 10% ácido acético) durante tres horas, y luego desteñido en una solución que contenía 30% de metanol y 10% de ácido acético.

3.2.10 ANALISIS DE WESTERN BLOT

Para los análisis de *Western blot* las membranas se incubaron con 10 ml de solución de bloqueo PBS-Tween 20 (Tween-20 0,3%, BSA 1% y leche descremada 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se incubaron las membranas con anticuerpos primarios de interés anti-IL-3 α , anti-IL-3 β , anti-p-Akt, anti-Akt, diluidos 1:500 – 1:1000 en solución de bloqueo, durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente. Finalizado este periodo, las membranas se lavaron tres veces en PBS-Tween-20 (Tween-20 0,1%) y se incubaron con anti-IgG de conejo o cabra conjugado a peroxidasa (1:5000 en solución de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 por 20 minutos cada lavado. El revelado del conjugado se realizó utilizando un método de quimioluminiscencia, el cual se basa en la emisión de luz no radiactiva detectando antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con peroxidasa. Se vertió sobre las membranas una solución que contenía peróxido de hidrógeno y luminol. Luego de 1 minuto, se expuso durante 10-15 minutos un film fotográfico con la membrana tratada con luminol. La reacción fue revelada con reactivo D₇₂ y fijada con reactivo U₃.

3.2.11 ENSAYOS DE TRANSPORTE

Para los ensayos de transporte los distintos tipos celulares fueron crecidos 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 12 pocillos, las cuales fueron cuantificadas 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 y colaboradores (2001). Las células fueron lavadas con tampón de incubación (Hepes 15 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 0,8 mM, pH 7,4, 320 mOsm) e incubadas en esta misma solución durante 1 hora a 37°C para permitir el equilibrio entre los espacios extra e intracelular. Luego de este periodo, se realizaron los ensayos de captación en 500 µl de tampón de incubación que contenía 1 µCi de D-3-O-[metil-³H] glucosa. La reacción fue detenida con tampón de incubación frío que contenía HgCl₂ 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 y col., 2005; Castro y col., 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 Volver, 1993). En los ensayos de inhibición, las células fueron pre-incubadas con tampón de incubación durante 60 minutos a 37°C y luego durante 30 minutos en presencia LY294002 y UO126, o bien, fueron co-incubadas a una concentración aproximada de IL-3 6 nM.

3.2.12 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos de todas las gráficas fueron presentados como promedio \pm desviación estándar. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba t-student o por análisis de variancia (ANOVA seguido del test de Bonferroni), utilizando el programa GraphPad Prism 3.0. Para los análisis de regresión hiperbólica, ajustes a curvas exponenciales y regresión lineal se utilizó el programa Sigma Plot 9.0.

3.2.13 EFECTO DE INTERLEUQUINA 3

Después de 3 días de crecimiento en el caso de las células HEK293 y de 7 días para las células de Sertoli se les adicionó medio de incubación (descrito en los ensayos de transporte) durante 1 hora, luego de esto, se les adicionó la citoquina IL-3 (6 nM) durante periodos de 30, 60 y 90 minutos. Después de estos tiempos de estímulo, se realizaron los ensayos de transporte, las inmunodetecciones y la extracción de proteínas totales descritas en el texto.

3.2.14 EFECTO DE LOS INHIBIDORES AG490, LY294002 y UO126

Para determinar la participación de alguna(s) vía(s) de transducción de señal implicada(s) en el efecto de IL-3, las células fueron tratadas durante 1 hora con medio de incubación y luego con inhibidores específicos, 30 minutos previos a la incubación con IL-3, 6 nM, posterior a esto se procedió a la extracción de proteínas, a los ensayos de transporte y a las inmunodetecciones. Los inhibidores utilizados fueron AG490, LY294002 y UO126 en una concentración de 10 μ M. El agente químico AG490 inhibe específicamente la activación de JAK2, el segundo de ellos LY294002 es un inhibidor específico para la vía de la PI 3-quinasa y UO126, específico para la inhibición de ruta de las MAP-quinasas.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESION DEL RECEPTOR DE INTERLEUQUINA-3 EN CELULAS HEK293

Una de las herramientas más ampliamente utilizadas en biología celular y molecular son las líneas celulares, ya sea provenientes de células tumorales o de células inmortalizadas, cuyas ventajas son su gran capacidad proliferativa y su fácil manejo.

La línea HEK293, deriva de tejido renal humano en etapa embrionaria, son células inmortalizadas mediante la transformación con un adenovirus (Graham y col., 1977), presentan una morfología similar a células epiteliales siendo usadas normalmente en el laboratorio para la realización de estudios funcionales que se relacionan a la expresión de proteínas y quimeras. Se ha descrito que expresan una variedad de receptores relacionados al sistema inmune como son receptores del factor de necrosis tumoral, el receptor de Interleuquina-4, el de Interleuquina-7, y la cadena α del receptor de Interleuquina-11, pero aún no se ha reportado la existencia del receptor de IL-3 ni menos el efecto de esta citoquina, por lo que representan un modelo de estudio de células no hematopoiéticas bastante apropiado para esta tesis.

El receptor de Interleuquina-3 (IL-3r) se expresa en la mayoría de las células precursoras hematopoiéticas y en células hematopoiéticas maduras. En nuestro laboratorio se ha descrito en células del sistema nervioso (Zambrano y col., 2004), pero no se tenían antecedentes en las células HEK293.

Para cumplir con los objetivos propuestos, se determinó la expresión del receptor de IL-3 en este modelo de estudio. Se realizó un análisis de inmunofluorescencia para determinar la existencia de las proteínas correspondientes a las subunidades α y β del receptor para IL-3, para lo cual se

utilizaron los anticuerpos anti-IL-3 α y anti-IL-3 β descritos en materiales y métodos. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488. La inmunofluorescencia para IL-3 α y IL-3 β (**Figura 4, panel A y B**), evidenció que estas proteínas son expresadas en las células HEK293. Se pudo observar que para la subunidad α del receptor de IL-3, las células presentan un patrón inmunorreactivo positivo en la región intracitoplasmática y a nivel de la membrana plasmática (**Figura 4, panel A**). Por su parte, la subunidad β de este receptor (**Figura 4, panel B**) presentó un patrón inmunorreactivo positivo localizado en zonas muy similares a las detectadas en el caso de la subunidad α , presentando un patrón de reacción punteado, sugiriendo que esta proteína podría encontrarse en vesículas citoplasmáticas. 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 sometidos 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 α y la subunidad β , respectivamente, del receptor para IL-3. La masa molecular aparente para la subunidad α fue de 42 kDa y para la subunidad β fue de 120 kDa, lo que concuerda con lo descrito en la literatura para otros tipos celulares.

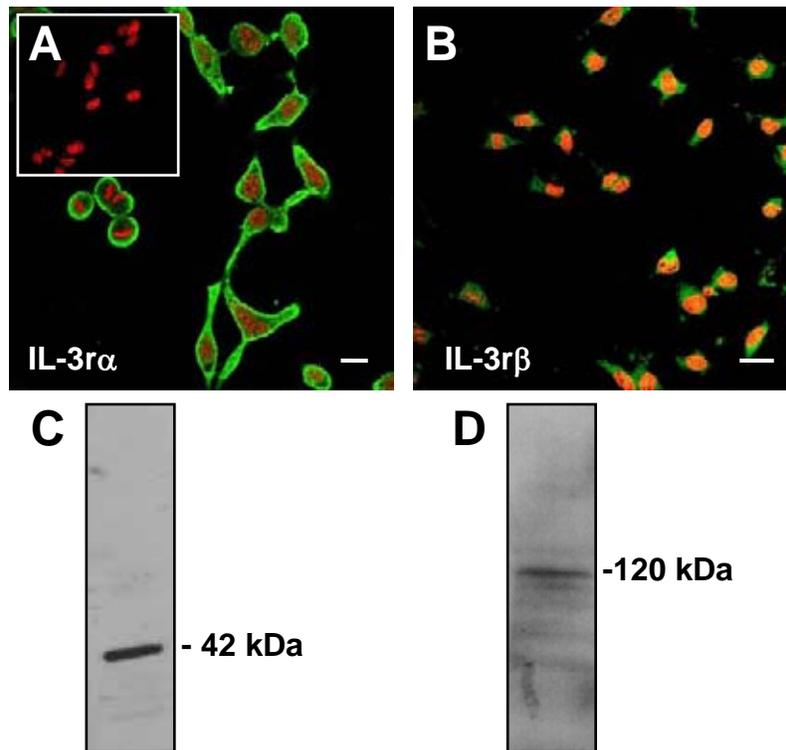


Figura 4. Análisis de la expresión del Receptor para IL-3 en la línea celular HEK293. **A. B.** Análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-IL-3 α (**A**, verde) y anti-IL-3 β (**B**, verde). El control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (inserto panel **A**). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10 μ m. **C. D.** *Western blot* para detectar IL-3 α (**C**) y IL-3 β (**D**) a partir de extractos totales de células HEK293.

En base a los resultados arrojados por los ensayos de inmunofluorescencias y de *Western blots* expuestos arriba, se puede decir que las células HEK293 expresan ambas subunidades del receptor de IL-3, α y β c, y que su localización en este modelo se observa a nivel intracelular, perinuclear y en regiones cercanas a la membrana plasmática.

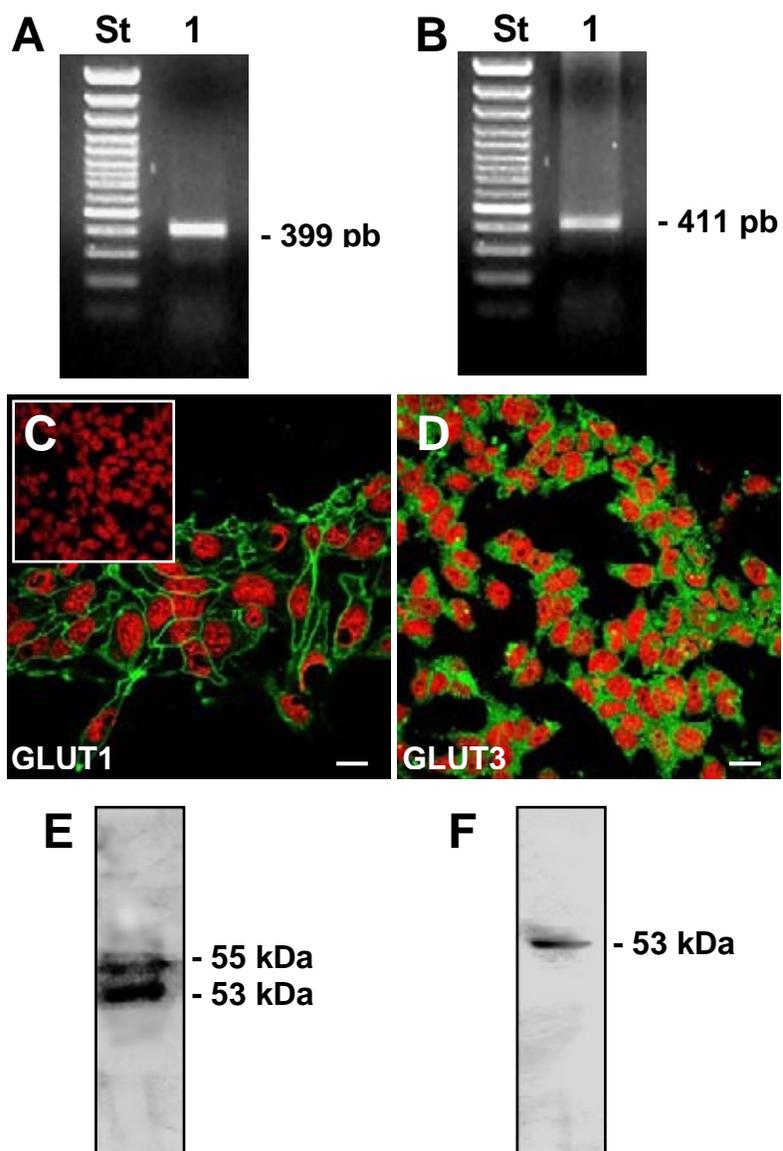
4.2 EXPRESION DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS GLUT1 Y GLUT3 EN LAS CELULAS HEK293

En tejido renal se ha descrito la expresión de varias isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas, entre los que se encuentran GLUT1 (Vestir y col., 2001), GLUT2 (Marks y col., 2003; Vestir y col., 2001), GLUT9 (Augustin y col., 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 y col., 2004) y de GLUT3 (datos no publicados).

Para continuar con los objetivos de esta tesis fue necesario controlar que los cultivos de HEK293 fueran un modelo experimental válido desde el punto de vista de la expresión y funcionalidad de los transportadores de glucosa y del receptor de Interleuquina-3. Por este motivo, se contempló el estudio de la expresión de GLUT1 y GLUT3 a través de análisis de RT-PCR, inmunofluorecencia y *Western blot*. Según los análisis de RT-PCR a partir del RNA total extraído de las células HEK293 se detectó la existencia del RNA mensajero perteneciente a GLUT1 y a GLUT3 correspondientes a los productos de 559 pb y de 366 pb (**Figura 5, paneles A y B, carriles 1**, respectivamente). Se usó como control negativo del análisis un cDNA RT (-), es decir la reacción de RT-PCR en ausencia de la transcriptasa reversa, en el cual no se observó producto de amplificación en las células HEK293 (datos no mostrados). Los ensayos de inmunofluorescencia en las mismas células muestran una reacción positiva localizada tanto a nivel citoplasmático, en donde la reacción se presentó en forma

de gránulos, como a nivel de la membrana plasmática para la proteína GLUT1 (**Figura 5, panel C**). De la misma forma se detectó la presencia de GLUT3 (**Figura 5, panel D**), localizándose en forma abundante a nivel de la región citoplasmática en zonas 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 E**), mientras que para el caso de GLUT3 (**Figura 5, panel F**), 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, inserto panel A**).

Figura 5. Análisis de la expresión de los transportadores facilitativos de hexosas, GLUT1 y GLUT3, en células HEK293. A. B. Análisis de RT-PCR, en el carril 1-A el producto de amplificación de 556 pb, correspondiente al GLUT1, en el carril 1-B el producto de amplificación de GLUT3 de 411pb. En los paneles **C. D.** se observa la inmunolocalización positiva (verde) de los transportadores GLUT1 y GLUT3, respectivamente, los núcleos (rojo) fueron teñidos con yoduro de propidio en las células HEK293. Control negativo, inserto C, en ausencia del anticuerpo primario. En los paneles **E. F.** se observan ensayos de *Western blot*, el GLUT1 presenta bandas de 53 kDa y 55 kDa (*E*), y el GLUT3 de 55 kDa (*F*).



En base a los resultados obtenidos, se puede decir que las células HEK293 expresan los transportadores facilitativos de glucosa GLUT1 y GLUT3 y que su localización es notable en membranas internas y a nivel de la membrana plasmática.

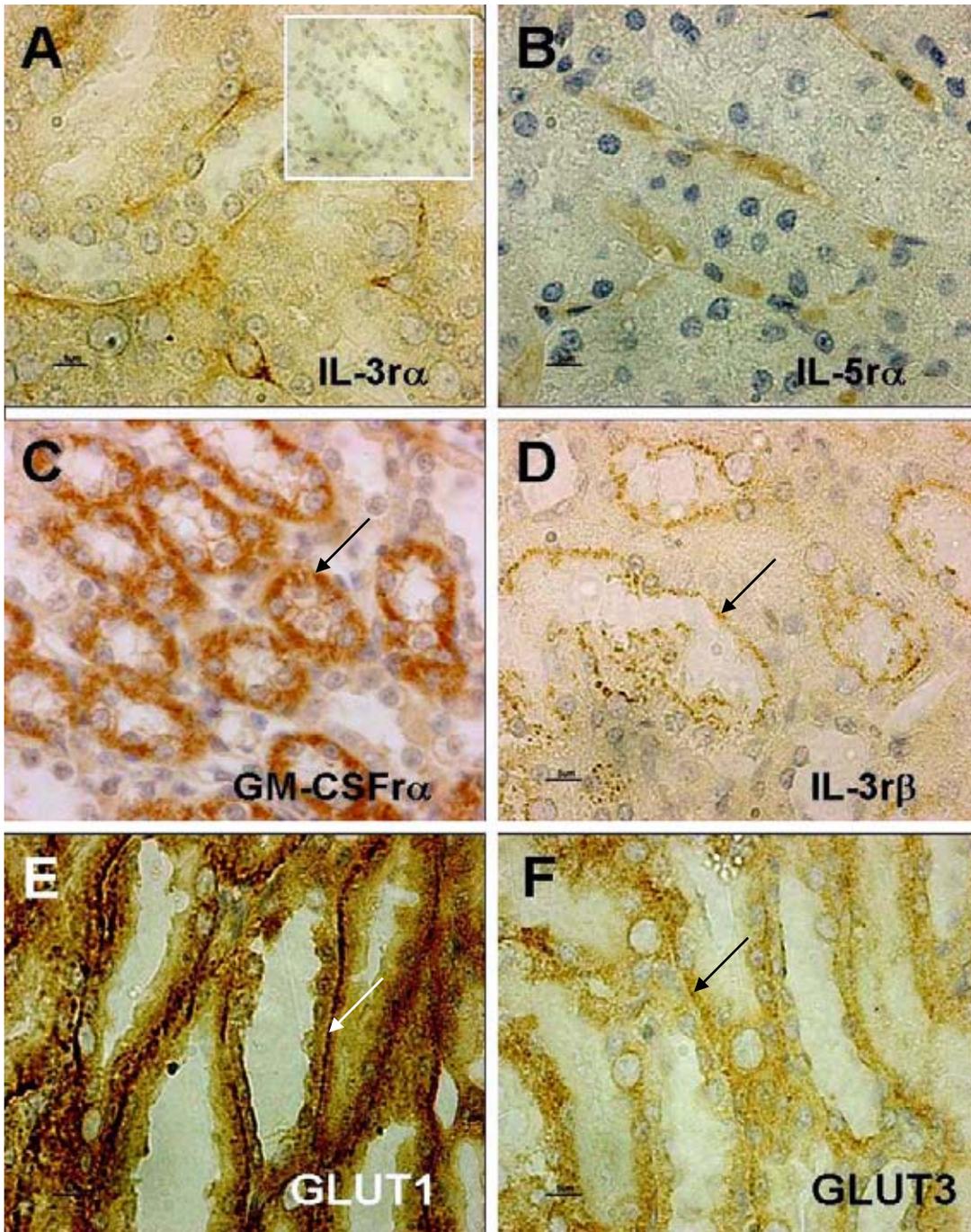
4.3 EXPRESION DEL RECEPTOR PARA IL-3 Y DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS, GLUT1 Y GLUT3 EN CORTES HISTOLOGICOS DE RIÑON DE RATA ADULTO

El receptor para IL-3 es expresado tanto en células progenitoras hematopoiéticas, como en algunos tipos celulares no hematopoiéticos. En la mayoría de los órganos la expresión de este receptor se limita a macrófagos y linfocitos activados, sin embargo, se ha reportado la presencia de IL-3 en etapas muy tempranas del desarrollo. Debido a estos hallazgos y como un acercamiento fisiológico, se quiso indagar si el receptor para IL-3 estaba presente en etapas adultas del tejido renal. 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 IL-3 (α y β), 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-IL-3 α , anti-IL-3 β , anti-GLUT1 y anti-GLUT3. La inmunohistoquímica para la subunidad α del receptor de IL-3 (**Figura 6, panel A**), evidenció que esta subunidad no sería detectable en etapas adultas del riñón y sólo se observó marca reactiva en las células epiteliales que conforman los vasos sanguíneos que irrigan al órgano (datos no mostrados). Para la subunidad β del receptor de IL-3, la localización de células inmunorreactivas positivas sólo fue posible encontrarla en el epitelio próximo a los túbulos colectores, tal como lo indican las flechas (**Figura 6, panel D**). 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 6, panel E**) y en la corteza a nivel de los glomérulos. En el caso del transportador GLUT3, se pudo apreciar inmunorreacción positiva en zonas similares a las observadas para GLUT1, en los túbulos colectores (**Figura 6, panel F**) y en los glomérulos, 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 pudo 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.

Dado que sólo la subunidad β del receptor de IL-3 se encontró en este tejido y los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 fueron detectados en zonas similares en cortes de riñón de rata, se sugiere que estas proteínas se encontrarían estrechamente relacionadas para llevar a cabo su(s) función (es) en este órgano. De acuerdo a los resultados de este estudio las funciones no serían mediadas por IL-3, pero podrían serlo a través de los receptores de IL-5 y GM-CSF que también presentan a la subunidad β . Por esta razón se detectaron las subunidades α , de los receptores de IL-5 y GM-CSF usando un anti-IL-5 α y un anti-GM-CSF α (**Figura 6, paneles B y C**, respectivamente). No se detectó la subunidad α del receptor de IL-5 en los cortes, a diferencia de GM-CSF α , que se detectó específicamente a nivel de túbulos colectores. La presencia de la subunidad α del receptor de GM-CSF en estas zonas del tejido sugiere que probablemente esta citoquina ejercería funciones relacionadas con los transportadores GLUT1 y GLUT3 en la etapa adulta y que las IL-3 e IL-5 serían citoquinas con una actividad más bien estado específica. Como control negativo de estos ensayos (**Figura 6, panel A inserto**) se utilizó solución de bloqueo sin primer anticuerpo, no observándose inmunorreacción positiva en el tejido.

Figura 6. Inmunolocalización del Receptor de IL-3 y de los Transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en cortes de riñón de rata. A. B. Análisis inmunohistoquímico de las subunidades del receptor de IL-3 utilizando un anticuerpo anti-IL-3r α (A) y anti-IL-3r β (D). **B. C.** Corresponden al análisis de las subunidades α de los receptores de IL-5 y GM-CSF, usando anticuerpos anti-IL-5 α y GM-CSFr α , respectivamente. **E. F.** Análisis de la expresión de los transportadores de glucosa utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 y anti-GLUT3, respectivamente. El control negativo, inserto A sin primer anticuerpo. Magnificación 1250X.



De acuerdo a los ensayos de Inmunohistoquímica, el riñón adulto de rata expresa los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, confirmando así lo descrito anteriormente. Este tejido no expresaría la subunidad α de los receptores de IL-3 e IL-5, en cambio expresa la subunidad α del receptor de GM-CSF en el riñón adulto. Esto sugiere que citoquinas como IL-3 e IL-5 son funcionales de una manera estado específicas en este órgano, en cambio GM-CSF participaría en procesos más generalizados y requeridos probablemente durante toda la vida.

