



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Carlos González F.
INSTITUTO : Fisiología
FACULTAD : Medicina

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Carlos Figueroa V.
INSTITUTO : Anatomía, Histología y Patología
FACULTAD : Medicina

**“EFECTO DE LA GLUCOSA EXTRACELULAR SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA
QUINASA *m*TOR INDUCIDA POR VASOPRESINA”**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

DANIELA KARINA MONTES ASENJO

VALDIVIA-CHILE

2012

*A mis padres, hermanas y abuelitos,
quienes siempre me apoyaron
incondicionalmente.*

AGRADECIMIENTOS

Resulta realmente complicado recoger en unas pocas líneas todo el apoyo que tanto a nivel científico como personal he recibido de muchos compañeros y amigos a lo largo de la realización de mi tesis. Sin ellos, todo habría sido más difícil y sin duda pueden sentir también como suya esta tesis.

En primer lugar tengo que agradecerle a mi profesor patrocinante que me brindó la posibilidad de realizar mi tesis en su laboratorio y que siempre creyó en mí más de lo que yo misma creía para realizar esta tesis, abriéndome camino en la investigación, ya que no es fácil llegar de la teoría al mesón del laboratorio. Del mismo modo, quiero darle las gracias a mi “*maestra del mesón*”, la profesora Carolina Villanueva por su comprensión, incondicional apoyo y paciencia; ya que sin ella no podría haber conseguido ninguno de los resultados que obtuve.

Claramente esta tesis no habría sido lo mismo sin mis compañeros de laboratorio, que al final se han convertido en mis amigos Marianne, Stefanie, Pamela y Juan, con los que he compartido tantas horas y que me han brindado su ayuda de alguna u otra forma. A su vez, se suman a mis agradecimientos mis compañeros y amigos del laboratorio de la profesora Patricia Burgos, por su buena onda y disposición. Al profesor José Sarmiento por ayudarme cuando lo he necesitado de alguna u otra forma.

A los integrantes del instituto, el Luchito, por su buena voluntad y disposición, a la Sra. Ruty por su infinita vitalidad y alegría que nos inundaba y transmitía cada día; a la profesora Pamela que siempre me brindó su apoyo de alguna otra manera y sus consejos de vida que son realmente impagables.

A mis compañeros, amigos y mi familia adoptiva de la pensión: Karen, Gabriela, Claudio, José Miguel, Katy y David que hicieron de mi paso por Valdivia un lugar grato donde vivir, compartir y reír, ya que la vida no es sólo trabajo y estudio.

También quiero agradecer a mis profesores de las distintas áreas de la formación farmacéutica, que a lo largo de mi proceso formativo, no sólo estimularon mi inquietud intelectual, sino que me mostraron su calidad humana, de modo tal de sentar las bases para lograr ser un profesional de la salud íntegro.

Y ahora al final, porque son los más importantes, agradecer toda la ayuda que he recibido de mis padres y hermanas, que a pesar de no entender muy bien qué es esto de la ciencia y de la investigación, siempre me mostraron su atención, me apoyaron en mis decisiones y me enseñaron que el esfuerzo y el trabajo son la mejor manera de conseguir mis objetivos.

Muchas personas merecen mis infinitos agradecimientos a lo largo de esta aventura universitaria, pero a veces las palabras sobran y las acciones sobrepasan todo medida y razón; muchas gracias.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica; la voluntad”

Albert Einstein

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Instituto de Fisiología, perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, bajo el patrocinio del Dr. Carlos B. González Fritz y con financiamiento del Proyecto Fondecyt 1100871

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1. RESUMEN.....	11
SUMMARY	12
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1 Estructura de mTOR	17
2.2 Organización y función de los complejos mTOR.....	20
2.2.1 mTORC1	20
2.2.2 mTORC2	22
2.3 Localización.....	24
2.4 Vía de señalización	24
Hipótesis del trabajo	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específico.....	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1 MATERIALES	27
3.1.1 Reactivos Químicos.....	27
3.1.2 Soluciones Stock	29
3.1.3 Equipos y materiales.....	30
3.2 MÉTODO	31
3.2.1 Cultivo celular y tratamientos.....	31
3.2.1.1 Propagación Celular.....	31
3.2.1.2 Congelar células.....	31
3.2.1.3 Descongelar células	31
3.2.1.4 Contar células	32

3.2.1.5	Estimulación e inhibición de células A-10	32
3.2.2	Análisis de proteínas.....	33
3.2.2.1	Extracción de proteínas totales	33
3.2.2.2	Determinación de la concentración de proteínas totales.....	34
3.2.2.3	Preparación de las muestras	34
3.2.2.4	Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Westernblot).....	34
3.2.2.5	Elución de anticuerpos (Stripping)	36
3.2.3	Análisis computacional de las fotografías	36
4.	RESULTADOS.....	39
4.1	Determinar el grado de fosforilación de mTOR en respuesta a vasopresina en células A-10 cultivadas en concentración de glucosa normal (5,5 mM)	39
4.1.1	Efecto de AVP(50 nM), sobre la fosforilación de mTOR.....	39
4.1.2	Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de AKT/PKB inducida por AVP (50 nM).....	41
4.1.3	Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de mTOR inducida por AVP (50 nM)	45
4.1.4	Efecto de la activación de EKR1/2, inducida por AVP.....	47
4.2	Determinar el grado de fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa (25 mM) por diferentes tiempos.....	49
4.2.1	Efecto de AVP, sobre la fosforilación de mTOR.....	49
4.2.2	Determinación de la concentración de LY294002 sobre la inhibición de mTOR... ..	51
4.2.3	Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de AKT/PKB inducida por AVP.....	53
4.2.4	Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de mTOR inducida por AVP(50nM).....	55
4.2.5	Efecto de Activación de mTOR en la Inhibición de la Autofagia.....	57
4.2.6	Efecto de los distintos inhibidores sobre la activación de mTOR.....	59
4.2.7	Efecto de la activación de EKR1/2, inducida por AVP.....	62
4.3	Determinar el grado de fosforilación de mTOR en células A-10 incubadas con alta concentraciones de glucosa (25 mM)	64
5.	DISCUSIÓN.....	66
6.	CONCLUSIONES.	77

7. PERSPECTIVAS	78
8. BIBLIOGRAFÍA.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Dominios funcionales de mTOR e interacción entre mTOR, Rapamicina y FKBP12	19
Figura 2.2 Representación esquemática del complejo mTOR.	23
Figura 4.1 Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en baja concentración de glucosa.....	40
Figura 4.2: Vasopresina no induce la fosforilación de AKT(S473) en células A-10 cultivadas en medio DMEM LG	402
Figura 4.3 Efecto del inhibidor LY294002 (10 μ M) sobre la fosforilación de AKT(S473), inducida por AVP(50 nM) en células A-10 cultivadas en medio DMEM LG.....	403
Figura 4.4 Vasopresina no induce la fosforilación de AKT(S473) en presencia del inhibidor LY294002 a tiempos cortos, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG	44
Figura 4.5 Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en presencia del inhibidor LY294002 , en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG	46
Figura 4.6 AVP induce la activación de p- α -MAPK en tiempos cortos, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG	48
Figura 4.7 Vasopresina induce la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa extracelular.....	50
Figura 4.8 Efecto de la concentración del Inhibidor LY294002 sobre la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días.....	52