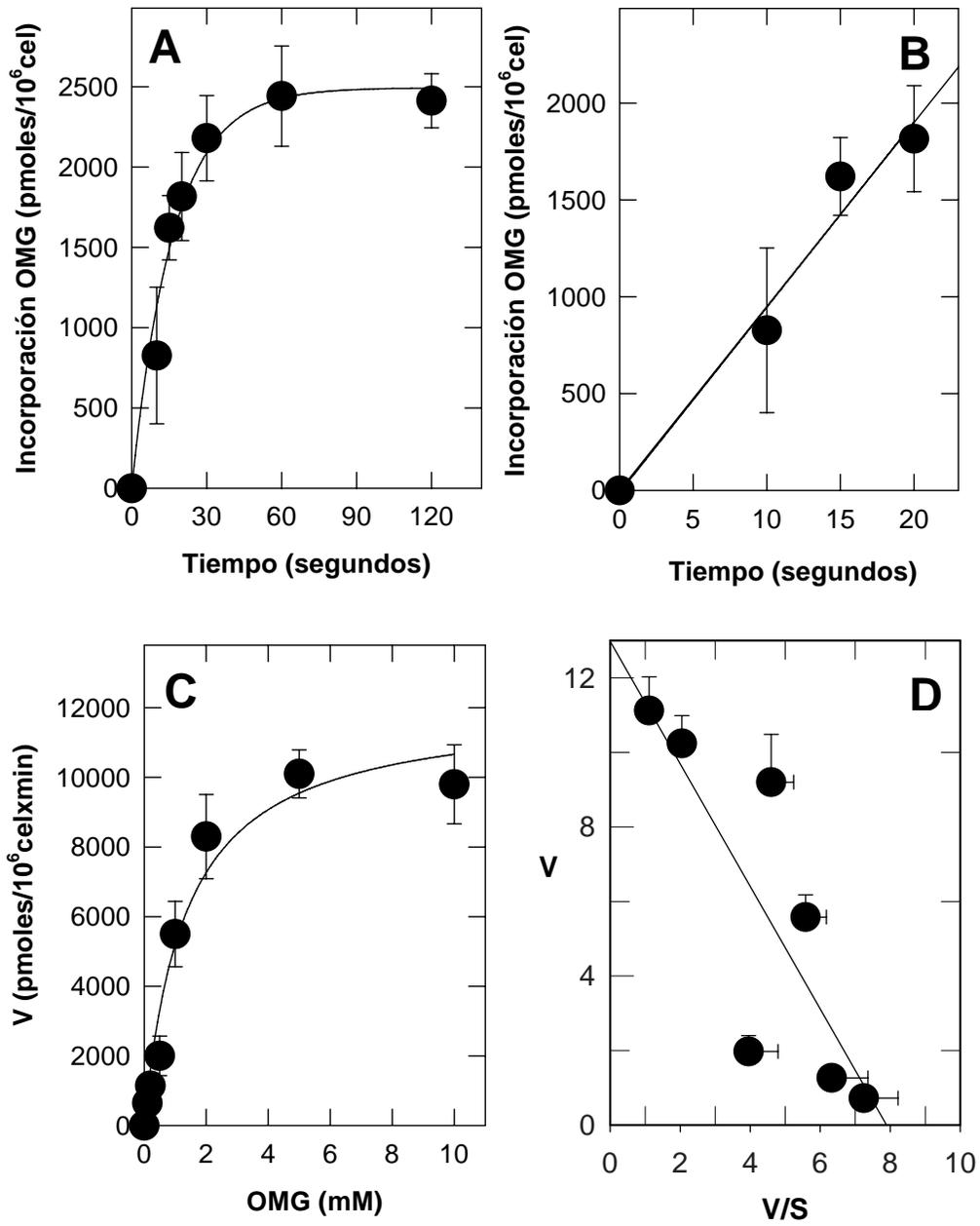
4.4 FUNCIONALIDAD DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE GLUCOSA GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS HEK293.

El uso de análogos de glucosa marcados radiactivamente ha sido una de las herramientas más usadas para conocer la forma en que las células logran incorporar diversas fuentes energéticas, en este trabajo se decidió utilizar al D-3-O-[metil- ^3H]glucosa (OMG), el cual es un compuesto que tiene un grupo metilo presente en la posición 3 del anillo aromático en vez de un grupo OH, por lo que no es metabolizado al ingresar a la célula por la hexoquinasa, que es la primera enzima que participa en el proceso de glicólisis (Carruthers, 1990; Simpson y Cushman, 1986). Esto es importante para los objetivos de esta tesis, ya que se quiere conocer el efecto de IL-3 sobre los transportadores de glucosa y no sobre el proceso de glicólisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos por las inmunofluorescencias, ambos transportadores presentaron una localización cercana a la membrana plasmática y por medio de los ensayos de *Western blot* se corroboró la expresión de GLUT1 y GLUT3. Fue necesario entonces realizar ensayos de funcionalidad para establecer las condiciones óptimas para la realización de los estudios cinéticos posteriores. Se usó el análogo de glucosa OMG, el cual fue incorporado por las células en una concentración de 0,5 mM. Los ensayos se realizaron a una temperatura de 20°C y se observó una incorporación lineal hasta casi los 20 segundos, alcanzando el equilibrio luego de los 30 segundos (**Figura 7, paneles A y B**). 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 7, 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 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 $11,4 \pm 2,4$ nmoles / 10^6 celxmin (**Figura 7, panel D**).

Figura 7. 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. *** $p < 0,001$.



Como se observa en el resultado cinético anterior, los transportadores facilitativos de hexosas son funcionales en las células HEK293, ya que son capaces de transportar al análogo de glucosa radiactivo utilizado en el ensayo. En base a los valores cinéticos obtenidos para las células HEK293, los ensayos de incorporación de OMG se hicieron de aquí en adelante usando una concentración de 0,5 mM de OMG, con un periodo de incorporación de 15 segundos y a una temperatura de 20°C.

4.5 EFECTO DE INTERLEUQUINA-3 EN EL TRANSPORTE DE 3-*o*-METIL-D-GLUCOSA EN LAS CELULAS HEK293

La relación entre citoquinas, factores de crecimiento y el transporte de glucosa ya ha sido reportada, estudios recientes han demostrado que IL-3 también es capaz de generar cambios en el transporte de glucosa, esto se ha visto en las células IC2.9 derivadas de mastocitos (Bentley y col., 2003), en las cuales al adicionar esta citoquina se produce un aumento en el transporte de glucosa y se observa una translocación del GLUT1. Por ello se investigó el efecto de IL-3 en la línea celular HEK293, que como se pudo apreciar en los resultados anteriores, expresa ambas subunidades del receptor para IL-3 además de presentar transportadores facilitativos de glucosa funcionales. Para estudiar el efecto de IL-3 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 equilibrio y luego tratadas durante 30 minutos con diferentes concentraciones de IL-3 (0-12 nM). Como se aprecia en la **Figura 8**, la adición de la citoquina causó un incremento de la captación de metil-glucosa con respecto a las células control. Además se observó que a partir de bajas concentraciones de IL-3, como lo es 1,5 nM, el aumento en la captación del análogo no fue evidente, manteniéndose hasta una concentración de citoquina de 3 nM, para luego aumentar notoria y significativamente a la concentración de 6 nM. Luego de este aumento la captación de OMG decayó levemente a una concentración de IL-3 de 12 nM. Solo

el aumento en la incorporación de OMG inducida por la concentración 6 nM de IL-3 fue significativamente diferente con respecto al control.

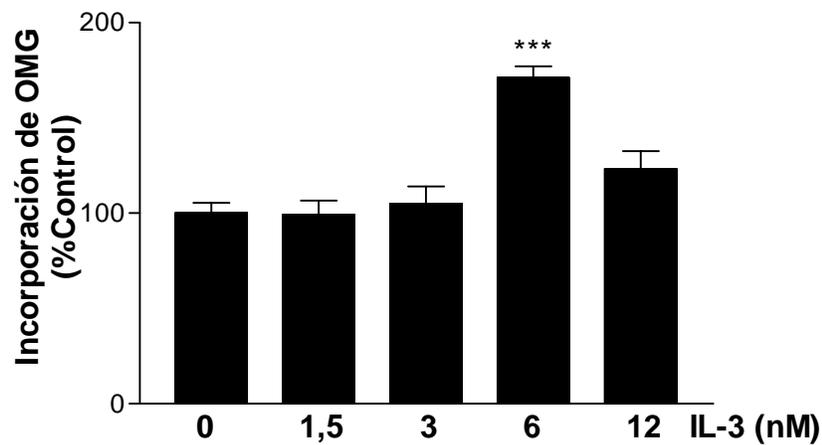


Figura 8. Efecto de IL-3 sobre el transporte de OMG en células HEK293. Las células HEK293 fueron preincubadas en tampón de incubación durante 1 hora previo al tratamiento por un período de 30 minutos con un intervalo de concentraciones de IL-3 (0-12 nM). El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de siete experimentos independientes \pm DS. *** $p > 0,001$.

Para investigar el tiempo en que ocurre la máxima respuesta a IL-3, las células HEK293 fueron tratadas como se describió anteriormente e incubadas con IL-3 6 nM. Como se puede apreciar en la **Figura 9**, la concentración de la citoquina utilizada durante 10 minutos no causó un incremento notable en el transporte de metilglucosa, luego durante los 20 minutos de estímulo, se observó un leve incremento en la captación de OMG. Recién a los 30 minutos de incubación con IL-3, se observó un aumento significativo y bastante notorio del transporte de este análogo. Después de 1 hora de tratamiento, la incorporación de metil-glucosa disminuyó levemente, pero siguió siendo significativa. Similar situación fue observada en aquellas células que fueron tratadas durante 90 minutos con IL-3. El aumento observado a los 30, 60 y 90 minutos de tratamiento con IL-3 fue significativo con respecto a las células no tratadas con la citoquina (control).

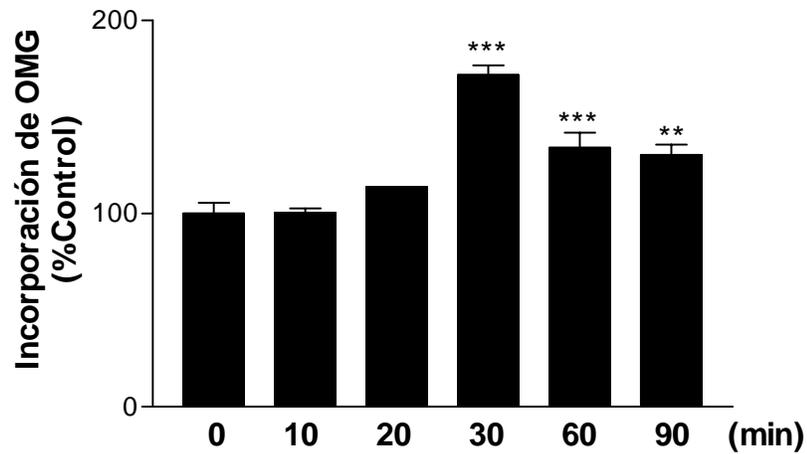


Figura 9. Efecto tiempo-dependiente de IL-3 en la incorporación de OMG en Células HEK293. Las células HEK293 fueron preincubadas en tampón de incubación durante 1 hora previo al tratamiento con IL-3 6 nM. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de cuatro experimentos independientes \pm DS. *** $p > 0,001$, ** $p > 0,01$.

Basado en los resultados de los estudios cinéticos anteriores, se determinó que la concentración óptima de IL-3 para generar aumentos en el transporte de glucosa es de 6 nM y que el tiempo de estimulación con esta citoquina en las células HEK293 es de 30 minutos. Estos parámetros, en conjunto con los determinados en los estudios cinéticos (**Figura 7**) que validan la funcionalidad de los GLUTs 1 y 3, se mantuvieron a lo largo de este estudio cada vez que fue necesario.

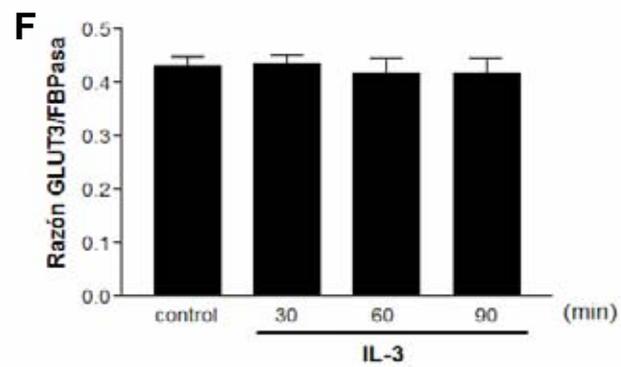
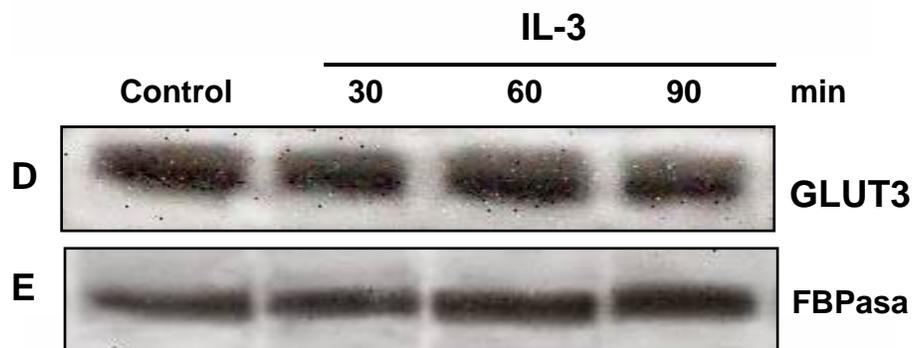
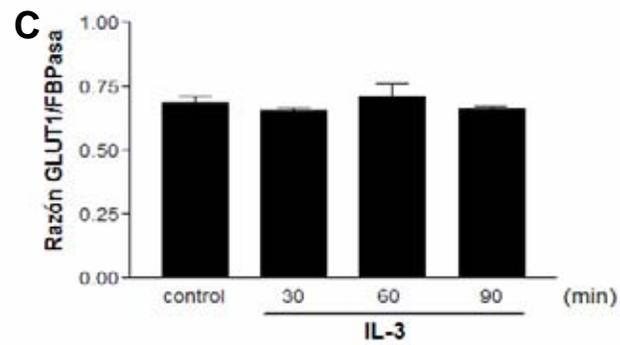
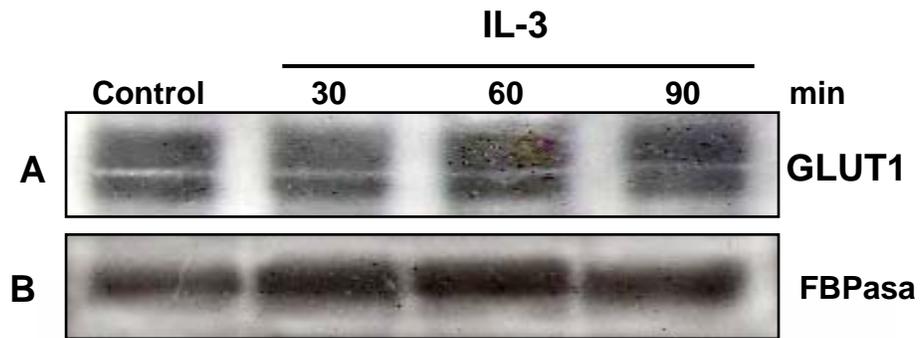
4.6 EFECTO DE IL-3 SOBRE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS HEK293

Como ya se ha descrito, IL-3 es capaz de generar el aumento en el transporte de glucosa y permitir además la translocación de GLUT1 en las células IC2.9 derivadas de mastocitos (Bentley y col., 2003), en base a estos datos y a los resultados obtenidos hasta aquí, en el presente estudio, surgen las siguientes preguntas, ¿Produce IL-3 un aumento en la expresión de los transportadores analizados? o ¿permite IL-3 la translocación de estos GLUTs preformados hacia la membrana celular? Para intentar dar respuesta a la última de estas inquietudes se realizaron ensayos de *Western blot* para detectar algún cambio en la abundancia relativa de los transportadores GLUT1 y GLUT3, luego de estimular a las células HEK293 con IL-3.

Para observar cambios en la expresión relativa de los transportadores GLUT1 y GLUT3, primero las células HEK293 se incubaron con un medio libre de cualquier sustrato para los GLUTs durante un periodo de 1 hora, luego se les adicionó Interleuquina-3 en una concentración de 6 nM en 30, 60 y 90 minutos. Paralelamente células sin estimular con esta citoquina, fueron tratadas de igual forma que las células estimuladas con IL-3, sólo que en lugar de la citoquina se les adicionó un volumen equivalente de PBS1X con el fin de obtener un control basal de la abundancia relativa, tanto de GLUT1 como de GLUT3 en las células HEK293. Posterior a esto se extrajeron las proteínas totales y se realizaron los 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 a Fructosa-1,6-bis-fosfatasa (FBPasa). Como se puede apreciar en la **Figura 10, panel A y D**, los niveles de cada una de las proteínas inmunodetectadas, GLUT1 y GLUT3 no difirieron significativamente entre las células tratadas en ausencia o presencia de IL-3. El análisis densitométrico y normalización de proteínas se muestran en los histogramas en la parte inferior de la **Figura 10**, en **B y C** para GLUT1 y en **E y F** para GLUT3.

Figura 10. Efecto de IL-3 sobre la abundancia relativa de los Transportadores GLUT1 y GLUT3. Las células HEK293 fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con IL-3 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. D.** Análisis de *Western blot* para la expresión de GLUT1 y GLUT3, respectivamente. **B. E.** Normalización de proteínas utilizando como control FBPasa. **C. F.** Histograma del análisis densitométrico de la expresión de GLUT1 (C) y de GLUT3 (F).



Los ensayos de *Western blot* realizados para observar cambios en la abundancia relativa de los GLUT1 y GLUT3, en células HEK293 estimuladas y no estimuladas con la citoquina IL-3, no mostraron ningún cambio al realizar el análisis semi-cuantitativo. Este hallazgo puede responder a una de las preguntas planteadas arriba, IL-3 no genera un aumento en la expresión proteica de los transportadores de glucosa, al menos en los tiempos empleados para la estimulación, por tanto el aumento en la incorporación de glucosa, visto en los ensayos de transporte (**Figuras 7, 8 y 9**), no se debería a la expresión de transportadores de glucosa sintetizados *de novo*.

4.7 EFECTO DE IL-3 EN LA DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LOS TRANSPORTADORES GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS HEK293

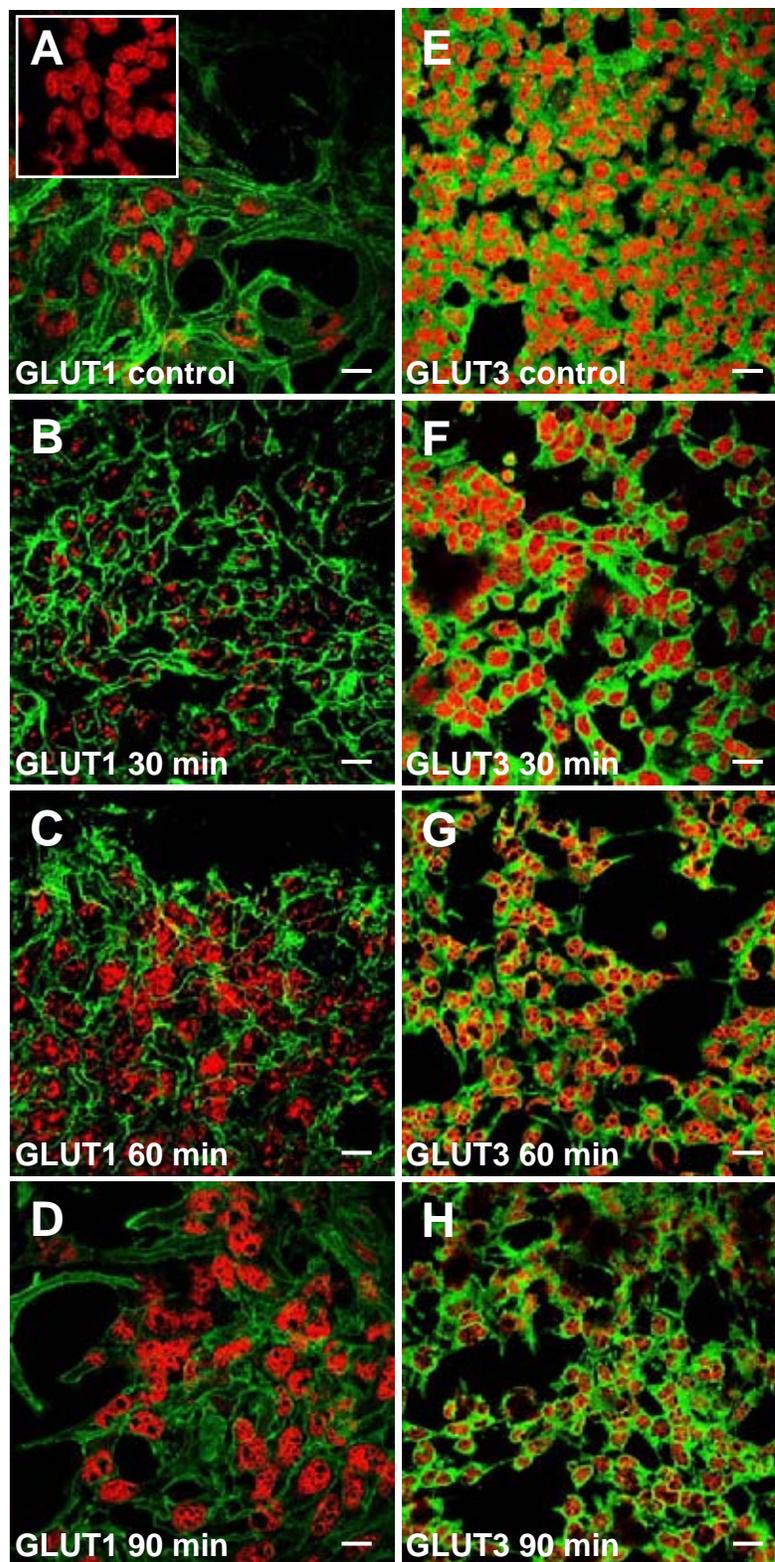
En varios estudios se ha demostrado que las citoquinas y los factores de crecimiento logran generar cambios en la localización celular de transportadores de glucosa. Por ejemplo, al estimular plaquetas (Heijnen y col., 1997) con trombina, se produce la translocación del transportador GLUT3 a la superficie celular y con esto un incremento notable en la incorporación de glucosa; también en células L6 musculares (Bilan y col., 1992) se ha visto que al ser estimuladas con insulina o el factor de crecimiento I tipo insulina, se detecta un incremento de este transportador en la membrana plasmática. Incluso se ha observado que IL-3 también es capaz de generar cambios en la localización de GLUT3 en las células derivadas de mastocitos (Bentley y col., 2003) pero no así en GLUT1. Los cambios en la localización de los GLUTs respondería a la primera pregunta planteada anteriormente, ya que demostraría que IL-3 genera el movimiento de transportadores preformados en vesículas en el citoplasma hacia la membrana celular y que no induciría, al menos en el corto plazo, una síntesis proteica de estos transportadores en las células estimuladas.

Para comprobar que IL-3 es capaz de movilizar a los transportadores GLUT1 y GLUT3 en las células HEK293, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia y análisis de microscopía confocal en los cuales las células

se incubaron con un medio libre de sustratos para los GLUTs durante un periodo de 1 hora, posterior a esto se les adicionó la citoquina IL-3 en una concentración de 6 nM durante 30, 60 y 90 minutos, y se usó como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína para visualizar la marca correspondiente a la localización de los transportadores. Para inmunolocalizar los transportadores GLUT1 y GLUT3 se usó un anticuerpo anti-GLUT1 y anti-GLUT3, respectivamente. La inmunodetección positiva (verde) para ambos transportadores se observó que aumenta en intensidad a medida que se incrementa el tiempo de estimulación con la citoquina y la localización para ambos transportadores fue a nivel de membrana plasmática e intracelular (**Figura 11, paneles A y B**).

GLUT1 se encontró localizado tanto en la región de la membrana plasmática como en la región citoplasmática, esta última con una intensidad de fluorescencia débil (**Figura 11, panel A**). El tratamiento de las células HEK293 con IL-3 6 nM durante 30 minutos causó 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 repitió a los 60 minutos. Sin embargo, a los 90 minutos de estimulación con IL-3 se observó que el transportador se localiza de manera similar al control (**Figura 11, panel C y D**). El análisis mediante el anticuerpo específico contra GLUT3 reveló que en las células control, el transportador GLUT3 se encontró localizado de manera homogénea en la región citoplasmática (**Figura 11, panel E**). Luego de 30 minutos de tratamiento con la citoquina, se pudo observar un aumento en la intensidad de fluorescencia de GLUT3 en toda la región citoplasmática y la llegada de una cantidad mínima de transportador GLUT3 a la membrana plasmática (**Figura 11, panel F**). A los 60 minutos de estimulación se observó una disminución leve de la marca fluorescente para GLUT3 (**Figura 11, panel G**). En aquellas células estimuladas durante 90 minutos con IL-3, el transportador GLUT3 se observó nuevamente en regiones citoplasmáticas, con una señal reactiva bastante similar a la observada en las células control (**Figura 11, panel H**).

Figura 11. Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293. 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 IL-3 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 IL-3, detección de GLUT1 (*C*) y GLUT3 (*G*). **D. H.** Células estimuladas con IL-3 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 μ m. Control negativo, inserto A.



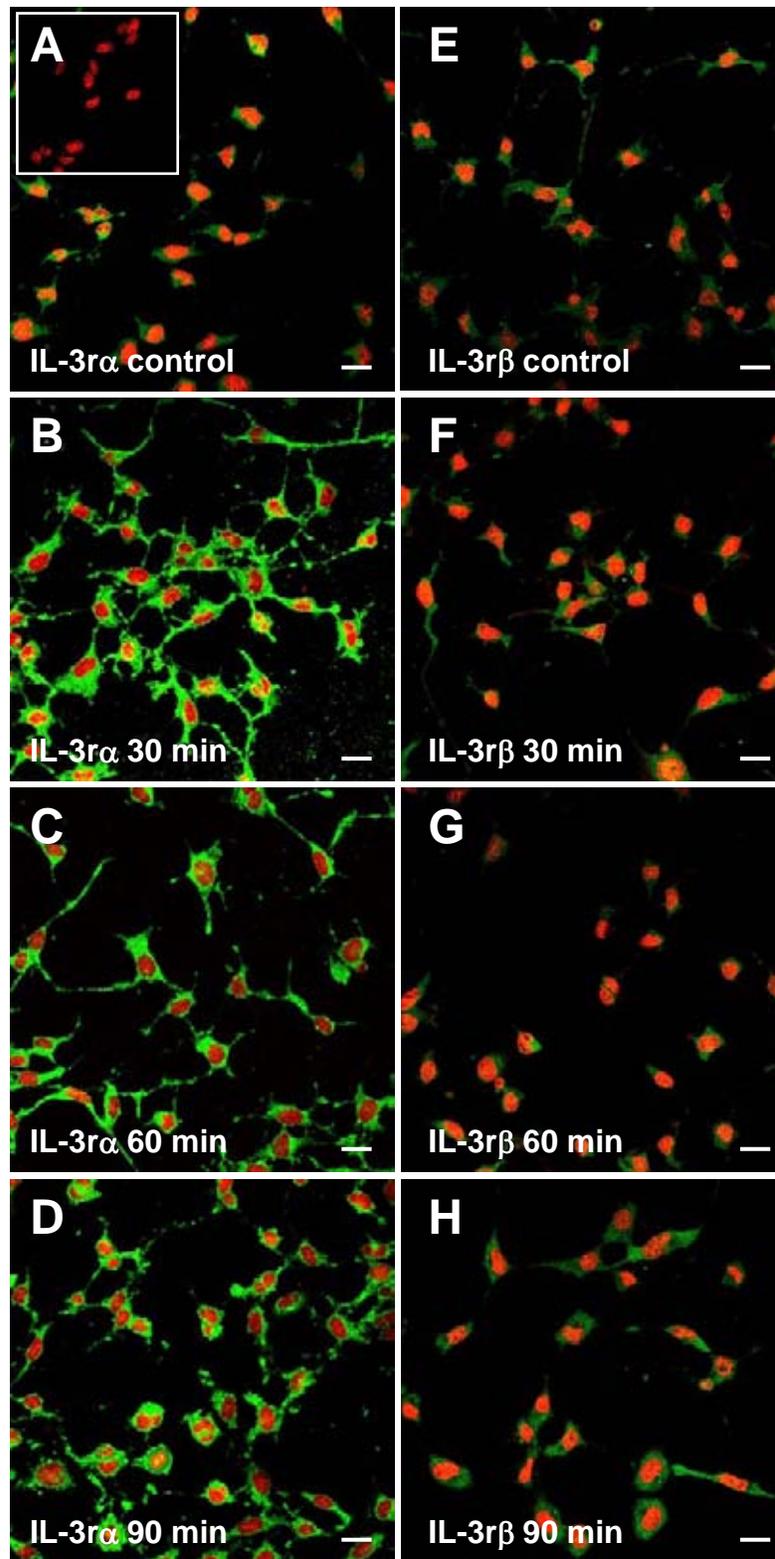
Basados en los resultados obtenidos por las Inmunofluorescencias realizadas en las HEK293 estimulas con IL-3, se puede decir que esta citoquina promueve el movimiento de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 hacia la membrana plasmática (**Figura 11, paneles A y B**). La señal fluorescente, detectada luego de los tiempos de estímulos con la citoquina, para el GLUT1 es menos intensa que la de GLUT3, pero GLUT1 se observa mayoritariamente a nivel de la membrana celular. El GLUT3 en cambio emerge en un grado menor a la membrana plasmática, lo que indica que no todo el transportador se moviliza y un porcentaje se mantiene en vesículas intracelulares presumiblemente como reserva.

4.8 EFECTO DE IL-3 EN LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS SUBUNIDADES α Y β DEL RECEPTOR DE IL-3 EN CELULAS HEK293

En esta tesis se ha estudiado el efecto de IL-3 sobre el transporte de glucosa, es decir cómo esta citoquina es capaz de regular la actividad de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3. Se ha descrito que IL-3 es capaz de generar una translocación de GLUT1 en las células IC2.9 para permitir el aumento del transporte de glucosa sin modificar la Km del transportador, pero sí la Vmax (Bentley y col., 2003), comprobándose la estrecha participación de PI3K en este suceso. Otros estudios señalan que IL-3 es capaz de modificar la Vmax de los transportadores a través de su receptor en células derivadas de la médula ósea (McCoy y col., 1997). Esto se logró inhibiendo las fosforilación en tirosinas específicas, proceso clave para la activación de vías de señalización descritas para IL-3 involucradas en esta modificación intrínseca de los transportadores. Otro estudio, demuestra que en ovocitos de *X. laevis* GM-CSF, perteneciente a la familia de IL-3 es capaz de generar una disminución de la Km de los transportadores y que además, la que generaría este cambio, sería la subunidad α de este receptor, ya que se encontraría en contacto físico con PI3K. En base a estos antecedentes el receptor de IL-3 sería el responsable de la generación de respuestas celulares relacionadas con el aumento de incorporación de glucosa. Sin embargo, aún no se ha demostrado si esta citoquina genera un

cambio en la redistribución de las subunidades del receptor y cómo se relacionarían éstos estructuralmente con las quinasas que participan en las cascadas intracelulares y aún más con los transportadores facilitativos de glucosa. Por este motivo, para probar si IL-3 genera algún cambio de distribución en las subunidades del receptor de IL-3 que se relacione con los cambios vistos en la localización de los GLUT1 y GLUT3, se decidió estudiar que ocurre con las subunidades α y β del receptor de IL-3 en presencia de esta citoquina. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en los cuales las células HEK293 fueron incubadas por 1 h en presencia de un tampón de equilibrio y luego de esto, se procedió a la estimulación con IL-3, en periodos de 30, 60 y 90 minutos (**Figura 12**). Se pudo observar que la subunidad α se distribuyó mayoritariamente en regiones citoplasmáticas y cercanas a la membrana celular en presencia de IL-3 durante 30 minutos y su intensidad con respecto a las células no estimuladas aumentó considerablemente. Luego de 60 y 90 minutos se observó un comportamiento bastante similar al visto a los 30 minutos de estimulación con la citoquina (**Figura 12, paneles B, C y D, respectivamente**). La subunidad β en cambio presentó una intensidad bastante menor a la de la subunidad α del receptor de IL-3. A los 30 minutos de estimulación con la citoquina se observó un leve aumento de la marca inmunorreactiva, la cual se encuentra a nivel citoplasmático, luego de los 60 minutos de estímulo se observó una disminución en la señal reactiva y se localizó intracelularmente, por último a los 90 minutos se observó un leve aumento en la señal inmunorreactiva que se ubicó también en regiones citoplasmáticas. (**Figura 12, paneles F, G y H, respectivamente**).

Figura 12. Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de las subunidades α y β del receptor de IL-3. Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-IL-3r α (verde, *A, B, C, D*) y anti-IL-3r β (verde, *E, F, G, H*). Las células HEK293 fueron incubadas durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento con IL-3 6 nM durante 30, 60 y 90 minutos. **A. E.** Células no estimuladas (control), detección de IL-3r α (*A*) y IL-3r β (*E*). **B. F.** Células estimuladas durante 30 minutos, detección de IL-3r α (*B*) y IL-3r β (*F*). **C. G.** Células HEK293 estimuladas durante 60 minutos con IL-3, detección de IL-3r α (*C*) y IL-3r β (*G*). **D. H.** Células estimuladas con IL-3 durante 90 minutos, detección de IL-3r α (*D*) y IL-3r β (*H*). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10 μ m. Control negativo, inserto A.



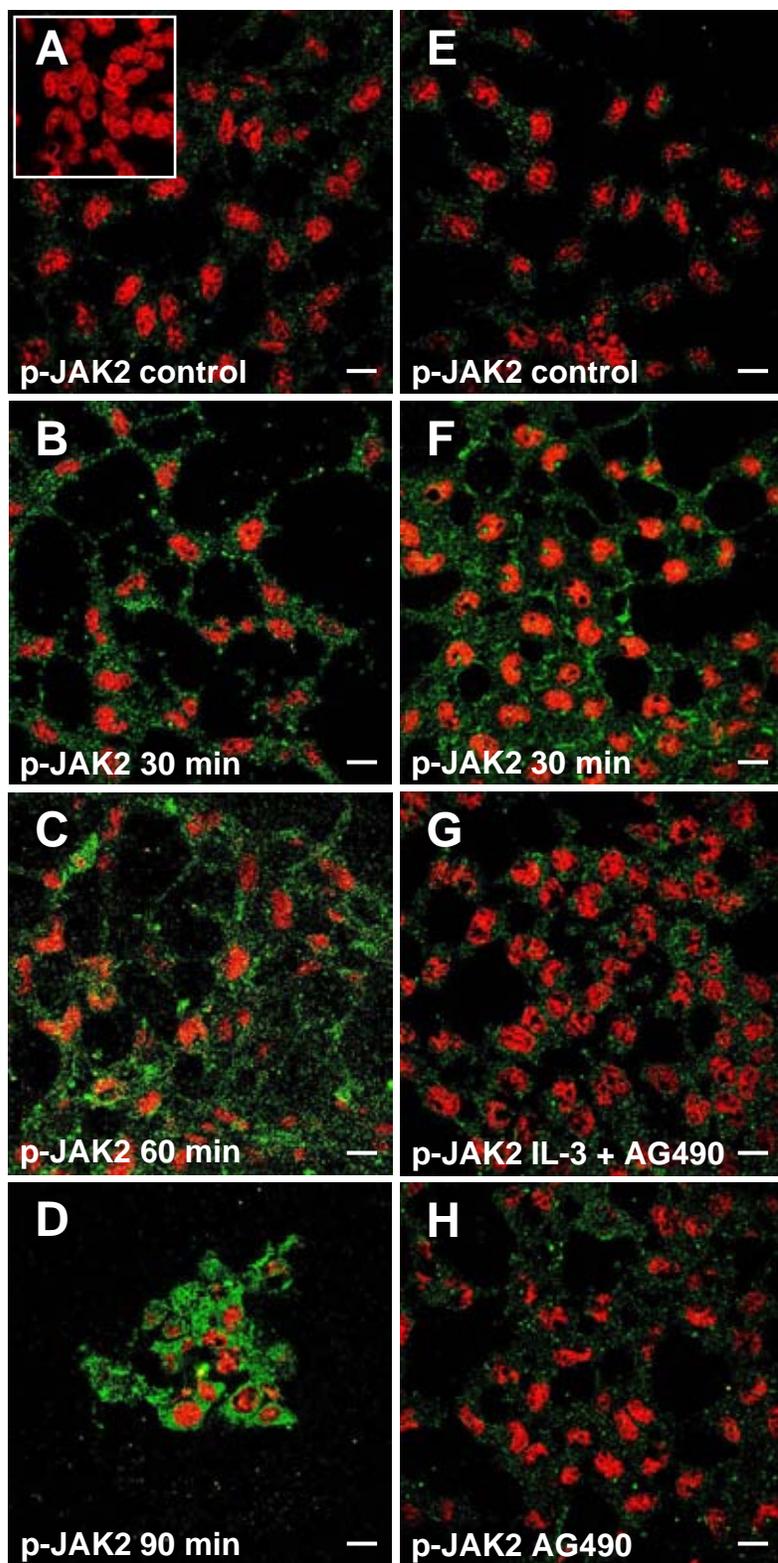
Como se observa en las inmunofluorescencias anteriores, la subunidad α del receptor de IL-3 aumenta su intensidad fluorescente a medida que se incrementa el tiempo de estímulo con IL-3. De manera similar la subunidad βc , también se comporta de esta manera, pero si se compara la intensidad de señal de ambas subunidades la subunidad α es mucho más intensa. Este resultado sugiere, que ambas subunidades son capaces de moverse dentro de la célula a tiempos crecientes de estimulación con IL-3 en esta línea celular.

4.9 ACTIVACION DE JAK2 POR ESTIMULACION DE IL-3 EN CELULAS HEK293

Se ha descrito la participación de varias vías de transducción de señal que se activan en las células estimuladas con IL-3, una de ellas la vía JAK/STAT (Callus y col., 1998) compuesta por las proteínas JAKs (Janus quinasas) una familia de 4 quinasas (JAK1, JAK2, JAK3 y TyK2) y los STATs (transductores de señal y activadores de la transcripción). Las JAKs participan en la fosforilación de residuos de tirosina de aquellos receptores que se activan por la unión de su ligando y que no tienen actividad tirosina quinásica intrínseca como, lo es el IL-3r. Una vez que este receptor es activado por IL-3, 2 moléculas de JAK2 previamente asociadas a las subunidades βc , se fosforilan entre sí para posteriormente fosforilar al receptor en residuos de tirosinas de estas proteínas, así un monómero de STAT5 llega al receptor y éste fosforila a su vez a otro STAT formando homodímeros y heterodímeros que se translocan hacia el núcleo celular para estimular la expresión de genes blanco (Mui y col., 1996). El receptor de IL-3 necesita de la fosforilación proporcionada por JAK2 para generar así la cascada de señalización intracelular, no sólo para activar a STAT5, si no que para activar también las vías Ras/MAPK y PI3K/Akt (Nyga y col., 2005; Lui y col., 1999). El rol de JAK2 en este receptor es clave y se considera el inicio de todas las respuestas generadas por IL-3. Por este motivo para conocer si esta quinasa se fosforila y por lo tanto activa al receptor para IL-3 en las células HEK293 se realizaron ensayos de inmunolocalización de JAK2 fosforilada. Las células HEK293 fueron incubadas con

un tampón de equilibrio para luego ser estimuladas con IL-3 por periodos de tiempo de 30, 60 y 90 min (**Figura 13, paneles B, C y D**, respectivamente). Se observó el efecto del inhibidor de JAK2, AG490, en la fosforilación y distribución de esta proteína. Luego del periodo de incubación con el tampón, las HEK293 fueron incubadas por 30 min en presencia del inhibidor 10 μ M, posteriormente se incorporó la citoquina (6 nM) y luego de esto se detectó a p-JAK2 usando un suero inmune anti-p-JAK2 específico contra los residuos de tirosina fosforilados 1007 y 1008 (**Figura 13, paneles E, F, G y H** respectivamente). La marca reactiva correspondiente a p-JAK2 se observó a nivel de la membrana celular y a nivel citoplasmático (**Figura 13, paneles A y E, control**), luego de los 30 (**Figura 13, panel B y F**) y 60 min (**Figura 13, panel C**), de estímulo esta señal aumentó notoriamente a nivel de la membrana y citoplasma. A los 90 min la señal incrementó aún más a nivel de la membrana celular y citoplasma (**Figura 13, panel D**). Por el contrario, las células estimuladas con IL-3 e incubadas al mismo tiempo con AG490, presentaron a p-JAK2 localizada a nivel citoplasmático y prácticamente ausente en la membrana plasmática (**Figura 13, panel G**), algo muy similar se observó en aquellas células que sólo se incubaron en presencia del inhibidor, la señal de p-JAK2 disminuyó a niveles similares al control (**Figura 13, panel H**).

Figura 13. Análisis de la activación de la proteína Janus quinasa-2, JAK2 en células HEK293 estimuladas con IL-3. Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-pJAK2 dirigido contra Tyr-1007/Tyr1008 (verde). Las células HEK293 fueron incubadas durante 1 h en tampón de incubación previo al tratamiento con IL-3 6 nM en ausencia o presencia del inhibidor AG490 10 μ M. **A.** **E.** Células no estimuladas con IL-3 (control). **B. C. D.** Células HEK293 tratadas con IL-3 (6 nM) durante 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. **F.** Células incubadas con IL-3 6 nM durante 30 min. **G.** Células HEK293 tratadas con IL-3 durante 30 min y además en presencia de AG490 10 μ M. **H.** Células incubadas en presencia de AG490 10 μ M. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10 μ m. En A el inserto corresponde al control negativo en ausencia de anticuerpo primario.



4.10 PARTICIPACION DE JAK2 EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA INDUCIDO POR IL-3 EN CELULAS HEK293

Para conocer la participación de JAK2 en el aumento de captación de glucosa estimulada por IL-3 en las células HEK293 se procedió a verificar que JAK2 es capaz de fosforilarse y de activar al receptor para IL-3 luego de la unión de la citoquina y también al bloquear este proceso con el inhibidor específico AG490 comprobar si JAK2 es la quinasa que da el pie inicial a la cascada de activación de la(s) ruta(s) de señalización involucrada(s) en el aumento de incorporación de glucosa en este tipo celular. Para ello se realizaron ensayos de transporte, utilizando el inhibidor sintético de Janus quinasa-2, AG490. Las células fueron preincubadas durante una hora en tampón de equilibrio para luego ser incubadas durante 30 minutos con AG490 10 μ M, previo al tratamiento con IL-3 (6 nM) por 30 minutos (**Figura 14**).

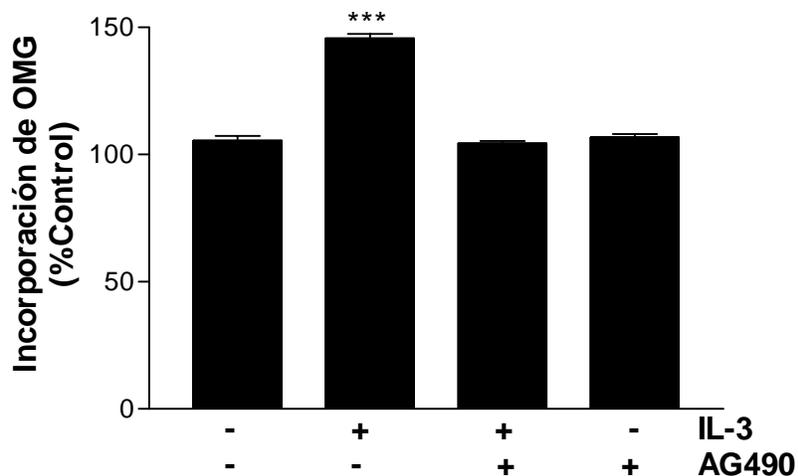


Figura 14. Participación de JAK2 en la estimulación del transporte de OMG inducido por IL-3. Las células HEK293 fueron preincubadas por 1 hora en tampón de incubación y tratadas con IL-3 6 nM en presencia de AG490 10 μ M. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DS. *** $p > 0,001$.

Como se puede observar en las **Figura 13** y **14**, el inhibidor de JAK2 generó una disminución significativa en la activación de JAK2 y el transporte de OMG estimulado por IL-3 a la concentración probada, lo que sugiere fuertemente que la enzima JAK2 es la quinasa que activa al receptor para IL-3 y por lo tanto la activación posterior de la vía intracelular involucrada en el aumento de captación de OMG en las células HEK293.

4.11 PARTICIPACION DE PI3-QUINASA EN EL TRANSPORTE DE GLUCOSA POR ESTIMULACION CON IL-3 EN CELULAS HEK293

Se ha reportado que la vía involucrada en la translocación a la membrana de transportadores de glucosa estimulado por citoquinas sería PI3K (Bentley y col, 2003) y que además el citoesqueleto tendría un rol muy importante en este proceso. Pero todo lo relacionado a las citoquinas y a esta vía de señalización ha sido estudiado en el sistema hematopoiético, es por este motivo que es interesante conocer qué sucede con esta ruta en células diferentes a las del sistema inmune, en este caso a la línea celular HEK293. La PI3K activa río abajo a la proteína serina/treonina quinasa Akt, pero aún no se conoce a ciencia cierta si otra vía gatillada por IL-3 puede generar esta activación, a pesar que es sabido que estas rutas pueden superponerse y que no son mutuamente excluyentes. Existen tres clases de PI3K basadas en su sustrato, la clase I, tiene como sustratos a fosfatidilinositoles fosforilados: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato y fosfatidilinositol-4-fosfato. La clase II, tiene como sustrato a fosfatidilinositoles fosforilados y al fosfatidilinositol-4-fosfato, pero no al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato. La clase III tiene como sustrato exclusivamente a fosfatidilinositoles que son química y estructuralmente similares al producto del gen Vps34p involucrado en el tráfico de proteínas desde el Golgi a vacuolas en levadura. En este trabajo de tesis se estudiará a la clase I de PI3K, ya que es la clase que se ha descrito que tiene participación en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, asociado a la translocación de transportadores facilitativos a la membrana celular.

Para saber cuál(es) ruta(s) de señalización intracelular(res), participaría(n) en el aumento de transporte de glucosa (OMG) en las células HEK293 luego de la unión de IL-3 a su receptor, se realizaron ensayos de transporte utilizando el inhibidor de PI 3-quinasa LY294002 (compuesto que actúa bloqueando la fosforilación de PIP2 e impidiendo la formación de PIP3). Para ello, las células fueron preincubadas durante 1 h en tampón de equilibrio para luego ser incubadas durante 30 minutos con LY294002 10 μ M, previo al tratamiento con IL-3 6 nM por 30 minutos. Como se puede observar en la **Figura 15**, el inhibidor de PI 3-quinasa afectó significativamente el transporte de OMG estimulado por IL-3 a la concentración probada, lo que sugiere fuertemente que la enzima PI 3-quinasa participa en la señalización del aumento del transporte de glucosa en este tipo celular. Por otra parte, DMSO, solvente utilizado para el inhibidor LY294002, no ejerce ningún efecto sobre el transporte de OMG (datos no mostrados).

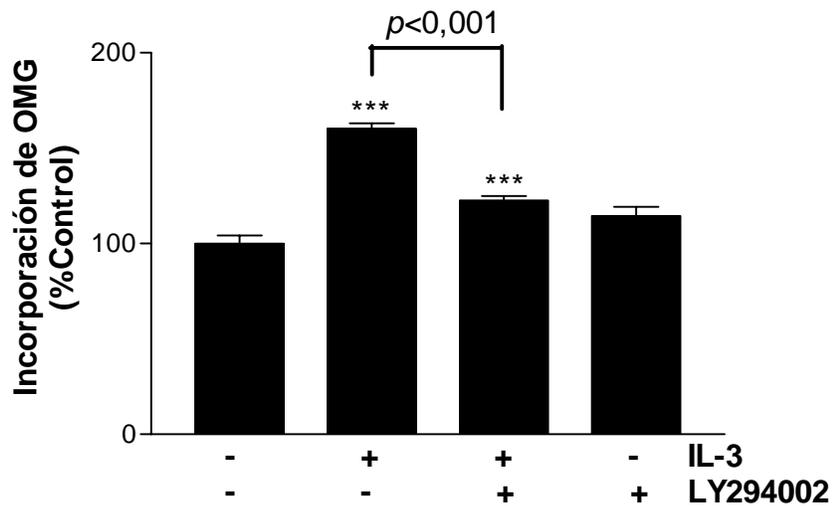


Figura 15. Participación de PI 3-quinasa en la estimulación del transporte de OMG inducido por IL-3. Las células HEK293 fueron preincubadas por 1 hora en tampón de incubación y tratadas con IL-3 6 nM en presencia de LY294002 10 μ M. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las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

Como se observa en el ensayo de transporte anterior, en aquellas células a las cuales se las incubó con IL-3 más el inhibidor LY294002 se observa una disminución en el transporte de OMG, lo que indica que esta ruta está posiblemente implicada en el aumento de incorporación de glucosa.