Figura 4.9 Efecto del Inhibidor LY294002 (10 μ M) sobre la activación de p-AKT(S473), inducida por AVP(50 nM) en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG durante 10 días.....	54
Figura 4.10 Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en presencia del inhibidor LY294002 , en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG.....	56
Figura 4.11 La activación de mTOR, inducida por AVP en células A-10, cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días, inhibe la activación de Autofagia	58
Figura 4.12 Efecto de los distintos inhibidores en la fosforilación de mTOR, inducida por AVP (50 nM) durante 4H en DMEM HG.	61
Figura 4.13 AVP induce la activación de p- α -MAPK, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG	63
Figura 4.14 Cinética de células A-10 incubadas en alta concentración de glucosa (25 mM).....	65
Figura 5.1 Representación esquemática del posible mecanismo a través del cual AVP induce la fosforilación de mTOR.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos Primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.....	37
Tabla 2: Anticuerpos Secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.....	37
Tabla 3: Sustratos para western Blot.....	38
Tabla 4: Tratamiento con inhibidores	38

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1	: Eukaryotic translation initiation factor 4E
AMPK	: Protein quinasa activada por AMP (<i>5' adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
ATP	: Adenosin Trifosfato (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
AVP	: Arginina Vasopresina (<i>Arginine vasopressin</i>)
BSA	: Albúmina Sérica de Bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
DAG	: Diacilglicerol (<i>diacylglycerol</i>)
DMEM HG	: Medio Eagle Modificado por Dulbecco: alto en glucosa (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: High Glucose</i>)
DMEM LG	: Medio Eagle Modificado por Dulbecco: bajo en glucosa (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Low Glucose</i>)
DMSO	: Dimetilsulfóxido
EDTA	: Ácido etilendiaminetetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
ERK1/2	: Quinasa regulada por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)
FBS	: Suero bovino fetal (<i>fetal bovine serum</i>)
FRAP/RAFT	: FKBP12-rapamycin associated protein
Glu	: Glucosa
GPCR	: Receptor acoplado a proteína G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GβL	: G protein beta subunit-like
GPX	: Glutación peroxidasa

HRP	: Horseradish peroxidase
IP3	: inositol trifosfato (<i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
IRS-1	: <i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
KD	: Dominio quinasa (<i>Kinase Domain</i>)
KDa	: KiloDalton
mLST8	: <i>mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
mSIN1	: <i>mamalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1</i>
mTOR	: <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1	: <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
mTORC2	: <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 2</i>
PA	: Ácido fosfatídico (<i>Phosphatidic acid</i>)
PBS	: Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDK1	: (<i>3-Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
PIKKs	: (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases</i>)
PKB/Akt	: Protein quinasa B (<i>protein kinase B</i>)
PKC	: Protein kinase C
PMSF:	: Fenilmetilsulfonil fluoruro
PRAS40	: The Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa
PROTOR1/2	: Protein observed with Rictor-1 ó Rictor-2
PtdIns(4,5)P2	: fospatidilinositol bifosfato (<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PTEN	: (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
RAPA	: Rapamicina (<i>rapamycin</i>)
RAPTOR	: proteína reguladora asociada a mTOR (<i>regulatory associated protein of mTOR</i>)

RICTOR	: <i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
S6K1	: <i>(p70 ribosomal protein S6 kinase 1)</i>
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOD	: Superóxido Dismutasa
TBS1x	: Tampón salino de Tris (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
TSC	: Complejo de esclerosis tuberosa (<i>Tuberous sclerosis complex</i>)
TSC1	: Complejo de esclerosis tuberosa 1 (<i>Tuberous sclerosis complex 1</i>)
TSC2	: Complejo de esclerosis tuberosa (<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>)
TTBS1x	: Tampón salino tris-tween 20 (<i>Tris-Tween Buffered Saline</i>)
Tween-20	: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
V	: Vehículo
VSMC	: Células de la musculatura lisa vascular (<i>vascular smooth muscle cells</i>)

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	(Ala)	A	Metionina	(Met)	M
Cisteína	(Cys)	C	Asparragina	(Asn)	N
Ácido aspártico	(Asp)	D	Prolina	(Pro)	P
Ácido glutámico	(Glu)	E	Glutamina	(Gln)	Q
Fenilalanina	(Phe)	F	Arginina	(Arg)	R
Glicina	(Gly)	G	Serina	(Ser)	S
Histidina	(His)	H	Treonina	(Thr)	T
Isoleucina	(Ile)	I	Valina	(Val)	V
Lisina	(Lys)	K	Triptófano	(Trp)	W
Leucina	(Leu)	L	Tirosina	(Tyr)	Y

1. RESUMEN

La proliferación y la remodelación de las células musculares lisas vasculares (VSMC), se asocia con muchas enfermedades vasculares. La hiperglicemia contribuye al desarrollo de las enfermedades vasculares promoviendo el crecimiento y la proliferación celular. Mammalian target of rapamycin (mTOR) es un regulador clave del crecimiento celular, la autofagia y la proliferación. Se investigaron los efectos de la alta concentración de glucosa en la activación de mTOR inducida por AVP en VSMC. Células musculares lisas vasculares (A-10), que expresan endógenamente el receptor de vasopresina V_{1a} , se cultivaron en DMEM que contenía 25 mM de glucosa durante 10 días y luego fueron estimuladas con AVP (50 nM). Se estudió la activación de mTOR por *Western blotting* utilizando anticuerpos fosfo-específicos. Para determinar la vía implicada en la activación de mTOR, las células fueron pre-incubadas con inhibidores previa a la estimulación con AVP. La Autofagia se analizó utilizando la razón de proteínas de LC3 I/II a través de *Western blotting*. VSMC cultivadas en alta concentración de glucosa extracelular (25 mM) y estimuladas con AVP mostraron un incremento en la fosforilación de mTOR, cuyo máximo ocurre a las 4 horas; en contraste a células cultivadas en glucosa normal (5,5 mM) y estimuladas con AVP en las cuales sólo se observó una fosforilación basal. Cuando las células cultivadas en alta glucosa fueron tratadas con el inhibidor de PI3K específico o con el inhibidor de PKC la activación de mTOR inducida por AVP se atenuó, mientras que, AG1478, PD98059 o 1-butanol no inhibió la activación inducida por AVP sobre mTOR, descartando la participación de PLD, ERK y la transactivación de EGFR. El análisis de los marcadores de autofagia LC3I y LC3II por *Western blotting*, mostró una inhibición de la autofagia con una cinética similar a los aumentos de mTOR. Nuestros resultados sugieren que AVP es capaz de estimular mTOR y, por consiguiente inhibir la autofagia en las VSMC mediante la activación de un PKC y la vía PI3K/AKT en alta concentración de glucosa extracelular. Estos resultados podrían explicar por qué la hiperglucemia es un factor de riesgo en la enfermedad cardiovascular.