4.12 ACTIVACION DE AKT INDUCIDA POR ESTIMULACION CON IL-3 EN CELULAS HEK293

La unión de IL-3 a su receptor genera la asociación de PI3K a la subunidad β fosforilada por JAK2, mediante sus dos dominios SH2 (dominio 2 homólogo a SRC). Esta asociación genera un cambio conformacional en esta quinasa que le permite a su subunidad catalítica (p110) generar al PIP3 que activa y recluta río abajo a la serina/treonina quinasa Akt (también llamada PKB). Akt presenta estructuralmente un dominio PH (dominio homólogo a pleckstrina) cercano al amino terminal, un dominio catalítico en el que se encuentra la Thr-308 y la Ser-473 claves en su activación y un pequeño dominio regulatorio localizado hacia el carboxilo terminal. Una vez que Akt se asocia a PIP3 mediante el dominio PH se produce la fosforilación en Thr-308 por la PDK1 (3-fosfatidilinositol dependiente de proteína quinasa 1), pero a pesar de que esta fosforilación es necesaria y suficiente para la activación de Akt, se requiere de una segunda fosforilación en Ser-473 por la PDK2 para activar completamente a esta quinasa y desencadenar procesos como sobrevivencia, proliferación y crecimiento celular. En este trabajo se postula que IL-3 es capaz de activar la vía de PI3K/Akt y así aumentar la incorporación de glucosa mediante la participación de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3.

Se hicieron ensayos de *Western blots* para conocer si IL-3 es capaz de generar un aumento en la fosforilación en proteínas río abajo de las rutas ya descritas, en este caso se detectó la proteína Akt fosforilada en Ser-473, río abajo de la vía PI3-quinasa. Las células HEK293 fueron incubadas con un medio libre de sustratos para los transportadores GLUTs durante 1 hora, luego en el mismo

medio se les adicionó la citoquina a una concentración de 6 nM y se incubó por periodos de 30, 60 y 90 minutos. Posterior a esto se extrajeron las proteínas totales de las células tratadas y se sometieron a electroforesis y posterior *Western blot*, para el cual se usó un suero inmune anti-p-Akt, que detecta a Akt fosforilada en Ser-473 (**Figura 16, panel A**). Como control de carga de cada experimento se usó un anti-Akt que detecta a Akt sin fosforilar y por lo tanto inactiva, cuyas bandas se pueden ver en la **Figura 16, panel B**. El análisis densitométrico se observa en el panel C en la misma **Figura 16**.

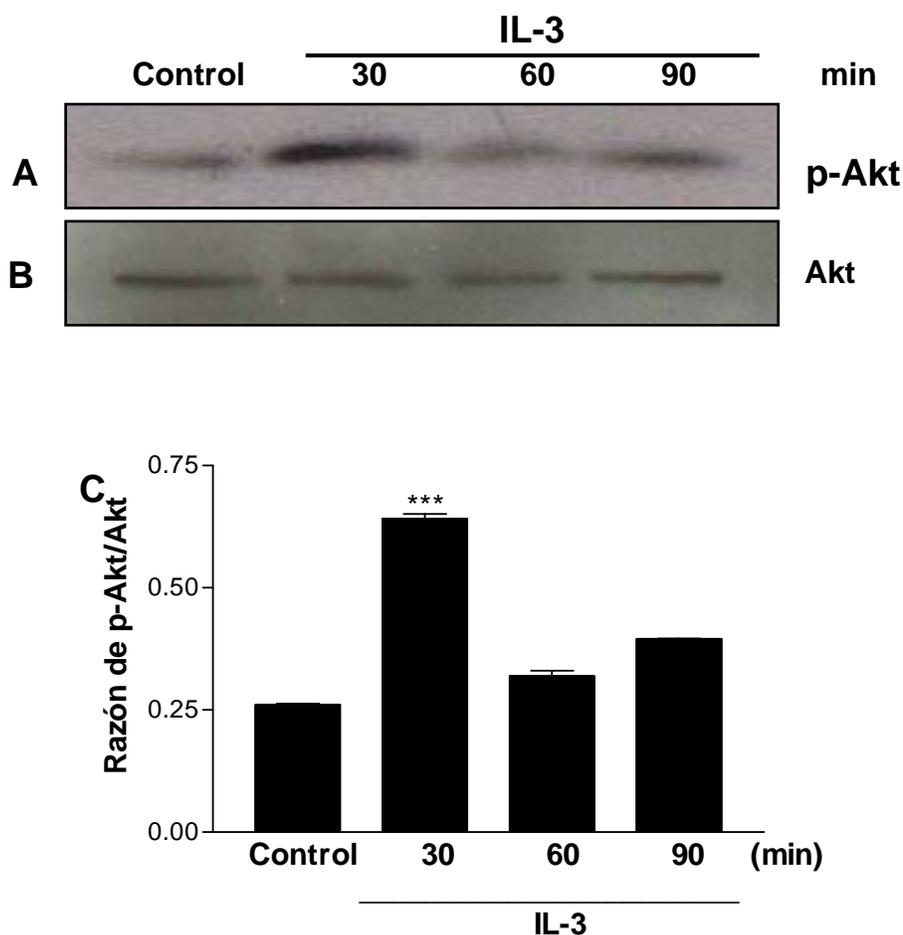


Figura 16. Efecto de IL-3 en la activación de Akt, río abajo de PI3-quinasa en Células HEK293. En el panel **A**, se observa el *Western blot* correspondiente a p-Akt en serina 473, a partir de extractos proteicos totales de células HEK293 estimuladas con IL-3 6 nM, durante 30, 60 y 90 min a 37°C, (carriles 2, 3 y 4, respectivamente) y sin estimular (carril 1), la banda corresponde a un peso de 60 kDa. En el panel **B** se observa el control de carga correspondiente a Akt total, con 60 kDa. En el panel **C**, se tiene el análisis densitométrico en el cual las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DS. *** $p < 0,001$.

Como se observa en el ensayo de *Western blot*, se produce un máximo en la fosforilación de Akt a los 30 minutos de estímulo con IL-3 y disminuye a los 60 y 90 minutos posteriores. Esto indica que IL-3 activa a la vía PI3K/Akt y que además el máximo de esta activación se observa a los 30 minutos, lo cual concuerda con el aumento de transporte de OMG, también observado al mismo periodo de estimulación (**Figura 9**).

4.13 ANALISIS DE LA ACTIVACION DE LA VIA PI3K GENERADA POR IL-3 EN PRESENCIA DEL INHIBIDOR LY294002

Para conocer si LY294002 es capaz de bloquear la fosforilación de Akt y así más adelante averiguar si esta proteína es la que media los cambios de localización de los transportadores de glucosa, se procedió a realizar ensayos de *Western blot*. Las células HEK293 se sometieron a un medio de incubación durante 1 h, posterior a esto se les adicionó el inhibidor a una concentración de 10 μ M durante 30 min. Pasado este tiempo se les adicionó la citoquina IL-3 a una concentración de 6 nM. A estas células tratadas se les extrajo las proteínas para proceder a electroforesis y *Western blot*. Se usó un suero inmune anti-p-Akt que detecta a Akt fosforilada en Ser-473 (**Figura 17, panel A**), como control de carga de cada experimento se usó un anticuerpo contra Akt inactiva y la bandas obtenidas se observan en la **Figura 17, panel B**. El análisis densitométrico se observa en la misma **Figura 17, panel C**.

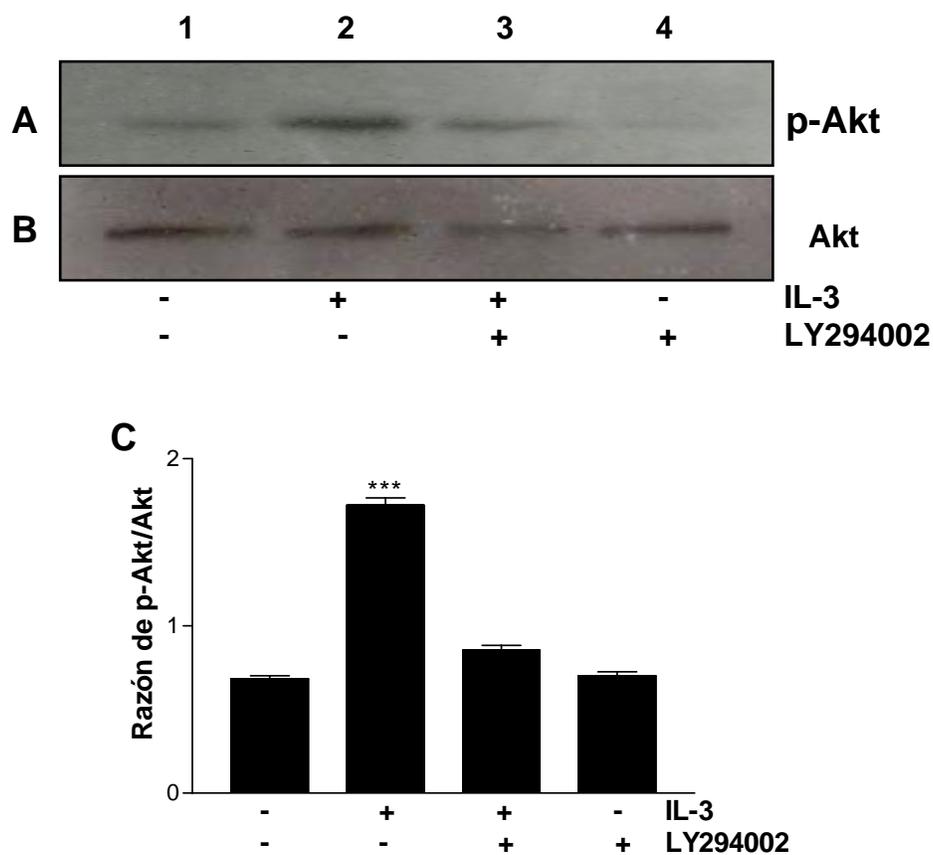


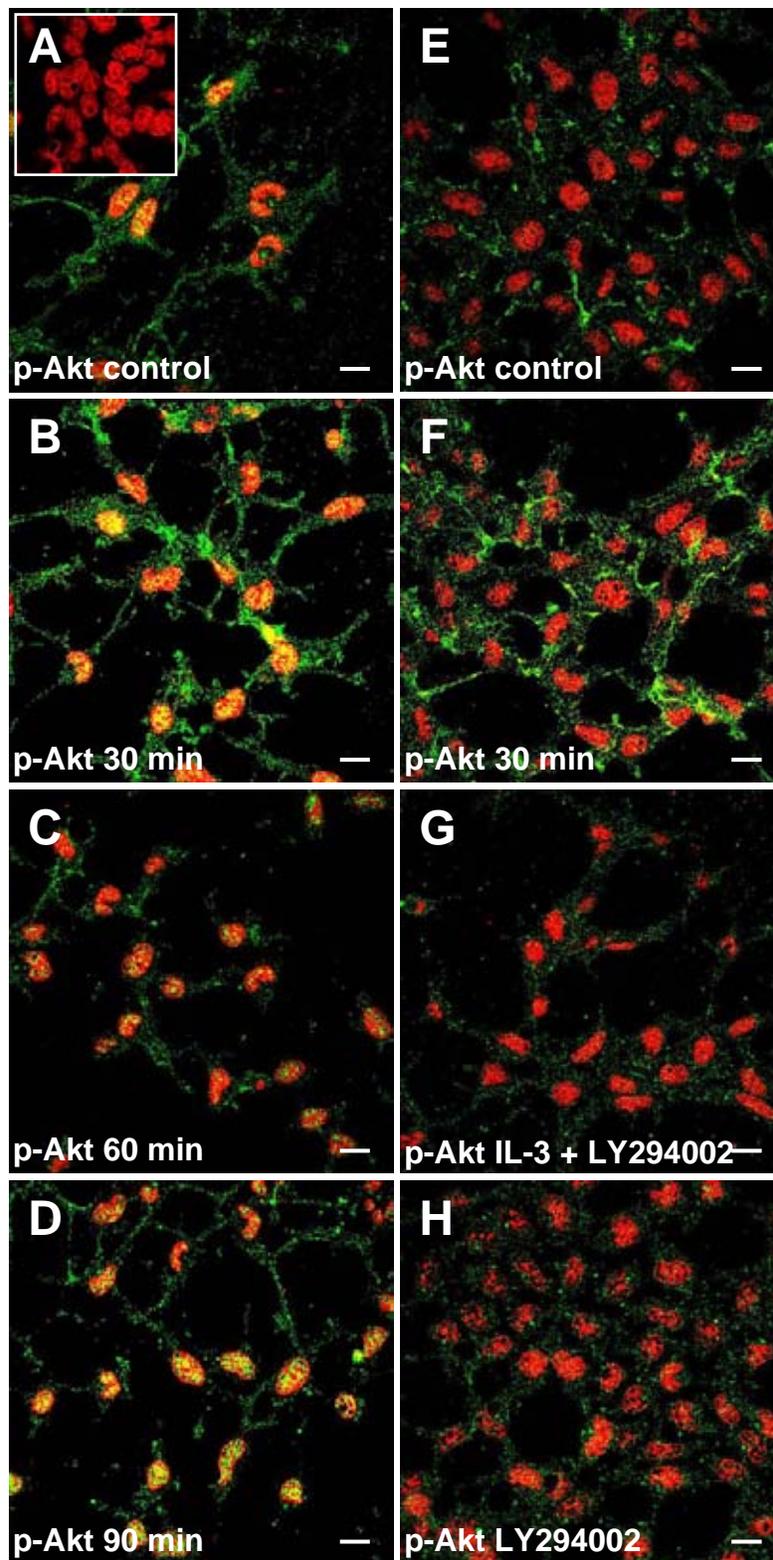
Figura 17. Efecto de IL-3 en presencia de LY294002 sobre la fosforilación de Akt en Células HEK293. En el panel **A**, se observa un *Western blot* correspondiente a p-Akt, a partir de extractos proteicos totales de células HEK293, estimuladas con IL-3 6 nM durante 30 min a 37°C y en presencia del inhibidor LY294002 (10 μ M), usando un anti-p-Akt (Ser-473), la banda corresponde a un peso de 60 kDa. En el panel **B** se observa la normalización de la carga con Akt total, cuya banda corresponde a los 60 kDa. En el panel **C** se observa el análisis densitométrico, cuyas barras corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm DS. *** $p < 0,001$.

Como se observa en el resultado anterior, el inhibidor LY294002 es capaz de inactivar a la PI3K y por tanto inhibir la fosforilación en Ser-473 de Akt. La disminución en el transporte de glucosa observado en la **Figura 15** en presencia de este inhibidor, es complementaria a la obtenida en esta sección, lo que sugiere que Akt estaría participando en el aumento de captación de glucosa en las células HEK293 inducido por IL-3.

4.14 EFECTO DE IL-3 EN LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE p-Akt EN LAS CELULAS HEK293

Para observar el efecto de IL-3 en la localización de p-Akt en las células HEK293, se realizaron inmunolocalizaciones, en las cuales las células fueron incubadas con el tampón de equilibrio y luego estimuladas con IL-3 por periodos de tiempo de 30, 60 y 90 min (**Figura 18, paneles B, C y D**, respectivamente). Se observó el efecto del inhibidor de PI3K en la fosforilación y distribución de esta proteína, para ello luego del periodo de incubación con el tampón, las células HEK293 fueron incubadas por 30 min en presencia del inhibidor 10 μ M, posteriormente se incorporó la citoquina 6 nM y luego se detectó p-Akt, en Ser-473 (**Figura 18, paneles E, F, G y H** respectivamente). La marca reactiva correspondiente a p-Akt se observó a nivel de la membrana celular, a nivel citoplasmático y en el núcleo celular (**Figura 18, paneles A y E, control**), luego de los 30 min de estímulo esta señal aumentó notoriamente a nivel de la membrana y citoplasma y disminuyó en el núcleo (**Figura 18, panel B y F**), luego de 60 min de estímulo la fluorescencia disminuyó notoriamente en todas las regiones mencionadas (**Figura 18, panel C**), pero a los 90 min la señal se observó mayoritariamente a nivel del núcleo (**Figura 18, panel D**). Por el contrario, las células estimuladas con IL-3 e incubadas al mismo tiempo con LY294002, presentan una p-Akt localizada a nivel citoplasmático y prácticamente ausente en el núcleo celular (**Figura 18, panel G**), algo muy similar se observó en aquellas células que sólo se incubaron en presencia del inhibidor, la señal de p-Akt disminuye a niveles similares al control (**Figura 18, panel H**).

Figura 18. Análisis de la activación de la proteína Serina/Treonina quinasa Akt en Células HEK293 estimuladas con IL-3 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 IL-3 6 nM en ausencia o presencia del inhibidor LY294002 10 μ M. **A. E.** Células no estimuladas con IL-3 (control). **B. C. D.** Células HEK293 tratadas con IL-3 durante 30, 60 y 90 minutos, respectivamente. **F.** Células incubadas con IL-3 6 nM. **G.** Células HEK293 tratadas con IL-3 durante 30 min y además en presencia de LY294002 10 μ M. **H.** Células incubadas en presencia de LY294002 10 μ M. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10 μ m. Control negativo, inserto A, en ausencia de anticuerpo primario.

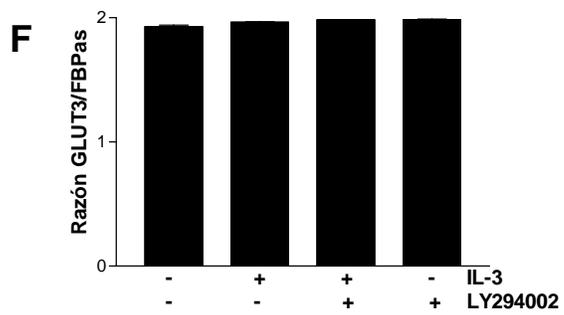
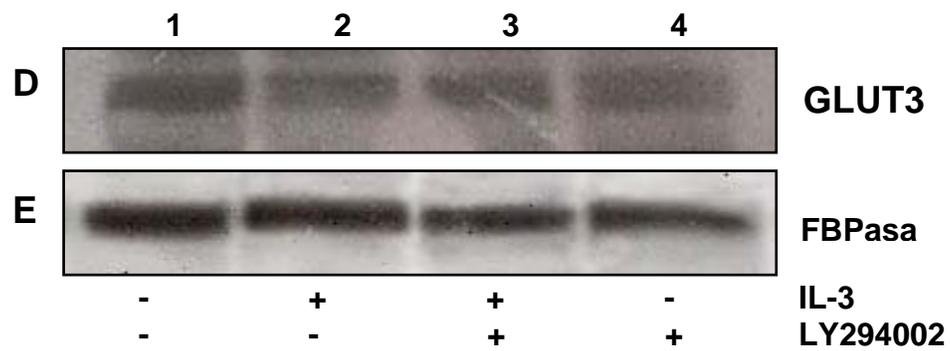
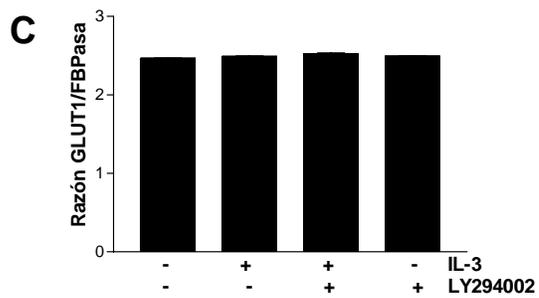
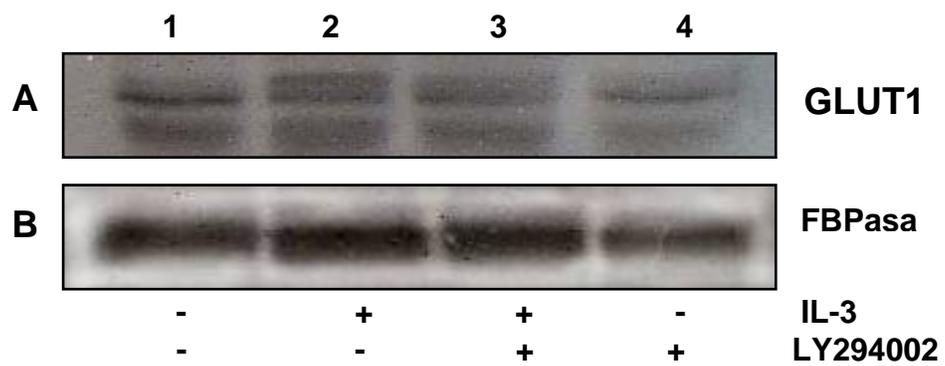


Como se observa en las inmunolocalizaciones anteriores, la localización de p-Akt en presencia de IL-3 a distintos tiempos va cambiando, es decir la proteína al tiempo de estímulo 30 minutos se observa cercana a la membrana plasmática y a medida que se aumenta el tiempo de estímulo con la citoquina, la proteína se moviliza hacia el área perinuclear. Además, se observa que en presencia del inhibidor la intensidad de la fluorescencia disminuye, lo que sugiere que LY294002 inhibe de manera indirecta la fosforilación de Akt.

4.15 ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE LA VIA PI3K EN LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS GLUT1 Y GLUT3

Como se ha visto anteriormente IL-3 no es capaz de generar un cambio en la expresión proteica de los transportadores GLUT1 y GLUT3. Para conocer si LY294002, inhibidor de PI3K, es capaz de generar cambios en la abundancia relativa de estos transportadores al bloquear a PI3K y por lo tanto río abajo la fosforilación de Akt, se realizaron ensayos de *Western blot* en los cuales las células fueron incubadas con un tampón libre de sustratos para los transportadores GLUTs durante 1 h. Posterior a este periodo, se colocó en el mismo medio, al inhibidor de PI3K LY294002 a una concentración de 10 μ M durante 30 minutos previo a la estimulación con IL-3 (6 nM). Como se puede apreciar en la **Figura 19, panel A y D**, los niveles de cada una de las proteínas inmunodetectadas, GLUT1 y GLUT3 no difirieron significativamente entre las células tratadas en ausencia o presencia de IL-3. El análisis densitométrico y la normalización de proteínas se muestran en los histogramas en la parte inferior de la **Figura 19**, respectivamente, en **B y C** para GLUT1 y en **E y F** para GLUT3.

Figura 19. Análisis de la vía PI3K/Akt sobre la abundancia relativa de GLUT1 y GLUT3 en Células HEK293. Las células HEK293 fueron preincubadas durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con IL-3 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. D.** Análisis de *Western blot* para la expresión de GLUT1 y GLUT3, respectivamente. **B. E.** Normalización de proteínas utilizando como control FBPasa. **C. F.** Histograma del análisis densitométrico de la expresión de GLUT1 (C) y de GLUT3 (F).



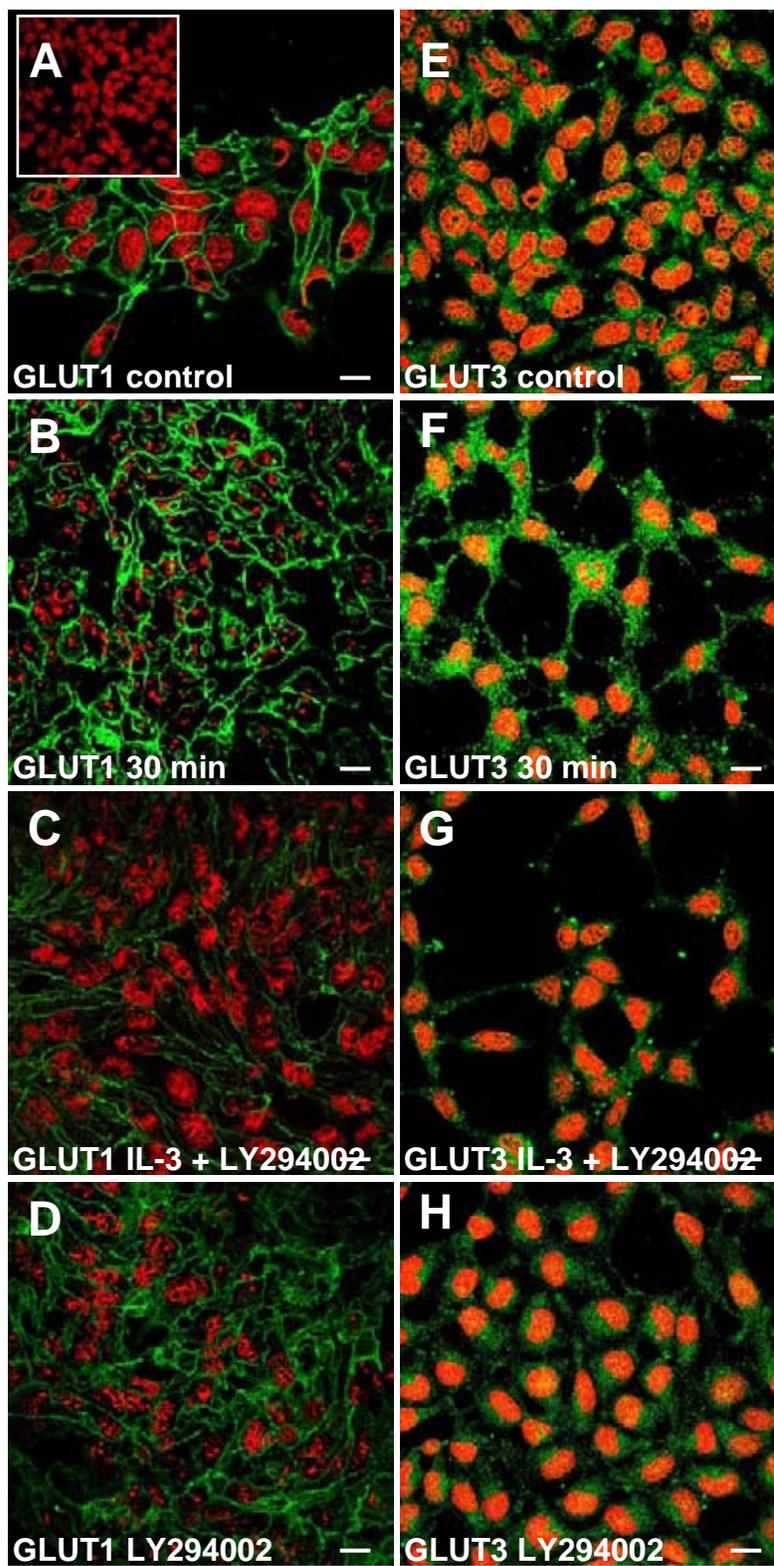
En el *Western blot* anterior no se observa un cambio en la abundancia relativa de los transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT3 en presencia de LY294002 e IL-3, lo que sugiere que la vía de señalización en que participa PI3K estaría relacionada con el aumento de transporte de OMG.

4.16 ANALISIS DE LA PARTICIPACION DE PI3K EN LA DISTRIBUCION SUBCELULAR DE GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS HEK293 EN RESPUESTA A IL-3

Como se ha descrito anteriormente, IL-3 no es capaz de generar un cambio en la abundancia relativa de los transportadores GLUT1 y GLUT3. Para conocer si LY294002, es capaz de generar cambios en la distribución subcelular de los transportadores GLUT1 y GLUT3, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia en los cuales las células fueron incubadas con un tampón libre de sustratos para los GLUTs, durante 1 h. Las células fueron estimuladas durante 30 minutos con IL-3 (6 nM) y posterior a este periodo, se colocó en el mismo medio al inhibidor de PI3K, LY294002 en una concentración de 10 μ M durante los 30 minutos posteriores (**Figura 20**). Así se observó para GLUT1 y GLUT3 que a los 30 minutos de estimulación con la citoquina se genera un aumento en la señal inmunorreactiva a nivel de la membrana y en regiones citoplasmáticas (**Figura 20, panel B y F**, respectivamente). Cuando se adicionó LY294002 a las células estimuladas con IL-3 se observó una disminución notoria a nivel de la membrana para GLUT1 y para GLUT3, se produjo también una baja en la señal con la formación de gránulos bien definidos en regiones cercanas a la membrana plasmática (**Figura 20, paneles C y G**, respectivamente), lo que probablemente se deba a vesículas en las cuales el transportador se internaliza por la ausencia de la activación de la vía estimulada por IL-3. Por último, en la **Figura 20, paneles D y H** se observa al GLUT1 y GLUT3, respectivamente, en aquellas células que fueron incubadas con LY294002 solamente, GLUT1 se presentó a nivel de membrana con una señal intensa si se compara con las células control (**Figura 20, panel A**), GLUT3 se observó en regiones citoplasmáticas y perinucleares, en forma de

gránulos con una intensidad de señal mayor a la observada en las células control (**Figura 20, paneles E**).

Figura 20. Participación de la vía PI3K/Akt en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 inducida por IL-3. Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (verde) y anti-GLUT3 (verde). Las células HEK293 fueron incubados durante 1 hora en tampón de incubación previo al tratamiento sin o con IL-3 6 nM durante 30 minutos en presencia o ausencia de LY294002 10 μ M. En los paneles **A. E.** se observa a GLUT1 y GLUT3, respectivamente, en células no estimuladas con IL-3 (control). En **B. F.** GLUT1 y GLUT3, respectivamente, en células estimuladas con IL-3 durante 30 minutos. **C. G.** GLUT1 y GLUT3 en células incubadas con el inhibidor LY294002 durante 30 minutos, respectivamente. **D. H.** GLUT1 y GLUT3 en células HEK293 estimuladas con IL-3 durante 30 minutos en presencia de LY294002 10 μ M, respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (rojo) y las barras de magnificación corresponden a 10 μ m. Control negativo, inserto panel A.



De acuerdo a las inmunolocalizaciones anteriores, ambos transportadores GLUT1 y GLUT3 disminuyen su señal inmunorreactiva y su localización en presencia del inhibidor LY294002, lo que sugiere que la vía PI3K/Akt participa en su movilización subcelular a los 30 minutos de estímulo con IL-3.

4.17 PARTICIPACION DE LA VIA DE SEÑALIZACION MAPK EN EL TRANSPORTE DE OMG EN CELULAS HEK293

Se ha reportado que la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana celular, bajo el estímulo de la hormona insulina, ocurre por la participación de la vía PI3K, pero se ha visto que en la línea celular 3T3-L1 derivada de adipocitos y en células musculares, la translocación de este mismo transportador, ocurre por la participación de la vía de señalización MAPK (Ressel y col., 1999; Sweeney y col., 1999). Otro estudio en el que también utilizan a las células 3T3-L1 reporta que la captación de glucosa mediada por GLUT1 se produce por la participación de p38 proteína río abajo de la vía MAPK (Barros y col., 1997). De manera similar, en condrocitos humanos estimulados por IL-1 β se observa la participación de la vía MAPK/p38 en la translocación de GLUT1 y en el aumento de los niveles de su mRNA (Shikham y col., 2004). Como se ha visto en este trabajo, IL-3 es capaz de generar un aumento en la incorporación de OMG en las células HEK293 mediante la movilización de los transportadores facilitativos GLUT1 y GLUT3, posiblemente mediada por la vía de señalización PI3K, pero basados en los antecedentes expuestos anteriormente la vía MAPK también podría tener alguna participación en este proceso. Es por este motivo que se decidió realizar ensayos de transporte usando un inhibidor específico de la vía MAPK, y conocer como este bloqueo afecta el transporte de OMG en las células HEK293. Para ello, las células fueron incubadas en tampón de equilibrio, libre de sustratos para los transportadores de glucosa, luego de este proceso se incubaron con el inhibidor de la fosforilación de MEK1/2, UO126 10 μ M durante un periodo de 30 min. Posterior a esto, se les adicionó a las células la citoquina IL-3 en una concentración de 6 nM. Tras este periodo de estimulación, se midió la incorporación de OMG a 20°C durante 15 segundos a 37°C. Como se puede

observar en los resultados de la **Figura 21**, tras la incubación con la citoquina y en presencia de UO126, se produce leve aumento en la incorporación de OMG, al comparar los valores obtenidos en las células no estimuladas control.

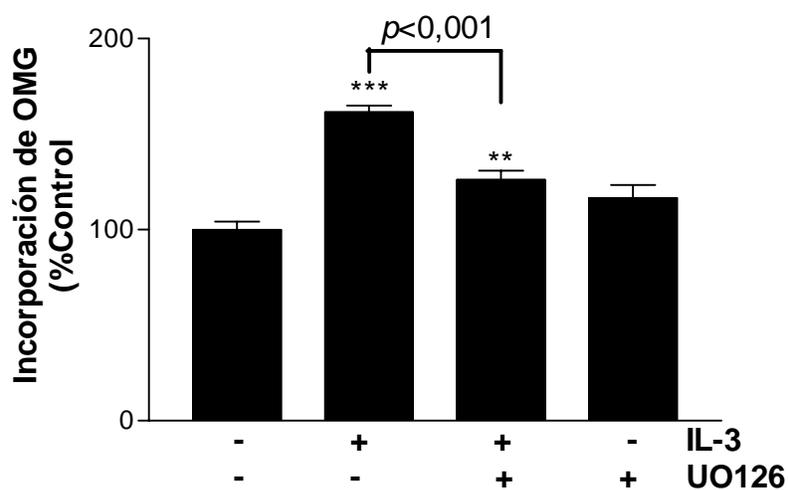


Figura 21. Participación de la vía MAP-quinasa en la estimulación del transporte de OMG en Células HEK293 inducido por IL-3. Las células HEK293 fueron preincubadas por 1 hora en tampón de incubación y tratadas con IL-3 6 nM en presencia de UO126 10 μ M. El transporte de 0,5 mM de OMG fue medido a 20°C por 15 segundos. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DS. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

De acuerdo al resultado anterior, IL-3 es capaz de generar un aumento en la incorporación de OMG, pero probablemente la ruta de señalización de las MAP-quinasas no participe o lo haga parcialmente en este proceso, a pesar del leve aumento observado en presencia de IL-3 y el inhibidor de la vía utilizado. Esto se debe posiblemente a que UO126 no es capaz de inhibir completamente esta captación. Pero para determinar de una manera más fehaciente este hecho, es necesario realizar ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia en presencia de IL-3 y del inhibidor UO126 y detectar proteínas activas río abajo de MEK1/2 y ver si esta vía realmente participa en la incorporación de glucosa mediada por los transportadores GLUT1 y GLUT3.

4.18 EXPRESION DE LAS SUBUNIDADES α Y β DEL RECEPTOR PARA IL-3 EN CELULAS DE SERTOLI 42GPA9

Como se ha dicho anteriormente las células HEK293, son un excelente modelo de estudio de la actividad de IL-3, ya que representan células periféricas que no forman parte del sistema inmune o hematopoiético. En nuestro laboratorio se ha descrito la presencia del receptor para GM-CSF, que pertenece a la misma familia de receptores de IL-3, en espermatozoides en diferentes estados de maduración en el túbulo seminífero. Esta maduración ocurre bajo el control directo de las células de Sertoli (Bourdon y col., 1998) llamadas también “nurse cells”, ya que la proliferación, diferenciación y metabolismo de los espermocitos primarios, secundarios y espermátidas en el compartimento adluminal del túbulo seminífero ocurre bajo la influencia de estas células (Jegou, 1993; Griswold, 1998). Por este motivo y como un segundo modelo de célula no hematopoiética, se quiso indagar si estas células expresaban el receptor para IL-3 y si además esta citoquina era capaz de generar cambios en la incorporación de glucosa.

En nuestro laboratorio existen datos preliminales acerca de la presencia de los transportadores GLUT1 y GLUT3 en las células de Sertoli, pero la existencia de receptores de moléculas señalizadoras pertenecientes al sistema inmune aún no se han reportado, menos la presencia del IL-3r. Para conocer si células de Sertoli expresan al IL-3r se decidió investigar mediante pruebas de

inmunofluorescencia, RT-PCR y ensayos de *Western blot* la presencia de las subunidades del receptor de IL-3 y además mediante ensayos de inmunohistoquímica se procedió a detectar estas subunidades en cortes de testículo de rata.

Para los ensayos de RT-PCR, la extracción de RNA fue realizada como se describe en materiales y métodos y los productos de amplificación obtenidos por el análisis demuestran la existencia del mRNA correspondiente a la subunidad α del receptor de IL-3r con un producto de amplificación de 420 pb. (**Figura 22, panel A carril 1**). Para la subunidad β de este mismo receptor no se obtuvo un producto de amplificación (**Figura 22, panel A, carril 3**), el tamaño esperado era de 390 pb. Mediante este mismo ensayo se procedió a amplificar la secuencia de mRNA correspondiente a la citoquina IL-3, con la finalidad de conocer si esta línea celular la sintetiza (**Figura 22, panel A, carril 2**), pero no fue posible observar el producto de amplificación correspondiente. Como controles de la reacción, se amplificó la secuencia de mRNA correspondiente a β -actina (**Figura 22, panel A, carril 5**) y el control negativo se hizo como el resto de las muestras, pero no se le incorporó transcriptasa reversa (**Figura 22, panel A, carril 6**).

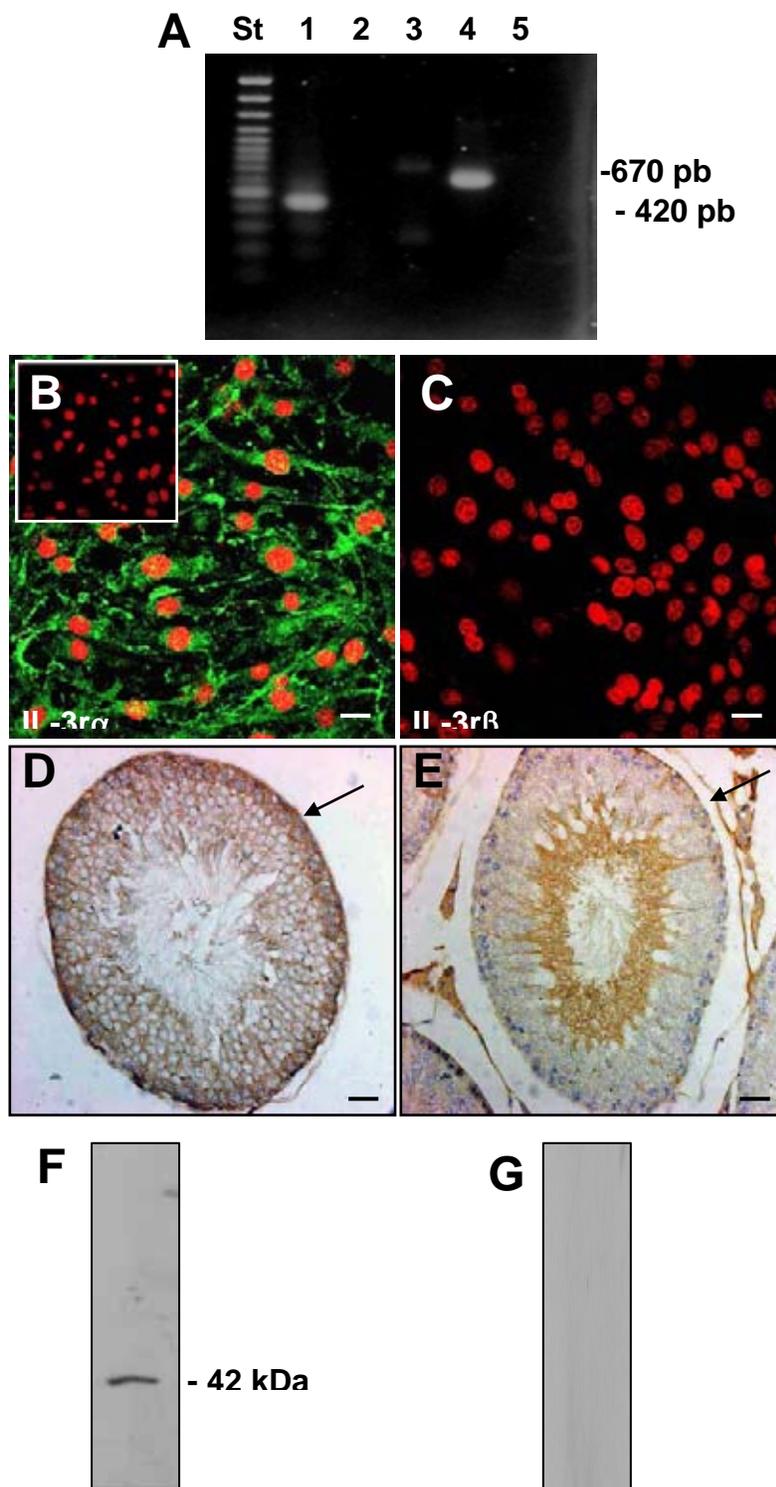
En los análisis de inmunofluorescencia se usaron anti-IL-3r α y anti-IL-3r β , correspondiente al caso y como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488. Se observó inmunorreacción positiva (verde) para la subunidad α pero no para la subunidad β del receptor de IL-3 (**Figura 22, paneles B y C**, respectivamente). La localización subcelular de la subunidad α es citoplasmática y muy cercana al núcleo celular.

Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en cortes de testículo de rata normales con el objetivo de detectar la presencia de las subunidades del IL-3r. La marca inmunorreactiva para α es intensa en todo el citoplasma de las células de Sertoli como muestra la flecha en la **Figura 22, panel D**. En la misma figura anterior, en el panel *E*, no se pudo obtener una marca inmunorreactiva para

la subunidad β del receptor de IL-3, lo que estaría acorde con los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia.

A continuación se realizaron ensayos de *Western blot*. Para esto se extrajeron proteínas totales de las células de Sertoli en cultivo y fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalantes, para luego ser transferidas a membranas de PVDF. En los *Western blot* la posición de banda correspondiente a la subunidad α con una masa de 42 kDa (**Figura 22, panel B**), que concuerda con la masa molecular (forma no glicosilada) obtenida a partir de los extractos proteicos de las células HEK293. La banda correspondiente a la subunidad β no pudo ser detectada (**Figura 22, panel C**), lo que concuerda con la ausencia del mRNA en el análisis de RT-PCR, y la carencia de señal en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

Figura 22. Inmunolocalización de las subunidades α y β del receptor de IL-3 en las Células de Sertoli 42GDA9 y en cortes de testículo de rata. Análisis de RT-PCR del IL-3r en células de Sertoli (panel **A**) en el que se observa en el carril St al estándar de 100 pb, en el carril 1 se observa el producto de amplificación de 420 pb perteneciente a la subunidad α del receptor de IL-3, en el carril 2, no se obtuvo producto de amplificación para la citoquina IL-3 al igual que en el carril 3 en el cual no se observa amplificación para la subunidad β del receptor, en el carril 4 se tiene el producto de 670 pb perteneciente al control interno de la reacción de β -actina y en el carril 6 se tiene el control negativo de la reacción. En los paneles **B. C.** se observa las inmunolocalizaciones (verde) de las subunidades α y β , respectivamente del receptor de IL-3 en células de Sertoli. En ambos paneles superiores los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio y el control negativo, en ausencia del anticuerpo primario se encuentra en el panel **B** inserto, la banda de magnificación corresponde a 10 μm . Los paneles **D. E.** corresponden a la inmunohistoquímica (café) de las subunidades α y β , respectivamente (ver flechas), en cortes de testículo de rata, magnificación 1250X. Los paneles **F. G.** muestran un *Western blot* a partir de extractos proteicos totales de células de Sertoli, en **F** se ve la banda que corresponde a 42 kDa para la IL-3r α y en **G** no se obtuvo ninguna banda para la IL-3r β .



En base a los resultados obtenidos arriba, las células de Sertoli expresan la subunidad α del receptor de IL-3, pero no expresarían la subunidad β , basado en los ensayos de RT-PCR, de *Western blot* e inmunolocalización.

4.19 EXPRESION DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS DE SERTOLI 42GPA9

Como ya se expresó anteriormente, en nuestro laboratorio se tienen antecedentes preliminares de la presencia de los transportadores de hexosas GLUT1 y GLUT3, además de GLUT2, GLUT4, GLUT5 y GLUT8 (datos no publicados) en células de Sertoli mediante ensayos de inmunofluorescencia, *Western blot* y RT-PCR. Para corroborar la presencia de los transportadores GLUT1 y GLUT3, se realizaron ensayos de RT-PCR, *Western blot* e Inmunofluorescencia.

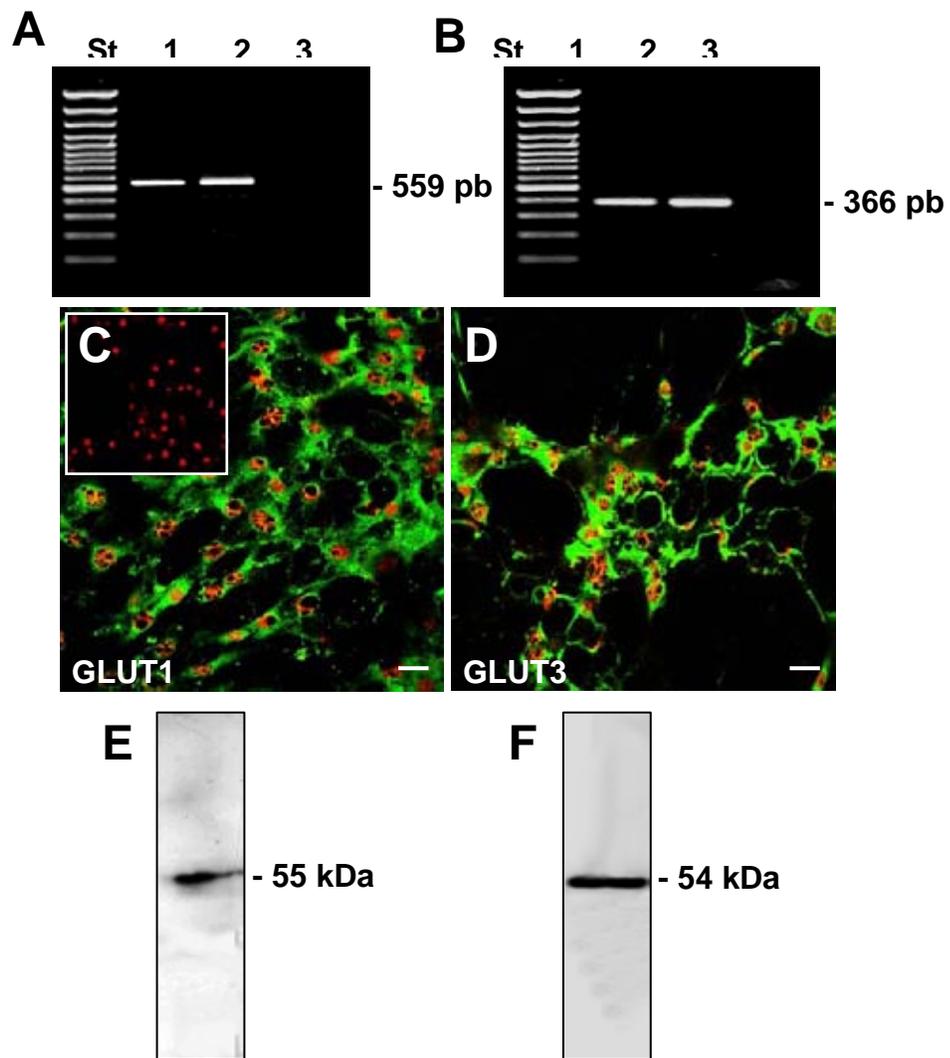
Por medio de análisis de RT-PCR se detectaron productos de amplificación correspondientes a 559 pb (**Figura 23, panel A, carril 1**) y 366 pb (**Figura 23, panel B, carril 1**), para GLUT1 y GLUT3, respectivamente. Además se hicieron controles de reacción, para la detección del GLUT1 se utilizó RNA de células de testículo como control positivo y el control negativo usado se hizo en ausencia de transcriptasa reversa (**Figura 23, panel A, carriles 2 y 3**, respectivamente). El control positivo para GLUT3 se hizo usando RNA de neuronas y el control negativo en ausencia de transcriptasa reversa (**Figura 23, panel B, carriles 2 y 3**).

En los análisis de inmunofluorescencia realizados en células de Sertoli 42GPA9, el transportador GLUT1 (**Figura 23, panel A**) muestra una señal positiva localizada en la región citoplasmática y también cercana a la membrana plasmática. Mediante este mismo análisis, fue posible detectar la presencia de GLUT3 (**Figura 23, panel B**), localizándose mayoritariamente en la zona intracelular. Además, la inmunorreacción positiva observada para GLUT3 se

presentó en forma de gránulos, lo que sugiere que este transportador se encontraría almacenado en vesículas.

Se realizaron también ensayos de *Western blot* para confirmar la presencia de ambos transportadores GLUT1 y GLUT3 en las células Sertoli. A partir de extractos proteicos totales de células en cultivo y luego de la electroforesis y transferencia, se detectó una banda de aproximadamente 55 kDa con el anticuerpo anti-GLUT1 (**Figura 23, panel C**), mientras que para el caso de GLUT3 (**Figura 23, panel D**), fue posible detectar una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 54 kDa.