SUMMARY

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation and remodeling are associated with many vascular diseases. Hyperglycemia contributes to the development of vascular disease by promoting cell growth and proliferation. Mammalian target of rapamycin complex (mTOR) is a key regulator of autophagy, cell growth and proliferation. Here, we investigated the effects of high glucose on mTOR activation induced by AVP in VSMCs. Vascular smooth muscle cells (A-10), which endogenously expresses the V_{1a} vasopressin receptor, were cultured in DMEM containing 25 mM glucose for 10 days and then were stimulated with AVP (50 nM). We studied the mTOR activation by Western blotting using phospho-specific antibodies. To determine the pathway involved in mTOR activation, cells were pre-incubated with inhibitors prior to AVP stimulation. Autophagy was analyzed using the ratio LC3 I/II proteins by Western blotting. Incubation with AVP of VSMCs, which were cultured in high extracellular glucose (25 mM), induced the mTOR phosphorylation, showing a maximum at 4 hours, in contrast to the AVP stimulation of cells cultured in normal glucose (5.5 mM), wherein, only basal phosphorylation was observed. When cells were pretreated with the a PI3K specific inhibitor or with the PKC inhibitor the AVP-induced mTOR activation was greatly attenuated; whereas, AG1478, PD98059 or 1-butanol did not inhibit the AVP induced mTOR activation, ruling out the involvement of PLD, ERK and the EFGR transactivation. Analysis of the autophagy markers LC3I and LC3II by Western blotting showed an inhibition of the autophagy with a similar kinetic as the mTOR increases. Our results suggest that AVP is able to stimulate mTOR and consequently to inhibit autophagy in VSMCs by activating a PKC and the PI3K/AKT pathway in a high extracellular glucose concentration. These results might explain why hyperglycemia is a risk factor in cardiovascular disease.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes Mellitus es una enfermedad multisistémica, en la cual el sistema vascular claramente se ve afectado por las altas concentraciones de glucosa en sangre. Los pacientes con esta enfermedad, presentan una acentuada prevalencia de enfermedades cardiovasculares tales como, enfermedades coronarias, accidentes cerebrovasculares, hipertensión, enfermedades vasculares periféricas y enfermedades microvasculares como retinopatía y nefropatía (Sheetz and King, 2002).

A pesar que la hiperglicemia ha sido identificada como uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo de enfermedades vasculares asociadas con diabetes mellitus, los mecanismos que vinculan los altos niveles de glucosa y las vasculopatías diabéticas, no están completamente definidos (Peiro et al., 2001).

Además de presentar un deterioro de la función vasoactiva, los vasos de pacientes diabéticos pueden sufrir cambios en su estructura debido a los procesos de remodelación. Estos procesos están determinados principalmente por alteraciones en las tasas de crecimiento del músculo liso vascular y de la muerte del mismo, ya sea a través de necrosis o apoptosis del tejido, en conjunto con la expansión de la matriz extracelular. Una vez establecidas estas alteraciones estructurales, que están relacionadas con enfermedades vasculares como la aterosclerosis o la hipertrofia vascular, el riesgo de morbilidad y mortalidad en pacientes diabéticos aumenta (Madonna and De Caterina, 2011)

Haist y Best, en 1940, fueron los primeros en observar que la alta concentración de glucosa ejerce múltiples efectos patológicos, específicamente en las células β -pancreáticas.

Consecutivamente se empleó el término “glucotoxicidad”, para describir los efectos adversos de la exposición crónica de las células β -pancreáticas a las altas concentraciones de glucosa. Sin embargo, actualmente, está bien establecido que la alta concentración de glucosa exhibe múltiples efectos patológicos en muchas otras células y tejidos, incluyendo aquellos del sistema cardiovascular (Madonna and De Caterina, 2011).

En presencia de hiperglicemia crónica hay una desregulación de los transportadores de glucosa, lo cual expone a las células a un flujo continuo de alta cantidad de glucosa desde el espacio extracelular al citosol. El resultado de esta operación es la generación intracelular en exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS). Siendo éstos los efectores finales, pero también los factores iniciadores de al menos cuatro vías: (a) la *vía del polirol*, con cambios asociados en el estado Redox de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) y su forma reducida (NADPH); (b) la modificación covalente de los constituyentes intracelulares por los productos finales de glicación avanzada llamados AGEs; (c) la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG), lo cual permite la activación de varias isoformas de PKC (Das Evcimen and King, 2007); (d) flujo aumentado a través de la síntesis de la vía de hexoxaminas. La activación de estas vías, al menos en parte, mediada por la hiperosmolaridad causada por la glucosa, puede explicar por qué su elevación crónica impacta la homeostasis bioquímica de las células cardiovasculares, finalmente permitiendo el desarrollo de las complicaciones vasculares a raíz de la diabetes, la mayoría de carácter microvascular (Sheetz and King, 2002).

Inicialmente, la elevada glucosa puede incrementar la presencia de vías potencialmente protectoras, pero una elevación muy prolongada de ésta permite la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y puede ser perjudicial incluso si los niveles de glucosa se

controlan (Chong and Maiese, 2012). Siendo un ejemplo claro de esto, la elevación de la glucosa en células endoteliales humanas en donde aumenta la expresión de enzimas antioxidantes entre las cuales se incluyen superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa. Mostrando que las células vasculares tratan inicialmente de resistirse al daño producido por el estrés oxidativo (Sharpe et al., 1998).

Por otra parte, la hipertensión, a su vez acelera todas las complicaciones vasculares de la diabetes (Hsueh and Anderson, 1992), y por si sola, en ausencia de obesidad, se asocia con resistencia a la insulina. La etiología de la hipertensión es extremadamente compleja e indudablemente varía entre individuos, siendo una de las características en común de la mayoría de los casos de hipertensión arterial, un aumento en la resistencia periférica, como resultado de un aumento en el tono vascular, contractibilidad de las células musculares lisas y remodelación de éstas (Owens et al., 2004; Risler et al., 2005); es este cambio vascular probablemente responsable del profundo impacto de la hipertensión en las complicaciones diabéticas.

Uno de los rasgos característicos de hipertensión crónica es el aumento generalizado en la masa de la pared del vaso sanguíneo. La hipertrofia vascular en la hipertensión puede ser una respuesta secundaria debido al aumento de la presión arterial. A pesar del estímulo, para la hipertrofia vascular, el incremento en el lumen del radio de la pared de los vasos, permite amplificar la respuesta vasoconstrictora de ciertos agonistas. Este aumento permanente en la vasoconstricción agrava la hipertensión (Dzau and Gibbons, 1988).

Las células endoteliales y las VSMC son los principales componentes de la pared del vaso. Tanto la hipertensión como la diabetes mellitus alteran la función de estas células. En los

vasos normales, las células endoteliales proporcionan una barrera mecánica que separa a las VSMC, de las sustancias circulantes en el torrente sanguíneo y produce factores locales que actúan de forma paracrina, alterando el tono vascular y el crecimiento (Dzau and Gibbons, 1988).

El crecimiento celular implica una serie de procesos bioquímicos, íntimamente ligados con la disponibilidad de nutrientes y energía. Este mecanismo por el cual los organismos incrementan no sólo su tamaño celular, sino que el número de células, lo realizan a través de la síntesis de nuevos componentes celulares, incluyendo entre estos proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Zoncu et al., 2011). Es así como uno de los blancos involucrados con los procesos de crecimiento y proliferación celular es el complejo mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Una pieza clave en el anabolismo y catabolismo celular, que actúa como integrador de varias señales intracelulares y extracelulares, entre las cuales se incluyen factores de crecimiento, mitógenos, nutrientes, energía y estrés, (Wullschleger et al., 2006; Bai and Jiang, 2010; Zoncu et al., 2011), lo cual convierte a esta proteína en un blanco de estudio en varios procesos patológicos donde la desregulación de las vías de señalización que integra mTOR esta frecuentemente ligada con el desarrollo de cáncer (Jiang and Liu, 2008), enfermedades metabólicas, envejecimiento (Zoncu et al., 2011) e hipertrofia cardíaca (Lee et al., 2007; Sharma et al., 2007).

TOR (target of rapamycin), fue originalmente identificado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente encontrada en humanos, ratón y otras células eucarióticas. Rapamicina, un macrólido aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, forma un complejo con la proteína citosólica FKBP12, específicamente uniéndose a TOR e interfiriendo con su función. Para la mayoría de las células eucarióticas, la inhibición de TOR por Rapamicina,

implica una inhibición del crecimiento, retirando a la célula del ciclo celular y volviéndola insensible a los factores de crecimiento y la estimulación de los nutrientes. Sin embargo, la sensibilidad de cada tipo celular a la Rapamicina varía. Es así como, linfocitos y ciertos tipos de células cancerígenas se encuentran entre los altamente susceptibles a la inhibición con Rapamicina, sin afectar a las células normales del cuerpo.

En mamíferos, los homólogos de TOR en levadura son colectivamente denominados como mTOR. Existe en dos complejos distintos, denominados mTORC1 (mTOR complex 1) y mTORC2 (mTOR complex 2), los cuales contienen muchos componentes que se conservan desde la levadura hasta los humanos. A pesar de la presencia de ambos complejos, sólo mTORC1 es inhibido por Rapamicina. Sin embargo, tratamientos prolongados con Rapamicina afectan la función de mTORC2, probablemente previniendo la síntesis de mTORC2 (Bai and Jiang, 2010).

2.1 **Estructura de mTOR**

mTOR, también conocido como FRAP, RAFT, RAPT o SEP, (Mita et al., 2003; Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger et al., 2006), es responsable de la actividad catalítica de los complejos mTORC1 y mTORC2. Corresponde a una Serina/Treonina quinasa atípica de 289KDa (Tsang et al., 2007; Bai and Jiang, 2010), perteneciente a la familia de PIKK (*phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-related protein kinases* (Rosner et al., 2008).

Su estructura primaria consta de 2549 aminoácidos, exhibiendo dominios estructurales altamente definidos y conservados, es así como cercano al dominio N-terminal se encuentran 20 bloques repetidos en tándem llamados HEAT, ya que se encuentra en **H**untington, factor de **e**longación 3(EF3), la subunidad **A** de la fosfatasa 2A(PP2A) y **T**OR

(Hay and Sonenberg, 2004; Yang and Guan, 2007; Jiang and Liu, 2008; Dunlop and Tee, 2009; Bai and Jiang, 2010). Por otra parte, en el extremo C-terminal medio se encuentra el dominio catalítico, que exhibe una analogía estructural con el dominio catalítico de PI3K (Wullschleger et al., 2006). Inmediatamente río arriba del dominio catalítico, y a diferencia de otros miembros de la familia PIKK, mTOR posee una pequeña región de 11KDa (Proud, 2004; Tsang et al., 2007), llamada FRB, necesaria para la unión de FKBP12/Rapamicina, la cual sólo se encuentra en mTOR, pero no en otros miembros de la familia PIKK (Dunlop and Tee, 2009), lo cual podría explicar la alta e inusual especificidad de Rapamicina por esta proteína, formado una estructura en forma de sándwich, como se muestra en la *Figura 2.1*. Además, junto a esta región se encuentra un dominio relativamente amplio llamado FAT (por FRAP, ATM, TRAP) que se encuentra en otras quinasas de esta familia (PIKK). El extremo C-terminal más distal se encuentra otro dominio FAT, denominado FATC, que se encuentra conformado por al menos 30 aminoácidos, el cual puede ser regulado por el potencial redox citosólico (Bai and Jiang, 2010). Este dominio es absolutamente necesario para la actividad de mTOR y la supresión de cualquiera de los aminoácidos de esta región es capaz de suprimir su actividad (Hay and Sonenberg, 2004; Benjamin et al., 2011). Se ha propuesto que los dominios FATC y FAT interactúan para producir una configuración que expone el dominio catalítico de esta proteína (Wullschleger et al., 2006). mTOR además posee un dominio regulatorio negativo (NRD), entre el dominio catalítico y FATC.