Figura 23. Análisis de la expresión de transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT3 en células de Sertoli 42GPA9. A. B. Análisis de RT-PCR, los carriles st corresponden al estándar de 100 pb, los productos de amplificación de 559 pb corresponden a los de las células de Sertoli y de testículo (panel A, carriles 1 y 2, respectivamente), los productos de 366 pb corresponden a las células de Sertoli y de neuronas (panel B, carriles 1 y 2, respectivamente), en los carriles 3 de ambos paneles A y B, se tiene al control negativo de la reacción de PCR en ausencia de transcriptasa reversa. En los paneles **C. D.** corresponde a la inmunofluorescencia por microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (C, verde) y anti-GLUT3 (D, verde), el control se realizó en ausencia del primer anticuerpo (panel C, inserto) y los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). Las barras de magnificación corresponden a 10 μm . **E. F.** corresponden al *Western blot* para detectar GLUT1 (E) y GLUT3 (F) a partir de extractos totales de células de Sertoli 42GPA9, con bandas de 55 y 54 kDa, respectivamente.



En resumen, la subunidad α del receptor de IL-3 al igual que los transportadores GLUT1 y GLUT3 se encuentran presentes en la línea celular de Sertoli 42GPA9. Basados en estos resultados se concluye que las células de Sertoli 42GPA2 son adecuadas para el estudio de la acción de IL-3 en el transporte de glucosa.

4.20 EFECTO DE IL-3 EN EL TRANSPORTE DE OMG EN CELULAS DE SERTOLI 42GPA9

De acuerdo a lo presentado en este estudio, Interleuquina-3 es capaz de generar cambios en el transporte de glucosa, en las células que pertenecen al sistema hematopoiético y en células periféricas que no pertenecen a este sistema, como las HEK293. Para probar este efecto en la línea celular de Sertoli se realizaron ensayos de transporte, en el cual las células de Sertoli fueron incubadas por 1 h con un tampón de equilibrio libre de sustratos para los GLUTs, para luego ser estimuladas a tiempos de 20, 40 y 60 min con IL-3 (6 nM) y posteriormente a este estímulo se procedió a la incorporación del análogo de glucosa OMG (0,5 mM) marcado radioactivamente, durante 15 seg a 20°C, para observar los cambios en la incorporación de este azúcar mediados por la citoquina (**Figura 24**).

Tras 20 min de estímulo IL-3 produce un aumento notorio de la incorporación de OMG, si se compara con el control, sin embargo luego de 40 y 60 min el transporte de OMG decayó significativamente hasta alcanzar valores cercanos a los obtenidos en las células no estimuladas con la citoquina (**Figura 24**). Este comportamiento de las células de Sertoli dista del observado en las células HEK293 luego de ser estimuladas, ya que se observa un aumento progresivo a medida que el tiempo de estímulo se incrementa y luego de los 30 min se observa un decaimiento también progresivo.

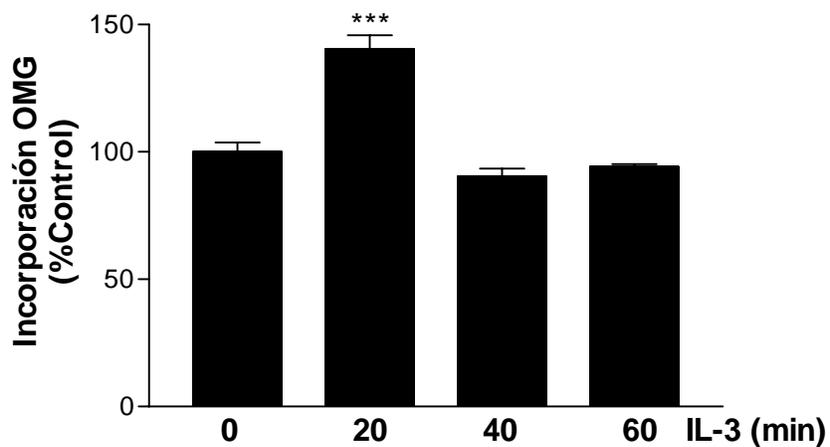


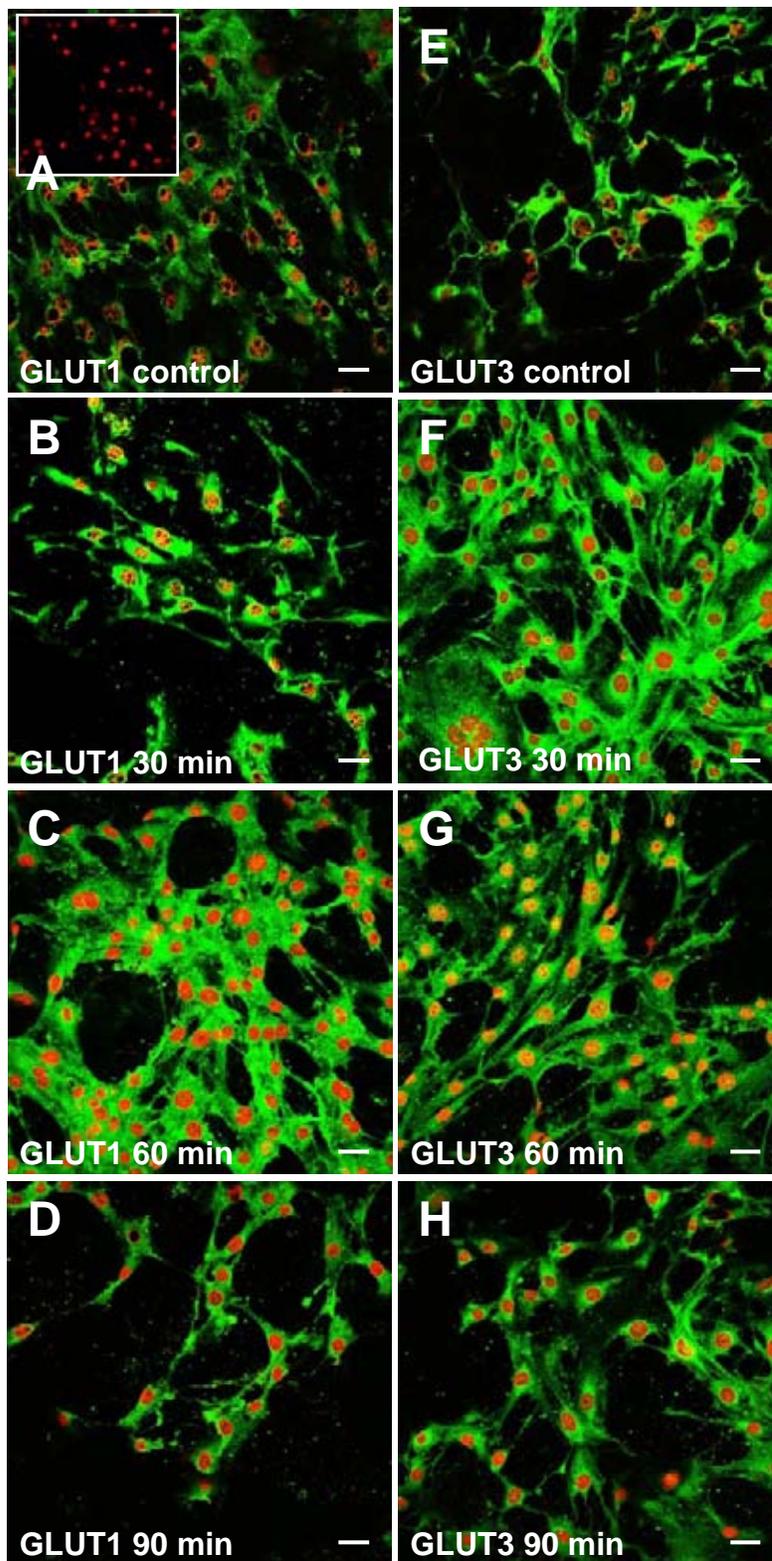
Figura 24. Estudio cinético de incorporación de OMG en células de Sertoli 42GPA9 estimuladas a diferentes tiempos con IL-3. En el panel, se observa la incorporación de OMG (0,5 mM) durante 15 seg a 20°C en % con respecto al control sin estimular, luego de variados tiempos de estimulación con IL-3 6 nM. Las barras representan el promedio de un experimento por triplicado \pm DS. *** $p < 0,001$.

4.21 EFECTO DE IL-3 EN LA DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LOS TRANSPORTADORES GLUT1 Y GLUT3 EN CELULAS DE SERTOLI 42GPA9

Como ya se demostró en las células HEK293, IL-3 es capaz de generar cambios en la localización subcelular de los transportadores GLUT1 y GLUT3, y que este cambio sería la causa del aumento de incorporación de OMG en esta línea celular estimulado por la citoquina. En base a este antecedente, se quiso ver como afectaba IL-3 en la distribución de estos GLUTs en las células de Sertoli. Para ello se hicieron ensayos de inmunofluorescencia, en los cuales se sometió a las Sertoli a diferentes tiempos de estímulo con IL-3.

El análisis de las células marcadas con el anticuerpo específico para GLUT1 reveló luego de 1 h de incubación con un tampón de equilibrio, que GLUT1 se localiza a los 30 min de estimulación en regiones citoplasmáticas con una señal muy intensa, en la que no se puede distinguir claramente si GLUT1 se ubica en zonas adyacentes a la membrana plasmática. Luego de 60 min de estímulo con IL-3, disminuye en intensidad la marca fluorescente y GLUT1 se puede localizar en su mayoría en regiones citoplasmáticas con una leve señal a nivel de la membrana celular. Por último a los 90 min con IL-3 se observa una disminución en la marca inmunorreactiva localizada a nivel citoplasmático cercana al núcleo celular. (**Figura 25, paneles A, B, C y D**, respectivamente). De la misma forma se detectó GLUT3, el cual se localizó a los 30 min de estímulo en regiones citoplasmáticas con una señal bastante intensa en comparación con el control. A los 60 min de estímulo la redistribución no fue muy notoria y además se apreció la aparición de gránulos lo que sugiere que luego de este período de estimulación, el transportador se internaliza en vesículas. Estos gránulos se mantienen luego de los 90 min de incubación con IL-3, pero la intensidad de la marca del GLUT3 disminuye y se torna perinuclear (**Figura 25, paneles E, F, G y H**, respectivamente).

Figura 25. Efecto de IL-3 en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3 en células de Sertoli 42GPA9. Análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-GLUT1 (verde, *A, B, C, D*) y anti-GLUT3 (verde, *E, F, G, H*). Las células de Sertoli fueron incubadas durante 1 hora en tampón de equilibrio previo al tratamiento con IL-3 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 de Sertoli estimuladas durante 60 minutos con IL-3, detección de GLUT1 (*C*) y GLUT3 (*G*). ***D. H.*** Células estimuladas con IL-3 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 μm . Control negativo, inserto *A*.



Como se vio en las figuras anteriores, se puede decir que las células de Sertoli 42GPA9 expresan la subunidad α del receptor de IL-3, además de los transportadores de alta afinidad por glucosa GLUT1 y GLUT3. Esta citoquina es capaz de generar un aumento máximo en la incorporación de OMG a los 20 min de incubación por lo que estas células se comportan de una manera similar a las HEK293. Además, GLUT1 y GLUT3 van cambiando su localización dentro de las células, a medida que aumenta el tiempo de estimulación con IL-3, observándose un aumento en la marca fluorescente, proporcional al tiempo de estimulación. Este ensayo demuestra que IL-3 es capaz de generar cambios al menos en la localización de estos transportadores y que estos podrían ser los responsables del aumento de incorporación de glucosa, de manera muy similar a lo visto en las células HEK293.

5. DISCUSION

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo conocer si la citoquina IL-3 era capaz de generar aumentos en la captación de glucosa mediante la movilización de transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) hacia la membrana celular y si en este proceso participan la vías de señalización JAK2, PI3K/Akt y MAPK, utilizando como modelo la línea celular derivada de riñón humano en etapa embrionaria, HEK293.

Interleuquina-3 es una de las citoquinas que tiene un rol principal en el desarrollo y función de las células hematopoiéticas y además participa en sucesos relacionados con la respuesta inmune. Esta citoquina es sintetizada principalmente por los linfocitos T, específicamente los denominados Th (Linfocitos T “helper”), los cuales al activarse frente a antígenos circulantes y amenazadores sintetizan y liberan IL-3, la cual viaja hacia su receptor presente en células maduras e inmaduras que forman parte de nuestro torrente sanguíneo y médula ósea, respectivamente. Este receptor es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad α y β c, la primera es la que da especificidad de unión al receptor y une a IL-3 con baja afinidad y la segunda subunidad en conjunto con α constituye un receptor de alta afinidad, esta subunidad β también es compartida por los receptores para GM-CSF e IL-5 (Hayashida y col., 1990; Kitamura y col., 1991) y además su rol principal es generar mediante cambios conformacionales la activación de cascadas intracelulares de fosforilación, que desembocan en factores de transcripción existentes en el núcleo celular y que activan la síntesis de proteínas que participan en procesos de proliferación, supervivencia, diferenciación y crecimiento celular.

El receptor de IL-3 no tiene actividad tirosina quinasa intrínseca, por lo que necesita para su activación la participación de proteínas quinasas, como es el caso de JAK2 (Janus quinasa-2), la cual se fosforila a sí misma y a las tirosinas de la subunidad β c del receptor, activándolo. Así β c es capaz de activar tres rutas descritas, como son la vía PI3K/Akt, la vía MAPK y la vía JAK/STAT. Todas ellas generan diversas actividades, como inhibir la apoptosis, estimular el crecimiento y

desarrollo celular, proliferación, diferenciación, motilidad y supervivencia. La vía PI3K/Akt es una de las rutas que se activa casi inmediatamente luego de la asociación de factores de crecimiento y citoquinas a su receptor dentro de las que se cuenta IL-3.

Es importante mencionar que las subunidades del receptor de IL-3 no sólo se expresan en células de origen hematopoiético, en donde fueron descritas por primera vez, si no que también en una variedad de células como son trofoblastos de placenta, células endoteliales y neuronales (Colotta y col., 1993; Konishi y col., 1999; Wen y col., 1998). En algunos casos se genera la inducción de actividades como son la proliferación y migración tanto en células endoteliales humanas como tumorales (Busolino y col., 1991; Colotta y col., 1993). En nuestro laboratorio se ha demostrado que en células tumorales, IL-3 al unirse a su receptor, es capaz de inducir una serie de eventos que conducen finalmente a la supervivencia y a un efecto neuroprotector frente a la acción neurotóxica del péptido β -amiloide (Zambrano, 2004). Además, también en nuestro laboratorio, se ha reportado la presencia del receptor de GM-CSF que pertenece a la misma familia de citoquinas que IL-3, y se ha demostrado que GM-CSF induce un aumento en la captación de glucosa e inclusive de vitamina C a través de los transportadores facilitativos de hexosas en células germinales masculinas (Zambrano y col., 2001; Vilanova y col., 2003a; Vilanova y col., 2003b; Rauch y col., 2004; Werner, 2005). El detalle de la significancia fisiológica y los mecanismos moleculares implicados en estas actividades son aún desconocidos.

En el año 2003 Bentley y sus colaboradores investigaron el efecto de IL-3 en el aumento de la captación de glucosa en la línea celular IC2.9 derivada de mastocitos, producida por IL-3 y mediada por transportadores facilitativos de hexosas o GLUTs. Hasta hoy se han descrito catorce isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas, dentro de los cuales, los que presentan mayor afinidad por glucosa son GLUT1 y GLUT3. GLUT1 se caracteriza por ser expresado prácticamente en la mayoría de las células de nuestro organismo, siendo notable en eritrocitos, células fetales, placenta y riñón, mientras que el GLUT3 no es expresado de manera tan universal, pero su presencia se destaca

en células cerebrales, de placenta y a nivel renal y testicular (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, como un mecanismo de supervivencia, en un proceso que dependería del citoesqueleto y de la activación de la vía de PI 3-quinasa (Bentley y col., 2003).

Es importante recalcar que hasta la fecha la información obtenida sobre la participación de IL-3 en la supervivencia y en otras respuestas celulares, son en células de origen hematopoiético, teniéndose sólo algunos datos que sugieren que esta citoquina tiene un rol bastante similar en otros tejidos que expresen su receptor. Por ello, conociendo antecedentes en los cuales se involucra a IL-3 como una citoquina capaz de aumentar la supervivencia celular mediante el aumento de 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 datos previos obtenidos en nuestro laboratorio expresa los transportadores GLUT1 y GLUT3. De esta forma resultó ser un buen modelo para llevar a cabo estudios sobre la existencia del receptor de IL-3 y el rol que cumpliría esta citoquina en células diferentes a las encontradas en el sistema hematopoiético.

En este trabajo se demostró por primera vez mediante análisis de inmunofluorescencia y *Western blot* la presencia de ambas subunidades del receptor para IL-3 en células HEK293 en cultivo. Los análisis de inmunofluorescencia muestran que IL-3 α se encuentra localizada de manera abundante en la región intracelular y en mucha menor cantidad a nivel de la membrana plasmática celular. Por otro lado, IL-3 β , presenta una localización muy similar a IL-3 α , encontrándose en el compartimento intracelular y con un patrón de inmunorreacción punteado, lo que sugiere que esta proteína se encuentra en vesículas al interior de las células, lugar de donde podría ser liberada frente a determinados estímulos extracelulares como IL-3. Una vez determinada la presencia de estas proteínas en células HEK293, fue necesario demostrar la

expresión tanto de IL-3 α como de IL-3 β 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 42 kDa para la subunidad α de IL-3, masa molecular que concuerda con los datos presentes en la literatura de una subunidad α sin glicosilaciones. La subunidad α del receptor de IL-3 puede presentar diferentes masas moleculares, en un rango que va desde los 40 kDa si la proteína no se encuentra glicosilada y entre los 60 y 90 kDa, en presencia de glicosilaciones. Son 5 los sitios potenciales de N-glicosilación en su dominios extracelulares, pero la función de estas glicosilaciones es aún desconocida (Nicola, 1997). En este estudio se deduce que la IL-3 α que se expresa en esta línea celular no presenta N-glicosilaciones.

Para la subunidad β de este receptor se obtuvo una banda de 120 kDa, hecho que sugeriría una leve glicosilación de la proteína (Kitamura y col., 1991). Del mismo modo, se realizaron análisis de RT-PCR, inmunofluorescencia y de *Western blot* para detectar y corroborar 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 mM respectivamente. De acuerdo a los antecedentes obtenidos en la literatura, las células HEK293 expresan los transportadores GLUT1 y GLUT9 (Augustin y col., 2004). A través de los análisis de RT-PCR fue posible obtener productos de amplificación de 556 pb para GLUT1, que permitieron corroborar su presencia y para GLUT3 un producto de 411 pb, que señala su expresión en esta línea celular. Ambos productos de amplificación presentan un tamaño que concuerda con los descritos para ambos transportadores en la literatura (Castro, 2005). En los estudios de inmunofluorescencia se corroboró que las células HEK293 expresan GLUT1 y que además expresan GLUT3. En el caso del transportador GLUT1, se observó inmunolocalización tanto a nivel de la membrana plasmática como en la región citoplasmática. Por su parte, el transportador de glucosa GLUT3 se presentó un patrón punteado o granular que hace suponer que este transportador

se encontraría contenido en vesículas, a la espera de estímulos extracelulares que permitan su liberación. Sin embargo, esta idea es sólo una sugerencia, ya que para su corroboración es necesario utilizar marcadores celulares para estos organelos y realizar estudios de colocalización con GLUT3. 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 se debe posiblemente a una leve glicosilación, pues se ha descrito que GLUT1 y en general los transportadores de glucosa poseen dos posibles sitios de N-glicosilación, uno ubicado en la posición 45, localizado en el asa 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). El análisis de *Western blot* del transportador de glucosa GLUT3 reveló la presencia de una única banda inmunorreactiva de aproximadamente 53 kDa.

Volviendo a la expresión del receptor de IL-3, antecedentes en la literatura han reportado la presencia de IL-3r en periodos muy tempranos del desarrollo encontrándose en células precursoras de diversos órganos, entre los que se cuenta el tejido renal (Athanasassakis y col., 1987). Considerando estos datos y para tener un acercamiento fisiológico de la expresión del receptor de IL-3 en etapas adultas del desarrollo, se realizó un análisis de inmunohistoquímica en cortes de riñón de rata. Es así como la inmunohistoquímica mostró que sólo la subunidad β del receptor de IL-3 se expresa en etapas adultas, no así la subunidad α , posiblemente debido a la sensibilidad de la técnica. Se realizó este mismo estudio a modo de comparación, para las subunidades α de los receptores para GM-CSF e IL-5 en cortes de riñón de rata. No fue posible observar una marca inmunorreactiva para IL-5 α pero sí para GM-CSF α , lo que sugiere que IL-5 α e IL-3 α no estén presentes en este tejido y que sus funciones son probablemente del tipo estado específicas en el riñón. Es decir, las células renales

expresarían el receptor para IL-3 e IL-5 en etapas tempranas del desarrollo cuando se requiera proliferación, supervivencia, migración o maduración y en etapas adultas, cuando se produzcan injurias o daños más extensos u otras alteraciones. GM-CSF en cambio tendría un rol independiente del estado de desarrollo del tejido renal. Es importante mencionar que sí se observó inmunorreacción positiva para la IL-3 α (datos no mostrados) a nivel de los vasos sanguíneos que irrigan todo el tejido renal, ésto concuerda con lo descrito para el receptor de IL-3 que se encuentra presente en las células epiteliales.

En cuanto a la subunidad β del receptor, ésta pudo ser detectada en el epitelio cercano a los glomérulos y principalmente en los túbulos colectores. Es importante recordar que el receptor de IL-3 puede tener dos tipos de subunidades β en murinos, la β_c y otra denominada subunidad β_{IL-3} , específica para IL-3, que se expresa en ratones y ratas. β_{IL-3} presenta un 91% de identidad con la β_c y además es capaz de unir a IL-3 pero con baja afinidad, por lo tanto su presencia en este tejido y durante la etapa de adultez permite probablemente que IL-3 se una a este receptor y ejerza sus funciones en casos específicos en los que las células lo requieran. No hay que olvidar que las células renales expresan a la subunidad α del receptor de GM-CSF que comparte esta subunidad junto con IL-3 e IL-5, por lo que la presencia de esta β_c posiblemente se deba también a que forma parte del receptor de GM-CSF de alta afinidad.

Por otro lado, la literatura ha documentado la expresión tanto de GLUT1 como de GLUT3 en riñón en todas las etapas de su desarrollo (Wallner y col., 2001). 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 los resultados obtenidos por los estudios de inmunohistoquímica se puede sugerir que la subunidad β , la subunidad α del receptor para GM-CSF y los transportadores GLUT1 y GLUT3 presentes en zonas similares del riñón, podrían

dar cuenta de un aumento de la captación de glucosa y la forma oxidada de la vitamina C gatillada por este tipo de citoquinas, similar a lo encontrado en, neutrófilos, monocitos humanos, la línea celular HL-60 e incluso células germinales masculinas (Vera y col., 1998; Zambrano y col., 2001; Rauch y col., 2004; Werner, 2005).

Con la finalidad de corroborar la expresión de transportadores de glucosa en la línea celular HEK293 y analizar sus características funcionales en estas células, se realizaron ensayos de transporte basados en el uso de radioisótopos. Para ello se utilizó al 3-*o*-metil-D-glucosa (OMG), un análogo de glucosa radiactivo que no es metabolizado por hexoquinasa al ingresar a 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 de velocidad inicial del transporte (etapa lineal). 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 propuso que la Km observada en este análisis corresponde a la suma de las actividades de ambos transportadores, dado que los análisis de inmunofluorescencia realizados, la expresión de GLUT3 sería algo mayor que la expresión de GLUT1 en células HEK293 en cultivo. Un resultado similar se pudo obtener cuando los datos obtenidos se sometieron a un análisis de Eadie-Hofstee, arrojando 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 se esperaba, debido a la presencia de dos transportadores, GLUT1 y GLUT3, puede explicarse como un problema de la técnica, pues 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 si son metabolizados y acumulados.