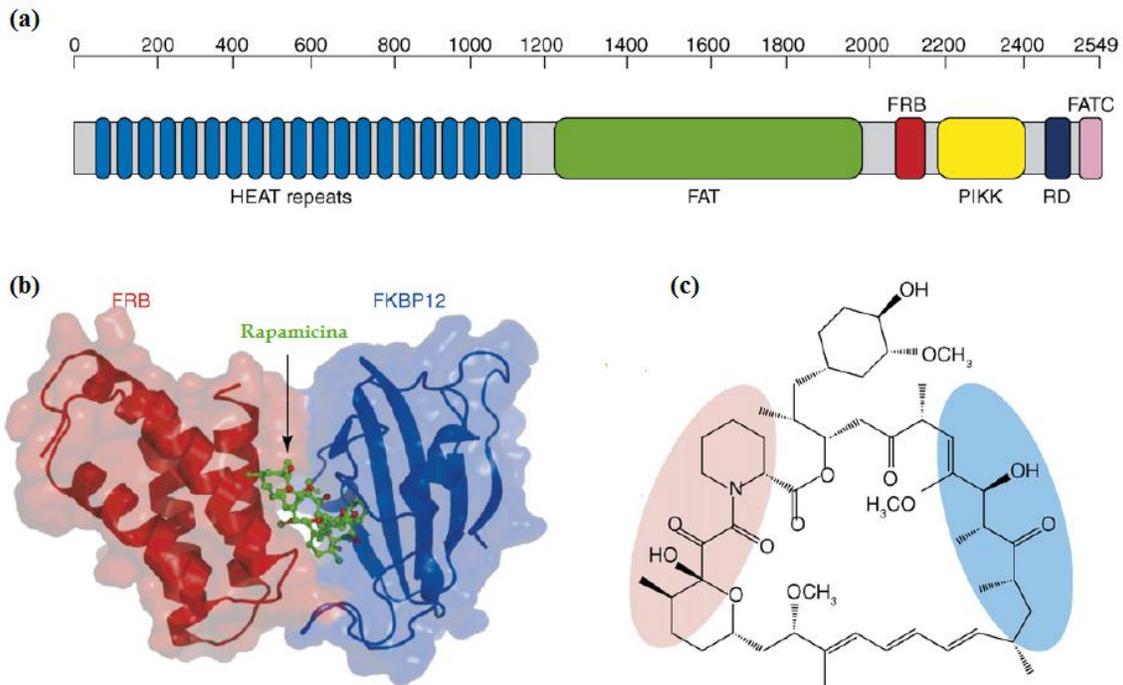


Figura 2.1 *Dominios funcionales de mTOR e interacción entre mTOR, Rapamicina y FKBP12.*

(a) **Dominios funcionales de mTOR:** HEAT (huntington-Factor de elongación 3A-Subunidad A de la proteína 2A-TOR); FAT (FRAP, ATM, TTRAP2); FRB (unión de FKBP12/Rapamicina); RD (Dominio regulatorio); FATC (dominio FAT del extremo C- terminal) y PIKK (Dominio catalítico, PI 3-kinase-related kinase). Los residuos aminoacídicos que se muestran en la parte superior de la figura muestran la posición relativa de los dominios. (b) **Interacción entre mTOR, Rapamicina y FKBP12:** Unión entre el dominio FRB (rojo), rapamicina (verde) y FKBP12 (azul). (c) **Estructura química de Rapamicina:** Se muestran los sitios de unión para FKBP12 (región azul) y mTOR (región roja). Extraído y adaptado de (Tsang et al., 2007)

mTOR se fosforila en múltiples sitios, incluyendo a: Ser2448, Ser2481, Thr2446 y Ser1261. La fosforilación en la Ser2448, mediada por S6K1, ocurre predominante en mTORC1. El residuo de Ser2481, es un residuo de autofosforilación (Hay and Sonenberg, 2004), y su fosforilación ocurre principalmente en mTORC2 y es insensible a la inhibición con Rapamicina. La fosforilación en el residuo de Thr2446 se supone que es fosforilado por AMPK y su nivel de fosforilación aumenta en la medida que reducen los nutrientes y disminuye bajo el estímulo de insulina. El residuo de Ser1261 fue identificado recientemente como un sitio en el cual su fosforilación promueve la actividad de mTORC1 y es requerido para la autofosforilación de mTOR en el residuo de Ser2481 (Bai and Jiang, 2010; Watanabe et al., 2011).

2.2 Organización y función de los complejos mTOR

Tal como se mencionó anteriormente, mTOR es responsable de la actividad catalítica de dos complejos llamados mTORC1 y mTORC2. Las proteínas accesorias y su sensibilidad a su inhibidor natural, Rapamicina diferencia a ambos complejos (Wullschleger et al., 2006).

2.2.1 mTORC1:

mTORC1 se encuentra conformado por mTOR, RAPTOR (**r**egulatory **a**ssociated **p**rotein of **mTOR**), PRAS40 (**p**roline-**r**ich **A**KT **s**ubstrate 40KDa), mLST8 (**m**ammalian **l**ethal with **s**ec13 protein 8, también conocida como GβL), y DEPTOR (**DEP** domain **TOR**-binding protein).

mLST8, es la única proteína asociada que se encuentra en ambos complejos, y corresponde a una proteína de aproximadamente 36KDa. mLST8 se ha encontrado asociado con el

dominio catalítico de mTOR y estimula su actividad catalítica (Zoncu et al., 2011). Sin embargo, no juega un rol crítico en la función de mTORC1.

RAPTOR, también conocido p150 TOR-scaffold protein (Bai and Jiang, 2010), actúa como una proteína adaptadora en mTORC1 a través de la unión y presentación de sustratos para mTOR. RAPTOR se une a una secuencia, comúnmente conocida como TOS (TOR signaling motif), encontrada en todos los sustratos conocidos de mTORC1, incluyendo S6K, 4E-BP1 Y PRAS40. Mutaciones de esta región en S6K y 4E-BP1 suprimen la unión con RAPTOR, eliminando a su vez la capacidad de éstos de ser fosforilados por mTORC1 en las células. Además de la región TOS, 4E-BP1 contiene otra región denominada RAIP (RAPTOR-interacting motif), la cual es requerida para la unión de RAPTOR y su fosforilación eficiente por mTORC1. RAPTOR a su vez es fosforilado en múltiples sitios por muchas quinasas, incluyendo AMPK, RSK y mTORC1. AMPK fosforila a RAPTOR en 2 sitios bien conservados Ser722 y Ser792 produciendo el reclutamiento de la proteína 14-3-3 e induciendo la inhibición de la actividad de mTORC1. Por otra parte, RSK fosforila a RAPTOR en tres sitios que promueven la actividad quinasa de mTORC1. Finalmente, mTORC1 fosforila directamente a RAPTOR y mutaciones en cualquiera de estos sitios atenúan el efecto de Rheb (Ras-homolgy enriched in brain) en la activación de mTORC1.

PRAS40 unido a mTORC1 *in vitro* inhibe la activación de mTOR (Russell et al., 2011). Una disminución de los factores de crecimiento inhibe mTOR, en parte, a través de PRAS40. PRAS40 contiene secuencias TOS y la sobreexpresión de PRAS40 sugiere que es capaz de competir con otros blancos de mTORC1 por su fosforilación. Así mismo, aunque todo el impacto negativo de PRAS40 en mTORC1, ha sido bien establecido, se