Es importante mencionar, que según análisis de *Western blot* las HEK293 no serían capaces de producir IL-3 (datos no mostrados). No obstante, hay que considerar que IL-3 circula *in vivo* a muy bajas concentraciones, siendo prácticamente indetectable (Hamilton y col., 2004). Por ende, la técnica utilizada puede no haber sido lo suficientemente sensible para determinar la presencia de la citoquina. Para ello, existen análisis con mayor sensibilidad como los ensayos de ELISA, que cuentan con estándares de concentración conocida para IL-3 (Hellmich y col., 2004). Otra alternativa es realizar análisis de hibridación *in situ* para determinar al menos si las células cuentan con el mensajero para IL-3.

Luego de haber realizado los análisis de expresión de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3 y haber establecido las condiciones óptimas para la realización de los estudios cinéticos, se procedió a estudiar un posible efecto de IL-3 sobre el transporte de OMG en células HEK293. Como se mencionó anteriormente, integrantes de esta familia de citoquinas han sido descritas como capaces de gatillar el aumento de la captación de glucosa e incluso de vitamina C mediada por los transportadores facilitativos de hexosas (Rauch y col., 2004; Spielholz y col., 1995; Vera y col., 1998; Zambrano y col., 2001). Con este fin, se determinó la incorporación de OMG en respuesta a diferentes concentraciones de IL-3 en un rango de 0 a 12 nM. Con los experimentos realizados se observó que en células HEK293, IL-3 es capaz de generar un aumento significativo en la captación de OMG, aumentando su incorporación en prácticamente un 70% en comparación a las células control, todo esto a una concentración de IL-3 de 6 nM. A concentraciones de 1,5 y 3 nM de IL-3, la incorporación de OMG no difiere significativamente si se compara con las células no tratadas con la citoquina. A 12 nM de IL-3, la captación de este análogo disminuye levemente si es comparada con la captación de OMG a concentraciones de IL-3 6 nM. Esta disminución podría encontrar su explicación en la internalización del receptor de IL-3, producto de su desensibilización a altas concentraciones de su ligando. Así, a través de este análisis se confirmó además

que los receptores para IL-3 son funcionalmente activos en la línea celular HEK293. Luego de conocer que IL-3 efectivamente era capaz de gatillar un aumento en el transporte de metilglucosa, se procedió a escoger un tiempo fijo y adecuado para la estimulación de las células. De esta forma, el paso siguiente fue determinar el tiempo en que ocurría la máxima respuesta a la citoquina. Con este propósito las células HEK293 fueron incubadas con IL-3 a una concentración de 6 nM a diferentes tiempos, midiéndose la incorporación de OMG en las condiciones ya establecidas. Los resultados indicaron que IL-3 es capaz de causar un incremento agudo en el transporte de metilglucosa, el cual fue significativo a los 30 minutos de estimulación con respecto a las células que no fueron estimuladas con la citoquina. El aumento en la captación de OMG continuó siendo significativo posterior a los 30 minutos del tratamiento de las células con IL-3. En células tratadas con IL-3 durante 60 minutos, la captación de metilglucosa disminuyó levemente y luego de los 90 min se alcanzaron valores cercanos a los obtenidos en las células control (no estimuladas con IL-3). En base a estos antecedentes se sugiere que IL-3 activa de una manera aguda, el transporte de glucosa con un máximo a los 30 min y luego esta captación se prolonga a través del tiempo hasta pasados los 90 min de estímulo. Luego de realizados estos experimentos, se concluyó que las condiciones adecuadas para realizar los análisis posteriores eran a una concentración de IL-3 de 6 nM y un tiempo de estimulación de 30 minutos. El paso siguiente fue dar respuesta a las posibles explicaciones existentes para el aumento en la incorporación de OMG bajo el estímulo de IL-3. Una de ellas, fue que la citoquina era capaz de producir un aumento en la abundancia relativa 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 3.2.10, y las proteínas totales extraídas se separaron por SDS-PAGE y fueron sometidas a análisis de *Western blot*. Como se pudo apreciar en los resultados, no se observaron variaciones en la cantidad total de transportador GLUT1 ni GLUT3 en células estimuladas con IL-3 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 IL-3, puede explicarse por una redistribución o movilización 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 y col., 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 a la citoquina. El análisis de las células marcadas con el anticuerpo anti-GLUT1 revelaron que a los 30 minutos de estimulación con IL-3, las células muestran un alza en la intensidad de fluorescencia intracelular, además de un notable aumento del transportador GLUT1 en la membrana plasmática, al compararlas con las células control. El hecho de que el control (células no estimuladas) presente fluorescencia en forma de gránulos en el compartimiento intracelular, y que luego de los 30 minutos de estímulo con la citoquina ésta desaparezca y que regiones cercanas a la membrana plasmática aumenten en intensidad, sugiere que en ausencia de estímulos extracelulares como IL-3, las células presentan una reserva del transportador GLUT1 contenido en vesículas intracelulares. Tras la estimulación con IL-3, GLUT1 puede ser liberado, permitiendo su llegada a la membrana celular plasmática, lo que explicaría también el aumento de GLUT1 en la superficie celular. Este hecho se correlaciona perfectamente con el aumento en la incorporación de OMG producido a los 30 minutos de estimulación con IL-3, pues al existir una mayor disponibilidad del transportador GLUT1 en la membrana, permitiría una mayor captación de metilglucosa. También se observó que tras 60 minutos de tratamiento con IL-3, GLUT1 aún puede ser encontrado en gran medida 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 leve 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 IL-3, 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 con IL-3, se puede

observar que el transportador GLUT1 sigue encontrándose en la membrana, pero en menor cantidad y en el citoplasma se pueden observar gránulos similares a los vistos en las células control, lo que concuerda también con la disminución de incorporación de OMG en el mismo tiempo de estimulación. Del mismo modo, se realizó un análisis de inmunofluorescencia para el transportador GLUT3. Las células estimuladas con IL-3 por 30 minutos mostraron un aumento bastante considerable en la intensidad de fluorescencia intracelular, al compararlas con las células control, en las cuales GLUT3 se encuentra localizado en forma citoplasmática con un patrón muy poco distinguible por la intensidad de la señal. El hecho de que se esté pesquisando una mayor intensidad de fluorescencia tras estimular a las células con IL-3 puede dar cuenta de que en las 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 IL-3 este epítipo cambie la conformación que habitualmente posee. Así en el momento de su detección, lo que se ve reflejado en el incremento de la fluorescencia, se suma a la liberación de los transportadores desde vesículas intracelulares. Al analizar los resultados de la inmunofluorescencia tras 60 minutos de tratamiento con la citoquina se puede observar que la localización de GLUT3 en comparación a la encontrada a los 30 minutos difiere bastante ya que es posible observar un patrón de señal granulado, sugiriendo que en ausencia o al disminuir estímulos extracelulares, se encuentra en regiones cercanas al Golgi y contenido en vesículas, siendo liberado luego que se ha producido el estímulo con la citoquina. Por otro lado y tras 90 minutos de incubación con IL-3, GLUT3 puede ser observado en regiones cercanas al núcleo, imagen similar a lo encontrado en las células control, lo que indicaría que el transportador ha sido internalizado tras haber transportado 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 IL-3 es producto de una redistribución de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática. En el caso de otras citoquinas como GM-CSF, miembro de la familia de Interlequina-3, se ha reportado que tiene efectos similares a los visto con IL-3,

siendo capaz de generar cambios en la localización de transportadores facilitativos de hexosas (Jara, 2006).

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 IL-3 en células HEK293 podría ser una de estas estrategias. Por ejemplo, ya se había reportado que IL-3 era capaz de generar cambios en la movilización de GLUT1 y generar aumentos en la captación de glucosa (Bentley y col., 2003) y además de mantener proteínas en la superficie celular, no sólo a transportadores de glucosa, sino que también a transportadores de aminoácidos, hierro y lipoproteínas de baja densidad (Edinger y col., 2002). Se ha observado una situación similar a la ocurrida en la línea celular HEK293 en respuesta a IL-3, 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 y col., 2004).

Todas las células en general son capaces de llevar proteínas de diversa índole, cuando son requeridas, desde compartimientos intracelulares como vesículas a la membrana plasmática. Basados en estos antecedentes se quiso conocer si el receptor para IL-3, es capaz de movilizarse dentro de la célula bajo estimulación con la citoquina IL-3. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en los cuales se vio a los 30 minutos de estimulación con la citoquina, que las subunidades α y β del receptor de IL-3, aumentaron notablemente su señal inmunorreactiva y su localización fue intracelular y cercana a la membrana plasmática. En el caso de la subunidad α , la señal inmunorreactiva se mantiene a lo largo de los 60 y 90 minutos de estímulo, no así la subunidad β , la cual a los 60 minutos de estímulo se localiza a nivel perinuclear y la señal disminuye notoriamente, pero luego a los 90 minutos en presencia de la citoquina, esta subunidad recupera su intensidad y se localiza en regiones citoplasmáticas, similar a lo visto a los 30 minutos de estimulación. Existe una diferencia notable entre las señales inmunorreactivas para ambas subunidades del receptor para IL-

3, debido probablemente a que la subunidad β del receptor de IL-3 se encuentra en menores cantidades que la subunidad α . Como ya se ha dicho, la subunidad β mediante su cola intracelular es la que activa las cascadas de señalización intracelulares, pero se ha demostrado por ejemplo, que la subunidad α del receptor de GM-CSF es capaz de activar también vías de señalización y modular el transporte de glucosa (Dhar-Mascareno y col., 2003). Aún no ha habido reportes de que la subunidad α del receptor de IL-3 pueda generar estos efectos. La localización de la subunidad IL-3 α durante los tres tiempos de estimulación probados con la citoquina se vio en regiones prácticamente intracelulares y con una intensidad casi invariable. IL-3 β presentó a los 30 minutos de estimulación un máximo en la intensidad de señal a nivel citoplasmático, que concuerda con los ensayos de inmunofluorescencia realizados para GLUT1 y GLUT3, en los cuales se observa también un aumento de la señal inmunorreactiva y que además se asocian probablemente con el aumento máximo en la captación de OMG, observado en los ensayos de transporte. El aumento de la señal observada en esta misma subunidad a los 90 minutos se debió probablemente a una nueva activación de la subunidad por la llegada de IL-3 circulante, es decir las vesículas que lo contienen emergerían a la membrana a medida de la llegada de IL-3 o por la activación de una segunda ruta de señalización o de la misma vía PI3K (ver más abajo). Para corroborar estas respuestas será necesario realizar ensayos de *Western blot* en los cuales las células se estimulen a los tiempos ya analizados en las células HEK293 y así detectar tirosinas fosforiladas que den cuenta de la activación de esta subunidad y de las posibles vía de señalización activadas por la estimulación.

Como ya se ha dicho anteriormente el receptor para IL-3 es capaz de desencadenar una serie de respuestas celulares por la activación de una variedad de rutas de señalización intracelulares. La subunidad β ausente de una actividad tirosina quinasa intrínseca, es la encargada de generar la activación de las vías de señalización, mediante la fosforilación en sus residuos de tirosina específicos por la proteína Janus quinasa-2, JAK2, que activa a IL-3 β y genera sitios blanco de unión de proteínas quinasas (como es PI3K) o proteínas de anclaje o asociación

(como Shc), que generan a su vez las cascadas de fosforilación citoplasmáticas para desencadenar la expresión de proteínas relacionadas con proliferación, diferenciación, supervivencia, crecimiento entre otras. Por este motivo JAK2 es considerada la quinasa que activa al receptor de IL-3 y por tanto activa las vías de señalización celular gatilladas por IL-3. En este trabajo fue posible demostrar que JAK2 se activa por la presencia de IL-3 y que además es la que inicia la activación de la(s) ruta(s) de señalización asociadas a la captación de OMG en las células HEK293. En los ensayos de inmunofluorescencia se pudo observar que JAK2 aumenta su grado de fosforilación de una manera directamente proporcional al tiempo de estímulo con IL-3. La intensidad de la señal fluorescente para p-JAK2 (fosforilada en Tyr-1007/Tyr-1008) se observa a nivel citoplasmático a partir de los 30 minutos de estimulación, luego a los 60 minutos de estímulo se observa una mayor intensidad de señal con un patrón claramente punteado o granular que sugiere la presencia de esta quinasa en vesículas intracelulares. Posteriormente a los 90 minutos, la intensidad de estos gránulos es aún mayor, lo que lleva a pensar que a medida que IL-3 se mantiene en contacto con su receptor se fosforila un mayor número de estas proteínas quinasas.

Una vez comprobada la activación de JAK2 a los tiempos crecientes de estimulación con la citoquina, se procedió a detectar si al inhibir a esta quinasa se generaban diferencias en su localización y si realmente ocurría una inactivación de esta quinasa. Es así que en ensayos de inmunofluorescencia en células preincubadas con el inhibidor sintético y específico de JAK2, AG490, la intensidad de la señal de p-JAK2 disminuye notoriamente a nivel citoplasmático. Algo muy similar se observó en aquellas células estimuladas con IL-3 y en presencia de AG490, ya que el patrón punteado visto en los ensayos de inmunofluorescencia a tiempos crecientes de estimulación con IL-3 se mantuvo, pero su intensidad fue bastante similar a las de las células control, lo que nos indicaría que la fosforilación de JAK2 es casi totalmente dependiente de IL-3.

Luego de comprobar que JAK2 es fosforilada por la unión del ligando al IL-3r, fue necesario comprobar si JAK2 era capaz de activar la(s) vía(s) de transducción de señal(es) que participan en la translocación de los GLUTs y en el

aumento de la captación de glucosa en las células HEK293. Para ello se realizaron ensayos de transporte usando el análogo de glucosa OMG, y al inhibidor de la quinasa JAK2. Las células HEK293 fueron incubadas con AG490 30 min previos a la estimulación con IL-3, para luego medir el transporte de OMG. Es así como en aquellas células estimuladas por IL-3 y preincubadas con AG490, el transporte de metil-glucosa fue muy similar al de las células no estimuladas, lo que indica que JAK2 es indispensable para la activación de las rutas de señalización que participan en la movilización de los transportadores GLUT1 y GLUT3 y del aumento en la incorporación de glucosa en presencia de IL-3.

Al comparar los resultados hasta aquí obtenidos se observa que algunos de ellos presentan una gran similitud a los descritos por Bentley y col., (2003). Sin embargo, los resultados de este estudio fueron obtenidos en una línea celular no hematopoiética, en la cual, en respuesta a IL-3, GLUT1 preferentemente es capaz de cambiar su distribución subcelular hacia la membrana plasmática, aumentando de esta forma la incorporación de OMG. Interesantemente, la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en los adipocitos se debe a la estimulación de la actividad de PI 3-quinasa, en este caso inducida por insulina (Khan y col., 2002; Watson y col., 2004). Cada día hay más publicaciones que implican a PI 3-quinasa en la supervivencia celular al prevenir la apoptosis en varios tipos celulares. Sin embargo, es muy poco lo que se sabe acerca de la activación de estas vías y el aumento del transporte de hexosas en células no pertenecientes a la línea hematopoiética. Así, el siguiente paso fue establecer que luego de la activación de JAK2, PI-3-quinasa se encontraba involucrada en los eventos inducidos por IL-3 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 se preincubaron con el inhibidor LY294002, previo al tratamiento con IL-3, para luego medir el transporte de OMG. Los resultados revelaron que en presencia del inhibidor, el aumento del transporte de OMG inducido por IL-3 disminuyó significativamente, alcanzando valores cercanos a los observados en las células control. Se observó un leve aumento en la captación de metil-glucosa en presencia de la citoquina y del inhibidor, posiblemente porque LY294002 perdió su

actividad luego de haber permanecido 60 minutos en solución. Otra posibilidad, es que la concentración del inhibidor utilizada (10 μ M) no haya sido suficiente para abolir completamente a PI 3-quinasa, siendo la actividad residual de esta enzima, la que permita que aún sea posible la liberación de transportadores desde compartimentos intracelulares que aumenten la captación de OMG. Con esto se concluye que PI 3-quinasa participa de la señalización que induce el incremento en la incorporación de metilglucosa estimulada por IL-3.

Los efectores río abajo relevantes de PI 3-quinasa en adipocitos y células musculares por ejemplo, incluyen a 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 por activación de proteínas del citoesqueleto (Foran y col., 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 IL-3 y si esta activación ocurre efectivamente a través de esta vía. Con este propósito, se trataron células HEK293 con IL-3 en ausencia o presencia de LY294002, utilizando para ello un anticuerpo dirigido contra el residuo serina 473 fosforilado, indicando la activación de esta proteína. De esta forma, el siguiente paso fue determinar si la disminución del transporte de OMG inducido por IL-3 en presencia de LY294002 se veía reflejado en una inhibición de la fosforilación de la serina/treonina quinasa Akt, además si esta serina/treonina quinasa es activada en respuesta a IL-3 y si esta activación ocurre efectivamente a través de esta vía. El análisis de *Western blot* mostró que Akt se encuentra activa a nivel basal (control) pero luego ocurre un aumento bastante considerable en la fosforilación en Ser-473 luego de 30 minutos de estimulación con IL-3. A los 60 minutos de estimulación la banda inmunorreactiva disminuye de manera semejante al control, para luego a los 90 minutos de estimulación observar un leve aumento en la marca que corresponde a un incremento de fosforilación de Ser-473. Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que en células HEK293 estimuladas con IL-3 durante 30 minutos, Akt se encuentra activa y localizada a niveles intracelulares,

cercana a la membrana plasmática y en una baja cantidad en el núcleo. Esto no ocurre en células control, sin embargo en aquellas que se encuentran en claro proceso de mitosis, Akt está notoriamente activada. A los 60 minutos de estimulación con la citoquina se observa una disminución bastante notoria de la señal de Akt a nivel citoplasmático y nuclear, esta disminución concuerda con el tamaño de la banda inmunorreactiva observada en los ensayos de *Western blot* al mismo periodo de estimulación. Algo diferente ocurrió en las células estimuladas por 90 minutos con IL-3 ya que se observó una disminución de la señal de Akt a nivel del citoplasma y un aumento de ésta en regiones cercanas al núcleo, lo que concuerda con el tamaño de la banda inmunorreactiva observada al mismo tiempo de estimulación en los ensayos de *Western blot*. De acuerdo a lo observado en los ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia la activación máxima de Akt correspondió a los 30 minutos de estimulación con la citoquina. Estos resultados indican que la activación de Akt se relaciona estrechamente con el aumento de la incorporación de glucosa y con la redistribución de los transportadores producida también tras el tratamiento por 30 minutos con IL-3. Por otro lado, los resultados mostraron que en células estimuladas por 60 minutos con IL-3, Akt se encuentra menos activa y al parecer se estaría translocando al núcleo, lo que se relaciona con la disminución de la captación de OMG a este mismo tiempo de estimulación. Por último a los 90 minutos de estímulo Akt está prácticamente en el núcleo celular, lo que sugiere que no está participando en la translocación de los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática, hecho que concuerda con la disminución de incorporación de OMG vista a los 90 min de estímulo con IL-3 en los ensayos de transporte.

Una vez comprobada la activación de Akt a los 30 minutos de estimulación con la citoquina IL-3, se determinó mediante ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia si la fosforilación de Akt es prevenida al inhibir PI 3-quinasa. En los ensayos de *Western blot* se observó efectivamente una disminución de la marca inmunorreactiva en aquellas células estimuladas con IL-3 y en presencia de LY294002. Este resultado se corroboró más tarde con los ensayos de inmunofluorescencia, en los cuales se observó que Akt en presencia de IL-3 y del

inhibidor de PI3K, genera una disminución de la señal fluorescente, localizándose principalmente a niveles citoplasmáticos, lo que corresponde a una disminución de la activación de esta quinasa. Estos resultados permitieron corroborar que IL-3 fue capaz de activar a Akt y que además el inhibidor de PI3K, LY294002 impidió la fosforilación en Ser-473 de esta quinasa. Estos antecedentes son importantes para determinar si Akt participa en los cambios subcelulares de los transportadores facilitativos de hexosas GLUT1 y GLUT3 pues se encuentra río abajo de la vía PI3K.

Para determinar la participación de la vía PI3K/Akt en los niveles de abundancia proteica y en la redistribución subcelular de los transportadores GLUT1 y GLUT3, posiblemente relacionados con el aumento de incorporación de glucosa visto en presencia de IL-3, se realizaron análisis de *Western blot* e inmunofluorescencia. En el primero de ellos se observó que en aquellas células estimuladas con la citoquina durante 30 minutos no hubo cambios en la intensidad de la banda inmunorreactiva tanto para GLUT1 como para GLUT3, tampoco se observaron cambios en aquellas células bajo el estímulo de IL-3 y en presencia de LY294002 si se compara con las células control (en ausencia de estímulo). Esto refleja que los niveles de abundancia proteica de los GLUTs no son alterados bajo el estímulo de IL-3 y tampoco al inhibir a la PI3-quinasa. Los ensayos de *Western blot* realizados a distintos tiempos de estimulación con IL-3 reafirman este resultado e indican que probablemente los GLUT1 y GLUT3 son capaces de incorporar glucosa mediante una redistribución subcelular en la que participaría PI3-quinasa. Las imágenes obtenidas en los estudios de inmunofluorescencia y analizados por microscopía confocal revelaron que en células estimuladas con IL-3 en presencia de LY294002, 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 la falta de fosforilación de Akt río abajo de PI 3-quinasa, este hecho sería fundamental para la liberación de este transportador hacia la

membrana plasmática. Esto se correlaciona con los estudios de transporte realizados en presencia del inhibidor, pues en 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 IL-3 por 30 minutos en presencia del inhibidor, la distribución del transportador es prácticamente la misma a la observada en las células control, localizándose en regiones cercanas al núcleo.

Los efectos del inhibidor LY294002 observados en los ensayos de transporte, *Western blot* y de inmunofluorescencia sugieren fuertemente que las quinasas PI 3-quinasa y Akt se encuentran involucradas en la regulación del transporte de metilglucosa inducido por IL-3, pues este inhibidor es capaz de prevenir los cambios en la distribución subcelular de GLUT1 y GLUT3, produciendo como consecuencia una menor incorporación de OMG. Sin embargo en las células tratadas con IL-3 durante 30 minutos y en presencia de LY294002 se vió un leve aumento en la captación de OMG, si se compara con las células control. Como se dijo anteriormente una de las explicaciones posibles para este hallazgo es que la concentración de inhibidor utilizada para este ensayo no haya sido suficiente para abolir completamente la actividad de PI 3-quinasa, siendo la actividad residual de esta enzima la que permita que sea posible la redistribución celular de ambos transportadores de glucosa a la membrana celular. Esto puede encontrar apoyo en la literatura, ya que se ha descrito que para abolir completamente la actividad de PI 3-quinasa se requiere de una concentración de LY294002 de 50 μ M (Walter y col., 2000). Otra posibilidad es que los mecanismos activados por IL-3 a los 30 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, o simplemente por una reactivación de la misma vía PI3K, es así que no se observaría la disminución de la captación de OMG esperada con el inhibidor utilizado. En este punto es importante mencionar los hallazgos encontrados en el trabajo de Bentley y col. (2003), en los cuales se encontró que IL-3 es capaz de inducir un aumento en la

captación de DOG mediante la translocación del transportador GLUT1 a la membrana plasmática en un tipo celular derivado de la línea blanca. Además, se demostró 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. Además de estos antecedentes se procedió a la detección de la posible participación de otra vía de señalización en el aumento de la captación de OMG en las células HEK293 bajo el estímulo de IL-3.