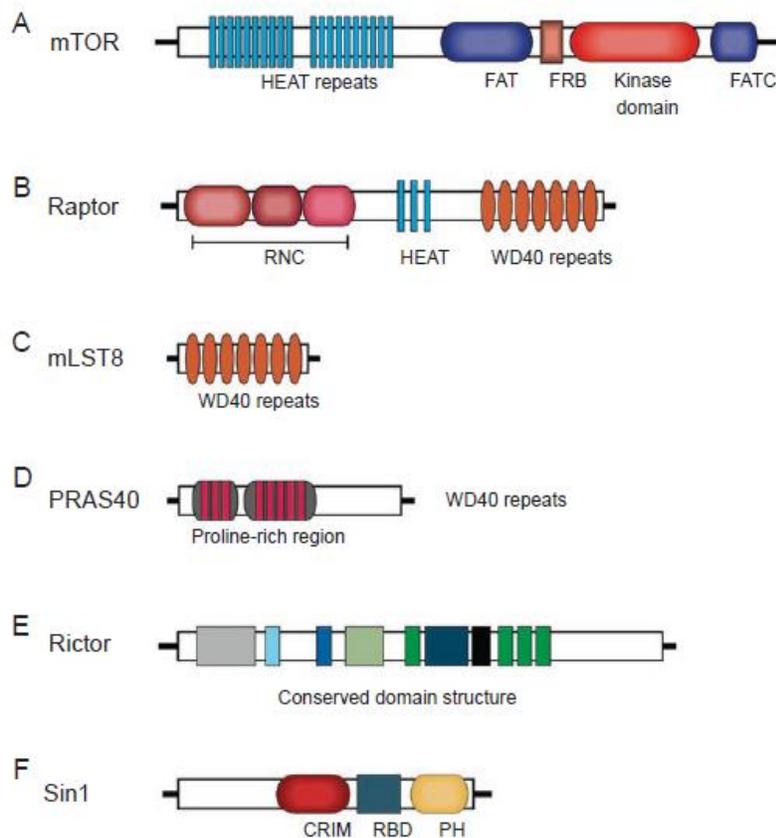
requieren de estudios adicionales para determinar si PRAS40 inhibe a mTORC1 como subunidad o como sustrato, o ambas.

El complejo mTORC1 activa la síntesis de proteínas, la biogénesis ribosomal, el transporte de nutrientes, la síntesis de lípidos y otros procesos, en respuesta a los nutrientes, factores de crecimiento y nivel de energía. De este modo, integrando varias señales, mTORC1 media la decisión de la célula a crecer, definida como un aumento en el tamaño celular.

2.2.2 mTORC2

Se conoce mucho más sobre las funciones de mTORC1 que de mTORC2. mTORC2 comparte algunas subunidades con mTORC1, incluyendo mTOR, DEPTOR y mLST8. Sin embargo, varios miembros que sólo pertenecen a mTORC2 como RICTOR (**Rapamicin insensitive companion of **mTOR**), Sin1 (**strass-activated protein Kinase interacting protein 1**) y PROCTOR (**protein-binding RICTOR**). RICTOR contiene dominios que se encuentran conservados dentro de los eucariontes, y se ha postulado su importancia en la formación del complejo mTORC2 y el reclutamiento de las subunidades. PROCTOR se une a mTORC2 a través de RICTOR y se ha mostrado que no se requiere para el ensamblaje de mTORC2 o la actividad catalítica de mTORC2 (Bai and Jiang, 2010; Zoncu et al., 2011). Sin1 se ha descrito que promueve la unión entre RICTOR-mTORC2 y regula especificidad de los sustratos (Russell et al., 2011).**

Todas las proteínas accesorias y sus estructuras se encuentran representadas en la *Figura 2.2*.



***Figura 2.2* Representación esquemática del complejo mTOR.**

HEAT: una estructura de dos α -hélices antiparalelas que permiten la interacción proteína-proteína. Se encuentra en *huntingtin*, *elongation factor 3*, *PR65/A* and *TOR*; **FAT:** un dominio estructural que es compartido por *FRAP*, *ATM* and *TRRAP*; todos miembros de la familia PIKK; **FRB:** dominio de unión de FKBP12/Rapamicina; **FATC:** dominio FAT C-terminal; **RNC:** dominio conservado N-terminal de RAPTOR; **WD40:** Región WD conservada de aproximadamente 40 aminoácidos formando cuatro hojas β anti-paralelas; **CRIM:** región medial conservada; **RBD:** dominio de unión de Ras. Extraído y adaptado de (Yang and Guan, 2007)

2.3 Localización

El consenso entre estudios independientes es que mTOR es predominantemente citoplasmático, pero asociado a membranas celulares como aquellas de la mitocondria, retículo endoplasmático y Golgi (Desai et al., 2002; Drenan et al., 2004; Proud, 2004; Liu and Zheng, 2007). Sin embargo, una pequeña fracción de esta proteína se encuentra en el núcleo en estado estacionario. Además, podría transportarse entre el núcleo y el citoplasma, siendo esta acción fundamental para la señalización con sus blancos citoplasmáticos S6K1 y 4E-BP1 (Bachmann et al., 2006).

2.4 Vía de señalización

La mayoría de los factores de crecimiento controlan la proliferación y el crecimiento celular a través de mTOR, principalmente mediante la activación de la vía PI3K/Akt (Wullschleger et al., 2006). La activación inicial de la vía se produce por receptores en la membrana plasmática, desde donde se propaga la señal de activación a través de PI3K, la cual puede ocurrir a través de: receptores tirosina quinasa como EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e IGF-1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*), GPCRs (*G-protein-coupled receptors*), (LoPiccolo et al., 2008). Una vez activada PI3K cataliza la fosforilación de fosfoinositoles. Uno de estos fosfoinositoles el PI(3,4,5)P₃ se une a PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1), activando posteriormente a Akt, una serina/treonina quinasa (Kahn et al., 2005). A su vez, Akt puede directamente activar a mTORC1 a través de la fosforilación de PRAS40, disminuyendo la habilidad de PRAS40 de inhibir mTORC1 (Russell et al., 2011), lo cual desencadena su cascada de señalización río abajo que promueve el crecimiento y la proliferación celular (Liao et al., 2010). Por otra parte, Akt puede causar la activación indirecta de mTOR a través de la fosforilación y subsecuente inactivación del complejo heterodimérico TSC1/2 que presenta actividad conocida como GAP

(GTPase-activating protein). En donde TSC1 estabiliza al complejo, mientras que TSC2 presenta en su extremo C-terminal en el dominio GAP, el cual normalmente inhibe a mTORC1 a través de la inhibición la proteína que une GTP llamada Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) (LoPiccolo et al., 2008; Russell et al., 2011).

Una de las vías de interés en la cual participa mTOR y que tiene importancia en enfermedades tales como la diabetes, es aquella que es capaz de detectar los niveles de energía. El mecanismo por el cual esto ocurre se puso de manifiesto con el descubrimiento de la participación de AMPK (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (Kahn et al., 2005), donde la reducción de la glucosa reduce la proporción ATP:AMP en las células eucarióticas, activando de ese modo a AMPK y produciéndose la inhibición de mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Wullschleger et al., 2006; Memmott and Dennis, 2009), a través de la fosforilación de TSC2, un regulador negativo de mTORC1.

En base a los antecedentes mencionados anteriormente, es conocido el hecho que la hiperglicemia en la diabetes mellitus agrava el proceso hipertensivo. Por otro lado, vasopresina que es una hormona mitogénica, acción que se lleva a cabo por receptores tipo V1 (Thibonnier et al., 2001). Este tipo de receptores está presente en el musculo liso vascular y podría participar en el desarrollo de hipertensión al aumentar la proliferación de células musculares lisas y en consecuencia disminuir la elasticidad arterial. Nosotros creemos que la forma en que la hiperglicemia agrava la condición hipertensiva es mediante la estimulación de la capacidad proliferativa de vasopresina, a través de mTOR. Es por este motivo que postulamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis del trabajo:

La concentración extracelular de glucosa modula la activación de mTOR ejercida por vasopresina.