Como ya se ha mencionado anteriormente IL-3 es capaz de activar varias rutas de señalización intracelulares, las cuales no son mutuamente excluyentes y podrían actuar en conjunto para generar efectos provocados por la estimulación de la citoquina. Una de las rutas también activadas por IL-3 es la vía de las MAP-quinasa, que se ha reportado participar en la translocación de transportadores facilitativos, en presencia de diversos estímulos como insulina, IL-1 β o TNF-1 y en la incorporación de glucosa en varios tipos celulares (Ressel y col., 1999; Sweeney y col., 1999; Barros y col., 1997). Esta vía se caracteriza por generar efectos como proliferación, supervivencia, crecimiento y desarrollo de diversos tipos celulares entre los que se cuentan las células hematopoiéticas. En este trabajo se propuso realizar ensayos de transporte para conocer si esta vía de señalización estaría implicada en el aumento de la captación de glucosa estimulada por IL-3, ya sea en asociación con la vía PI3K o como una vía de rescate cuando esta ruta de señalización no le sea posible activarse. Es así como en los ensayos de incorporación de OMG, se utilizó un compuesto de origen químico llamado UO126, capaz de inhibir a la ruta MAPK por inactivación de la proteína río abajo MEK1/2. Así, se pudo observar en estos ensayos que al inhibir esta vía de señalización se genera una disminución en la captación de glucosa en presencia de IL-3, la cual no llegó a los valores obtenidos por las células control, este pequeño porcentaje de captación es muy similar al observado en los ensayos de transporte en los cuales se estudió la vía PI3K. Las explicaciones dadas a ese caso pueden ser similares a esta situación, pues UO126 permaneció 60 minutos

en solución, tiempo en el cual su efecto pudo decaer o sencillamente que la concentración usada (10 μ M) no abolió completamente la actividad de MEK1/2 y por tanto transportadores almacenados en vesículas citoplasmáticas pudieron llegar a la membrana. Por último, es posible que este transporte esté siendo llevado a cabo por la vía PI3K que se encuentra activa para generar la translocación de los transportadores GLUT1 y GLUT3 y así producir el aumento de captación de OMG observado, indicando que PI3K y MAPK serían probablemente vías de señalización auxiliares y que si una de ellas no se puede activar en presencia de algún estímulo, la otra se activa para que el proceso sea realizado. Para dar una respuesta a estas especulaciones y asegurar de manera fehaciente la participación de la ruta MAPK es necesario hacer más ensayos, similares a los realizados con la vía PI3K. Como por ejemplo, análisis de *Western blot* que permitan inmunodetectar proteínas fosforiladas pertenecientes a la vía MAP-quinasas gatilladas por IL-3, estudios de inmunofluorescencia en presencia de IL-3 y del inhibidor UO126 que detecten la movilización de GLUT1 y GLUT3 y que confirmen si esta ruta se encuentra involucrada o no en la relocalización de estos transportadores, y si la incorporación aumentada de glucosa inducida por la citoquina se debe realmente a la activación misma. Por último, se debería utilizar una mezcla de ambos inhibidores LY294002 y UO126 para confirmar que ambas rutas de señalización PI3K y MAPK se asocian al aumento de transporte y también para descartar si el aumento de OMG inducido por IL-3 es producido por una tercera vía de señalización como por ejemplo JAK/STAT.

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 expresa al menos una de las subunidades del receptor de IL-3. En el caso de la subunidad α , se observó una inmunorreacción positiva en la región intracelular, cercana al núcleo. Por otro lado la subunidad β de IL-3r no presentó una inmunorreacción positiva, diferente a lo detectado para la subunidad α , sugiriendo de esta forma que esta subunidad sería expresada mayoritariamente en este tipo celular. A continuación, se procedió a

confirmar la presencia de estas dos subunidades a través de análisis de RT-PCR y *Western blot*, detectándose a través del primero, un producto de amplificación de la secuencia de la subunidad α que corresponde a 420 pb, tamaño que concuerda con lo descrito en la literatura. Sin embargo no fue posible detectar un producto de amplificación del tamaño esperado para la subunidad β del receptor para IL-3, aunque fue posible observar dos productos de amplificación muy débiles de tamaños diferentes a lo esperado. Para descartar la presencia de esta subunidad es necesario realizar más ensayos de RT-PCR variando las condiciones del experimento y verificar nuevamente su presencia. En los estudios de *Western blot* se observó una banda inmunorreactiva para la subunidad α de 42 kDa, pero para la subunidad β no fue posible detectar una banda inmunorreactiva. Es importante destacar que en nuestro laboratorio hay antecedentes en los cuales se indica que posiblemente esté presente la subunidad βc , pero en este trabajo no fue posible de detectar. Para confirmar este hecho es necesario repetir estos experimentos y además cambiar diversas condiciones. 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 datos preliminares de nuestro laboratorio estos transportadores son expresados en esta línea celular. Así, los ensayos de inmunofluorescencia realizados, mostraron que el transportador de glucosa GLUT1 se encuentra localizado tanto en la región intracelular como a nivel de la membrana plasmática, expresándose mayoritariamente en esta última región. En el caso del transportador GLUT3, se vio que éste se localizó preferentemente en la región intracelular y su patrón inmunorreactivo 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 corroborar 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 proteína de 55 kDa para el transportador GLUT1 y una proteína de 54 kDa para GLUT3. Luego de confirmar la presencia de la subunidad α del receptor de IL-3 como de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, el paso siguiente fue

demostrar el efecto de IL-3 sobre el transporte de OMG en este tipo celular. Los resultados mostraron que en células de Sertoli 42GPA9, la adición de IL-3 6 nM es capaz de aumentar significativamente la incorporación de OMG tras 20 minutos de estimulación con IL-3, con respecto a las células que no han sido tratadas con la citoquina (células control), similar a lo observado en las células HEK293. Con los resultados obtenidos en dos diferentes tipos celulares, se puede sugerir que en células no hematopoiéticas en las cuales se expresa el receptor para IL-3, la citoquina sería capaz de aumentar la incorporación de glucosa, de tal forma de promover posiblemente un aumento de la viabilidad. Posterior a este resultado se decidió conocer si IL-3 era capaz de generar una redistribución de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en los cuales se vio que a los 30 minutos de estimulación con la citoquina se genera un aumento en la marca inmunorreactiva de ambos GLUTs y se localiza en regiones citoplasmáticas y cercanas a la membrana celular, en el caso del GLUT1 la marca es mucho más intensa que GLUT3. Luego de 60 minutos de estimulación se observó que la señal inmunorreactiva disminuye en GLUT1, ubicándose principalmente en el citoplasma, GLUT3 se localiza también en el citoplasma pero la intensidad de la señal no disminuye notoriamente. A los 90 minutos en presencia de IL-3 se observa que la señal inmunorreactiva disminuye notablemente para ambos transportadores, localizándose a niveles cercanos a la membrana celular.

Con los resultados obtenidos en esta tesis, se demostró por primera vez que en células HEK293 se expresa el receptor para Interleuquina-3 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 posiblemente, un aumento en la viabilidad celular. Por otra parte, los datos apoyan la hipótesis que IL-3 mediaría principalmente la redistribución de GLUT1 a la membrana celular, regulada por JAK2, PI 3-quinasa con la participación río abajo de Akt y posiblemente con la participación de la MAPK (Figura 26).

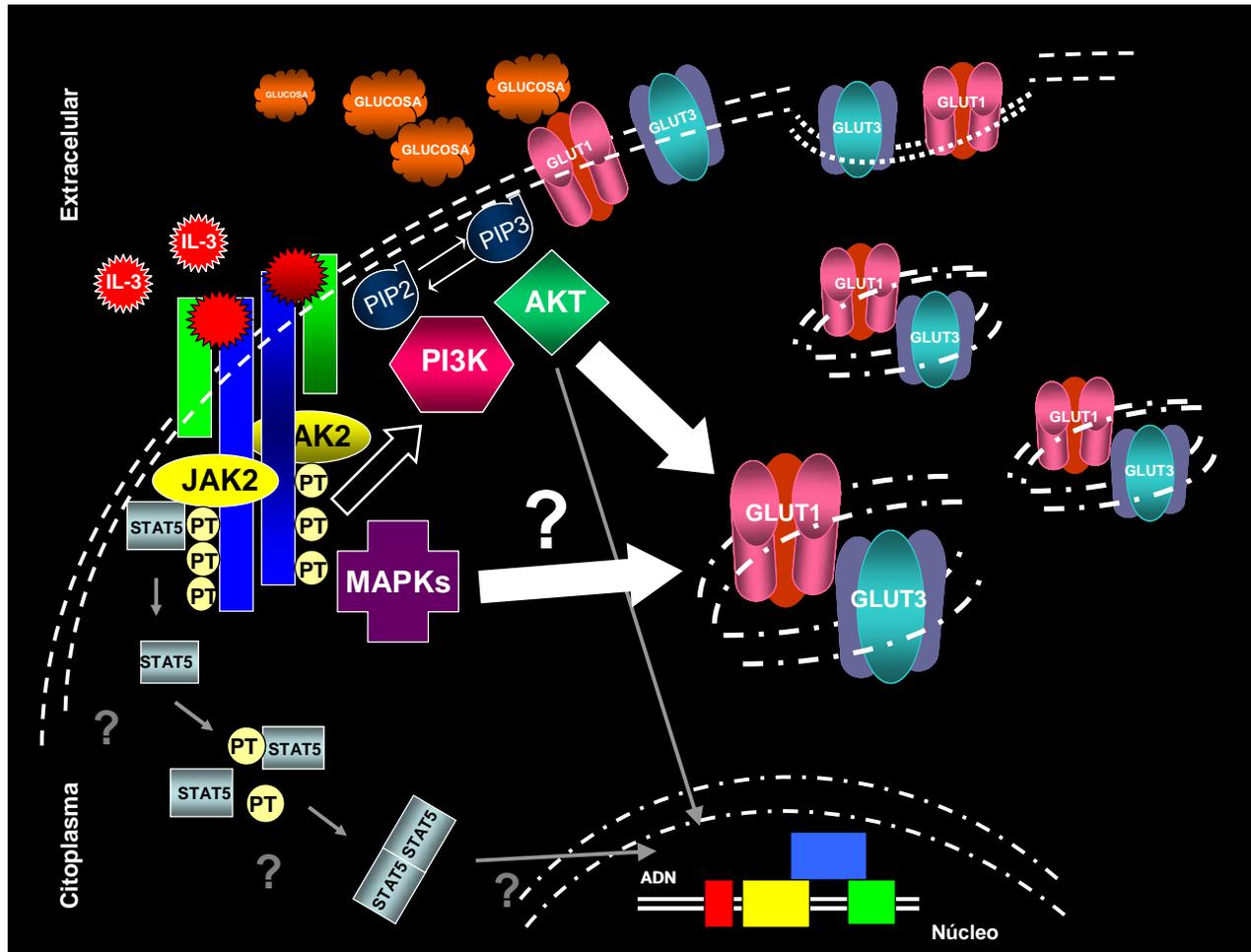


Figura 26. Posible mecanismo por el cual IL-3 induce un incremento en la captación de glucosa en la línea celular HEK293. La unión de IL-3 a su receptor en la superficie de células HEK293 provoca la activación de JAK2, luego de PI 3-quinasa/Akt y posiblemente de la vía MAPK. Esta regulación permite la 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.

6. BIBLIOGRAFIA

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.

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.

Angulo C., Rauch M.C., Droppelmann A., Reyes A.M., Slebe J.C., Delgado-Lopez 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.

Angulo C., Segretain D., Reyes J.G., Vera J.C. and Concha I.I. (2004). Molecular identification and functional characterization of the vitamin C transporters expressed by sertoli cells. 44th Annual Meeting of American Society for Cell Biology.

Augustin R., Carayannopoulos M.O., Dowd L.O., Phay J.E., Moley J.F. and 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.

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

Athanasassakis I., Bleackley R., Paetkau V., Guilbert L., Barr P. and Wegmann T. (1987). The immunoestimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. *J Immunol*, 138:37-44

Barros L.F., Young M., Saklatvala J. and Baldwin A. (1997). Evidence of two mechanisms for the activation of the glucose transporter GLUT1 by anisomycin: p38 (MAKInase) activation and protein synthesis inhibition in mammalian cells. *J Physiol*, 504: 517-525.

Barlow D.P., Bucan M., Lehrach H., Hogan B.L.M and Gough N.M. (1987). Close genetic and physical linkage between the murine haemopoietic growth factor genes GM-CSF and Multi-CSF (IL-3). *Embo J*, 6:617.

Bellacosa A., Testa J.R., Staal S.P. and Tsichlis 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(41)39337-48.

Bilan P.J., Miksumoto Y., Maher F. and Simpson I.A. (1992). Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular

differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res*, 186:1129-1137.

Bloch R. (1973). Inhibition of glucose transport in the human erythrocyte by cytochalasin B. *Biochemistry*, 12:4799-4801.

Bourdon V., Lablack A., Abbe P., Segretain D. and Points G. (1998). Characterization of a clonal Sertoli cell line using adult PyLT transgenic mice. *Biol Reprod*, 58:591-599.

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

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

Callus B.A., and Mathey-Prevot B. (1998). Interleukin-3-induced activation of JAK/Stat pathway is prolonged by proteasome inhibitors. *Blood*, 91(9): 3182-3192.

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

Castro M. (2005) Efecto de Ácido ascórbico sobre la utilización de glucosa en neuronas bajo actividad sináptica glutamatérgica. Tesis: Escuela de Bioquímica. Facultad de Ciencia. Universidad Austral de Chile.

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

Choeiri C., Staines W. and Messier C. (2002). Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience*, 111:19-34.

Choi D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1:623-634.

Colotta F., Bussolino F., Polentarutti N., Guglielmetti A., Sironi M., Bocchietto E., DeRossi M. and 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.

Dhar-Mascareño 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*, 278:11107-11114.

Doege H., Bocianski A., Joost H.G. and 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(3):771-776.

Doege H., Schurmann A., Bahrenberg G., Brauers A. and 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. and 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.

Epand R.F., Epand R.M. and Jung C.Y. (2001). Ligand-modulation of the stability of the glucose transporter GLUT1. *Protein Science.*,10:1363-1369.

Flier J.S., Mueckler M.M., Usher P. and Lodish H.F. (1987). Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science.*, 235:1492-1495.

Foran P.G., Fletcher L.M., Oatey P.B., Mohammed N., Dolly J.O. and Tavaré J.M. (1999). Protein kinase B stimulates the translocation of GLUT4 but not GLUT1 or transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes by a pathway involving SNAP-23, synaptobrevin-2, and/or cellubrevin. *J Biol Chem*, 274(40):28087-95.

Franke T.F., Kaplan D.R. and Cantley L.C. (1997). PI3K: downstream AKT on blocks apoptosis. *Cell*, 88(4):435-7.

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

García M.A., Salazar K., Millan C., Rodriguez F., Montecinos H., Caprile T., Silva C., Cortes C., Reinicke K., Vera J.C., Aguayo L.G., Olate J., Molina B. and 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. [Review]. *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(12):3667-76.

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.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. and Nairn R. (1997). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human Adenovirus Typo 5. *J General Virology*, 36(1)59-74.

Griswold M.D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction*, 52: 211-216.

Griswold M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Dev Biol*, 9:411-416.

Guthridge M.A., Stomski F.C., Thomas D., Woodcock J.M., Bagley C.J., Berndt M.C. and Lopez A.F. (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells*, 16(5)301-13.

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 urokinasetype plasminogen activator, but not secretes prostaglandin E₂, interleukin-1, or tumor necrosis factor- α . *J Leukoc Biol*, 53:707-714.

Hamilton J. A. and 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 granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GMCSF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:9655-9659.

Heijnen H.F., Oorschot V., Sixma J.J., Slot J.W. and James D.E. (1997). Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol*, 138:323-330.

Hellmich, B., Ciaglo A., Schatz H. and Coakley G. (2004). Autoantibodies against Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and Interleukin-3 are rare in patients with Felty's Syndrome. *Ann Rheum Dis*, 63:862-866.

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. and 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. and 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.

Jara E. (2006). Efecto del Factor de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-SCF) en la distribución subcelular de transportadores facilitativos de hexosas:

Participación de la Vía de señalización de PI3-quinasa. Tesis: Escuela de Bioquímica. Facultad de Ciencia. Universidad Austral de Chile.

Jegou B. (1993). The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol*, 147:25-96.

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 (review). *Mol Membr Biol*, 18:247-256.

Joost H.G., Bell G.I., Best J.D., Birnbaum M.J., Charron M.J., Chen Y.T., Doege H., James D.E., Lodish H.F., Moley K.H., Moley J.F., Mueckler M., Rogers S., Schurmann A., Seino S. and Thorens B. (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282:E974-E976.

Kanakura Y., Druker B., Cannistra S., Furukawa Y., Torimoto Y. and 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. and Kiso Y. (2000). Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine sympathetic neurons. *Neuroimmunomodulation*, 8(3)132-141.

Khan A. and Pessi J. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. *Diabetology*, 45(11)1475-1483.

Kitamura T., Sato N., Arai K. and 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.

Kitamura T. and Miyajima A. (1992). Functional reconstitution of the human interleukin-3 receptor. *Blood*, 80(1)84-90.

Kretz A., Happold C.J., Marticke J.K. and 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.

Kong C.T., Yet S.F. and Lever J.E. (1993) Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J Biol Chem.*, 268:1509-1512.

Konoshi N., Kobayashi M., Miyagawa SI. Sato T., Notoh O. and Ueda K. (1999). Defective proliferation of primitive Myeloid progenitor cells in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*, 94(12)4077-4083.

Lisinski I., Schurmann A., Joost H.G., Cushman S.W. and Al-Hasani H. (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J*, 358:517-522.

Lokker N. A., Zenke G., Strittmatter U., Fagg B. and Movva R.N. (1991). Structure-activity relationship study of human Interleukin-3 role of the C-terminal region for biological activity. *Embo J*, 10(8)2125-2131.

Macheda M.L., Williams E.D., Best J.D., Wlodek M.E. and Rogers (2003). Expression and localisation of GLUT1 and GLUT12 glucose transporters in the pregnant and lactating rat mammary gland. *Cell Tissue Res*, 511:91-97.

Marks J., Carvou N.J., Debnam E.S., Srani S.K. and 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.

McCoy K., Ahmed N., Tan S. and Berridge M.V. (1997). The hemopoietic growth factor, Interleukin-3 promotes glucose transport by increasing the specific activity and maintaining the affinity for glucose of plasma membrane glucose transporters. *J Bio Chem*, 272(28)17276-17282.

McKenzie B., Harper A.A., Taylor P.M. and Rennie M.J. (1994) Na⁺/amino acid coupling stoichiometry of rheogenic system B₀,+ transport in *Xenopus* oocytes is variable. *Pflugers Arch*, 426:121-128.

McKenna M.C., Sonnewald U., Huang X., Stevenson J. and Zielke H.R. (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem*, 66:386-393.

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

Miyajima A., Mui A.L., Ogorochi T. and Sakamaki K. (1993). Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood*, 82(7)1960-74.

Moretti S., Lanza F., Dabusti M., Tieghi A., Campioni D., Domonici M. and Castoldi G.L. (2001). CD123 (interleukin-3 receptor α chain). *J Biol Regul Homeost Agents*, 15:98-100.

Moroni S.C. and Rossi A. (1995). Enhanced survival and differentiation in vitro of different neuronal populations by some interleukins. *Int J Dev Neurosci*, 13(1)41-9.

Mueckler M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*, 219:713-725.

Mui A., Wakao H., Kinoshita T., Kitamura T. and Miyajima A. (1996). Suppression of Interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *The Embo Journal*, 15(10): 2425-2433.

Nagamatsu S., Sawa H., Kamada K., Nakamichi Y., Yoshimoto K. and Hoshino T. (1993) Neuron-specific glucose transporter (NSGT): CNS distribution of GLUT3 rat glucose transporter (RGT3) in rat central neurons. *Febs Lett*, 334:289-295.

Nualart F., Godoy A. and Reinicke K. (1999). Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res*, 824:97-104.

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

Nicola N.A. (1994). 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.

Nyga R., Pecquet C., Harin N., Gu H., Dhennin-Duthielle I., Regnier A., Gouilleux-Guart V., Lassared K. and Goullex F. (2005). Activated Stat5 proteins induce activation of the PI3-Kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab-2 scaffolding adapter. *Biochem J*, 390: 359-366.

Pawson T. and Scott J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278(5346)2075-80.

Phay J.E., Hussain H.B. and Moley J.F. (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*, 66:217-220.

Quelle F.W., Sato N., Witthuhn B.A., Inhorn R.C., Eder M., Miyajima A., Griffin J.D. and Ihle J.N.. (1994). JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol*, 14(7)4335-41.

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

Reagan L.P., Rosell D.R., Alves S.E., Hoskin E.K., McCall A.L., Charron M.J. and McEwen B.S. (2002). GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res*, 932:129-134.

Roberson S.A. and Seamark 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.

Rogers S., Macheda M.L., Docherty S.E., Carty M.D., Henderson M.A., Soeller W.C., Gibbs E.M., James D.E. and Best J.D. (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282:E733-E738.

Rui L., Thoru I., Kem-ichi A. and Sumiko W. (1999). Two distinct signaling pathways downstream of Janus Kinase 2 play redundant roles for antiapoptotic activity of Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor. *Molecular Biology of the Cell*, 10: 3959-3970.

Sato N., Sakamaki K. and Terada N. (1993). Signal transduction by the high affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common β subunit responsible for different signaling. *Embo J*, 12:4181- 4189.

Schrader J.W., Moyer C., Ziltener H.J. and Reinisch C.L. (1991). Release of the cytokines colony-stimulating factor-1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and IL-6 by cloned murine vascular smooth muscle cells. *J Immunol*, 146(11)3799-808.

Shikham A.R., Brinson D.C., and Lotz M.K. (2004). Distinc pathways regulate facilitated glucose transporte in human articular chondrocytes during anabolic anda catabolic respons. *Am. J. Physiol. Encrinol Metab*, 286: E980-E985.

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. and Ghezzi P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7)4044-9.

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

Spielholz C, Golde DW, Houghton AN, Nualart F, Vera JC (1997) Increased facilitated transport of dehydroascorbic acid without changes in sodium-dependent ascorbate transport in human melanoma cells. *Cancer Res*, 57:2529-2537.

Stuart C.A., Wen G. and Jiang J. (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism*, 48:876-880.

Stuart W.I., and Trayhurn P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, 89:3-9.

Sweeney G., Somwar R., Ramlal T., Volchuck A., Ueyama M. and Klip A. (1999). An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem*, 274: 10071-10078.

Thorens B., Sarkar H.K., Kaback H.R. and Lodish H.F. (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*, 55:281-290.

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

Uldry M., Ibberson M., Hosokawa M. and Thorens B. (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *Febs Lett*, 524:199-203.

Uldry M., Ibberson M., Horisberger J.D., Chatton J.Y. Riederer B.M. and Thorens B. (2001). Identification of a mammalian H⁺-myoinositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J*, 20:4467-4477.

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.

Vie-Wylie A.J., Lamson D.R. and Chen Y.T. (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on

chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72:113-117.

Vilanova L.T., Rauch M.C., Mansilla A., Zambrano A., Brito M., Werner E., Alfaro V., Cox J.F. and Concha I.I. (2003). Expression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in male germ cells: GM-CSF enhances sperm motility. *Theriogenology*, 60(6)1083-95.

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. and 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.

Watson R., Kanzaki M. and Pessi J. (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose Transporter 4 in adipocytes. *Endocrine Reviews*, 25:177-204.

Wen T.C., Tanaka J., Peng H., Desaki J., Matsuda S., Maeda N., Fujita H., Sato K. and Sakanaka M. (1998). Interleukin 3 prevents delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field. *J Exp Med*, 188(4)635-49.

Werner E. (2005). Participación de GM-CSF en la supervivencia de células germinales masculinas. Tesis: Escuela de Bioquímica. Facultad de Ciencia. Universidad Austral de Chile.

Wright E.M., Loo D.D., Hirayama B.A. and Turk E. (2004). Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda)*, 19:370-376.

Yang F., Sun X., Beech W., Teter B., Wu S., Sigel J., Vinters H. V., Frautschy S. A., and Cole G.M. (1998). Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 152:379.

You G., Lee W.S., Barros E.J., Kanai Y., Huo T.L., Khawaja S., Wells R.G., Nigam S.K. and Hediger M.A. (1995). Molecular characteristics of Na⁽⁺⁾-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J Biol Chem*, 270:29365-29371.

Yousefi S., Green D., Blaser K. and Simon H. (1994). Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:10868-10862.

Zambrano A. (2004). Participación de la citoquina IL-3 en la Enfermedad de Alzheimer. Tesis: Escuela de Bioquímica. Universidad Austral de Chile.

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)625-34.

Zambrano C., Egaña JT., Nuñez MT., Maccioni R.B. and Gonzalez-Billault C. (2004). Oxidative stress promotes τ dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (11)1393-1402.

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