Para poner a prueba esta hipótesis, fueron planteados los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estudiar la respuesta de mTOR frente a vasopresina en condiciones de alta concentración extracelular de glucosa.

Objetivos específicos:

1. Determinar el grado de fosforilación de mTOR en respuesta a vasopresina en células A-10 cultivadas en concentración de glucosa normal (5,5 mM).
2. Determinar el grado de fosforilación de mTOR en células A-10 incubadas en alta concentración de glucosa (25 mM) por diferentes tiempos.
3. Determinar el grado de fosforilación de mTOR en respuesta a vasopresina en células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa (25 mM).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos Químicos:

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron adquiridos en las siguientes empresas.

3.1.1.1 Bachem

Hormona, (Arg8)- Vasopressin Trifluoroacetate salt

3.1.1.2 Bio-Rad Laboratories, Inc.

DCTM BIO-RAD Protein Assay, tween-20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate), transfer-Blot® Transfer Medium pure Nitrocelulose Membrane (0.2µm)

3.1.1.3 Equilab

Ácido acético

3.1.1.4 Gibco™

Colorante Tripan blue, medio Eagle modificado por Dulbecco HG (DMEM, glucosa 25 mM), medio Eagle modificado por Dulbecco LG (DMEM LG, glucosa 5,6 mM), antibiótico antimicótico 100x (Penicilina G sódica 10.000 U, Sulfato de Estreptomicina 10.000 µg y Anfotericina B (como sal antimicótica Fungizone® al 0.85%) 25 µg/ml).

3.1.1.5 Invitrogen

Glicerol

3.1.1.6 J.T. Baker®

Metanol

3.1.1.7 Merck

Etanol Absoluto, 2-propanol, bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 1-butanol.

3.1.1.8 CalbioChem®:

β-mercaptoetanol

Inhibidores: Inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor EGFR, tirfostina AG1478 (4-[3-cloroanilinio]-8 fenil4H-1-1 benzopirano-4-ona); inhibidor de PI3K, LY294002 (2-(4-morfonil)-8-fenil4H-1-1 benzopirano-4-ona); inhibidor de PKC, Gö6983, 2-[1-(3-Dimetilaminopropil)-5-methoxyindol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl) maleimida; Inhibidor de MEK, PD98059 (2'-Amino-3'-metoxiflavona); inhibidor de la subunidad β₁γ₂, Galleina (C₂₀H₁₂ O₇ • 2H₂O)

3.1.1.9 Promega Corporation

Tris-base, acrilamida, bis-acrilamida, dodecilsulfato de sodio (SDS), 2,4 ditiotreitól (DTT), cloruro de sodio (NaCl).

3.1.1.10 Sigma Aldrich

Ácido etilendiamonotetraacético (EDTA), albúmina de suero Bovino (BSA), azida de sodio, azul de bromofenol, bicarbonato de sodio (NaHCO₃), deoxicolato de Sodio, dimetilsulfóxido (DMSO), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de sodio (NaF), fosfato de sodio (NaH₂PO₄·H₂O), inhibidor de Tripsina, leupeptin (C₂₀H₃₈N₆O₄ · 1/2H₂SO₄), cloruro de sodio (NaCl), N- Etil maleimida (NEM), Nonidet P40 (IGEPAL CA-630), ortovanadato de sodio, tripsina de páncreas porcino.

3.1.1.11 ThermoFisher Scientific

Marcador de peso molecular (40-300KDa) (*Spectra Multicolor High Range Protein Ladder*), SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Marcador de peso molecular (20-120KDa).

3.1.1.12 Watt's

Leche descremada en polvo Calo

3.1.1.13 Winkler Ltda.

Tampones para calibración (pH 4.0, 7.0 y 10)

3.1.2 Soluciones Stock

AVP fue preparada a una concentración de 50 μ M en metanol al 80% y guardada a -20°C. Para estimular a la línea celular A-10, se trabajó de tal modo de obtener una concentración final de AVP 50nM en cada una de las placas de cultivo a trabajar.

Se trabajó con las siguientes soluciones stock: LY294002 50mM, preparado en DMSO y guardado a -20°C; Galleína 10mg/mL, preparada en DMSO y guardada a -4°C; PD98059 50mM, preparado en DMSO y guardado a -20°C; AG1478 15,8mM (5mg/mL), preparado en DMSO y guardado a -20°C y Gö6983 8mM, preparado en DMSO y guardado a -20°C.

3.1.3 Equipos y materiales

Agitador magnético Cole Palmer (Mod. 4658. Stirrer / Hot plate), agitador ProBlot™ Rocker 25 con plataforma simple (labnet International Inc.), balanza analítica Sartorius (LA230S), balanza electrónica Shimadzu (321-33557), baño Termorregulado Memmert a 37°C, baño termoregulado modelo PY4 (Science/Electronics Inc.), cámara Neubauer (BOECO Blood Counting Chambers (Neubauer improved, bright-line double ruling)), bomba de vacío Meduak, cámara de flujo laminar Nuair 8 (clase II tipo A), centrífuga clínica International Equipment (Mod. CL) (Biofuge A), Centrífuga Eppendorf refrigerada 5415 R, espectrofotómetro Shimadzu (UV-150-02), estufa de cultivo con CO2 Forma Scientific (Water Jacketed Incubator), freezer a -86 °C ULT (ultra low temperature) (DW-86L288), fuente de poder Bio-Rad Power Pac-200, micropipetas Gilson (Pipetman P2, P20, P200 y P1000), microscopio invertido Nikon-TMS, mini centrífuga Heathrow Scientific Sprout®, mini rotor de tubos Eppendorf (Mini LabRoller™ Rotator with rotisserie for 36x1.5/2.0ml tubes, 230V with EU cord), pHmetro WTW (pH521), pipetador automático FastPette™, sonicador (Cole Parmer Ultrasonic Homogenizer Power Supply 4710 Series), Thermomixer Eppendorf® (modelo 5436), Vortex (Vortex MIXER VX-200, Labnet International Inc.).

3.2 MÉTODO

3.2.1 Cultivo celular y tratamientos:

3.2.1.1 Propagación Celular:

Se trabajó con la línea celular proveniente de musculatura lisa vascular derivada de aorta de rata, A-10 (ATCC CRL 1476). Las células fueron cultivadas en placas de 100mm, en 5 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen), en condiciones de glucosa normal (5,5mM) y alta glucosa (25mM), suplementado con suero bovino fetal inactivo (FBS) al 10%, y antibiótico-antimicótico al 1% (Penicilina, Estreptomina, Anfotericina B). Las condiciones de cultivo fueron al 5% en CO₂ y de una temperatura de 37°C. Cada 3 o 4 días se subcultivaron las células, desprendiéndolas de la placa utilizando tripsina (tripsina 0,25%, EDTA 1mM en PBS1X pH 7,8) durante 1 minuto aproximadamente a 37°C.

3.2.1.2 Congelar células:

Para conservar durante largo tiempo las células, éstas son primeramente tripsinizadas durante 1 minuto aproximadamente para despegarlas de las placas de cultivo y son resuspendidas en su medio de cultivo correspondiente y colocadas en un tubo Falcon de 15mL para luego ser centrifugadas a 3000 r.p.m durante 5 minutos. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet en SBF, al que se le adicionó un 10% (v/v) de DMSO. Siendo congeladas lentamente a -80° C.

3.2.1.3 Descongelar células:

Los viales de células almacenados a -80°C fueron descongelados, para posteriormente sembrar las células en placas de 100 mm de diámetro con 5 mL de medio de cultivo DMEM LG completo o DMEM HG respectivamente.

3.2.1.4 Contar células:

Las células son contadas para trabajar dentro de la confluencia establecida y regular el número de células que sembramos en cada placa de 60 mm, para posteriormente proceder a los distintos estímulos e inhibiciones. Para esto las placas deseadas de 100mm son tripsinizadas durante 1 minuto con aproximadamente 3mL y observadas en el microscopio óptico para verificar que las células se han desprendido de la placa. Se retira la tripsina rápidamente y obtenemos las células lavando las placas con el medio de cultivo correspondiente y traspasándolas a un tubo Falcon de 15 mL. En un tubo Eppendorf, agregamos 200 μ L de la mezcla de medio de cultivo y células, y 200 μ L del colorante Tripán Blue. Agitamos vigorosamente la mezcla obtenida y situamos un pequeño volumen en la cámara Neubauer, un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de células en un medio líquido. Con base en la cantidad de células contadas, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial.

En cada placa de trabajo de 60mm, se siembran 300.000 células en medio DMEM LG y 275.000 células en medio DMEM HG, de modo tal de alcanzar la confluencia deseada en cada caso.

3.2.1.5 Estimulación e inhibición de células A-10:

Para el análisis de las distintas respuestas inducidas por vasopresina, las células A-10 fueron llevadas a un estado de confluencia del 90% y mantenidas en el medio DMEM correspondiente, libre de antibióticos y suero bovino fetal (DMEM base) por un periodo de 16 a 18 horas aproximadamente, previo al estímulo hormonal o tratamientos de inhibición (ver *Tabla 4*).

Para evaluar el efecto de la fosforilación de mTOR inducida por AVP en células A-10 en medio de baja concentración de glucosa (DMEM LG), las células fueron estimuladas con AVP 50nM

durante 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos. En cambio para determinar el efecto de AVP sobre las células A-10 en alta concentración de glucosa (DMEM HG), éstas fueron mantenidas durante 10 días en medio DMEM HG completo, y luego estimuladas con AVP 50nM durante 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos.

Conjuntamente para evaluar el efecto de la glucosa sobre la fosforilación de mTOR en células A-10, éstas fueron incubadas con una concentración de glucosa de 25 mM durante 0 min , 15 min, 30 min, 60 min , 90 min , 180 min, 360 min, 720 min, 1440 min, 2880 min o 4320min.

3.2.2 Análisis de proteínas

3.2.2.1 Extracción de proteínas totales:

Cada placa sembrada de 60mm, que fue sometida a distintos tratamientos, fue lavada 2 veces con PBS 1X frío (4°C) y posteriormente cuidando que no queden residuos de PBS 1x, se agregaron 100µL de Buffer de lisis RIPA 1x (Tris·HCL 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1% v/v, nonidet P-40 1%, Deoxicolato de Sodio 0,5%p/v y EDTA 100µM) que contenía los siguientes inhibidores de proteasas, PMSF 0,1 mM, inhibidor de tripsina 5µg/mL, NEM 10mM y leupeptin 1 µg/ml y fosfatasas, Na₂VO₃ 1mM y NaF 1mM. Luego, las células fueron cosechadas con espátula en hielo y traspasadas a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La mezcla obtenida fue sonicada con 20 pulsos de 40 de amplitud y los tubos fueron mantenidos en hielo. A continuación se agitaron las muestras durante 1 hora en la cámara fría (4°C) para permitir la correcta homogeneización de las células y su lisis. Finalmente las células son centrifugadas a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos y una vez realizado este proceso, extraemos cuidadosamente el sobrenadante obtenido y descartamos el pellet.

3.2.2.2 Determinación de la concentración de proteínas totales

Una vez obtenidas las proteínas totales su concentración fue determinada mediante el método de Lowry modificado, a través del Kit BIO RAD. En donde se adicionó a cada uno de los tubos Eppendorf 20 μ L de muestra, 100 μ L de la mezcla del reactivo A y el reactivo S (por cada 1 ml de reactivo A se agregan 20 μ L del reactivo S) y 800 μ L del reactivo B. Posteriormente la mezcla se deja incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente para que la reacción se lleve a cabo y determinar finalmente en un espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda (λ) 750 nm. Es importante resaltar que para determinar la concentración de las muestras, se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA (2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml).

3.2.2.3 Preparación de las muestras

Se prepararon las muestras de modo tal que cada pocillo contenga 30 ó 15 μ g de proteínas totales. Se mezcla un volumen adecuado acorde al rendimiento de cada muestra que contenga 30 ó 15 μ g de proteínas, buffer de Carga 2X (Tris·HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (v/v), azul de bromofenol 0,04 mg/mL, ditioneitol (DTT) 1M) y buffer Ripa 1X con los correspondientes inhibidores de proteasas y fosfatasas, de modo tal de completar el volumen final establecido para cada pocillo, que generalmente no excede los 40 μ L, dependiente del tamaño del pocillo y de la peiqueta empleada para hacer los geles.

3.2.2.4 Electroforesis, transferencia e inmunodetección (Westernblot)

La metodología de Western Blot empleada ha sido la descrita en “Current Protocols in Protein Science” (Coligan, 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE usando geles de diferentes

porcentajes de poliacrilamida (del 8 al 12%). Antes de cargar los geles con las muestras respectivas, éstas, son calentadas durante 5 minutos a 95°C

La corrida electroforética se realizó en un sistema mini-protean Electrophoresis System (Bio-Rad) de forma bifásica en donde en la primera etapa las muestras son apiladas a un voltaje constante de 150 Volts durante 10 o 15 minutos, dependiendo de la altura de la sección apiladora del gel y luego se procede de forma continua a la separación de las proteínas a 100 Volts durante 2 horas, en un tampón compuesto por (*glicina 0,2 M, Tris 25 mM, SDS 0,1% (p/v)*).

La transferencia se realizó a una membrana de nitrocelulosa (Pure Nitrocellulose Membrane (0.2 µm) Bio-Rad) durante 120 minutos para geles de 1,5 mm de grosor a amperaje constante de 350 mA, en tampón compuesto por (*glicina 0,1 M, Tris 12,5 mM, metanol 20% (v/v) y SDS 0,05%(v/v)*). Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas con una solución para sacar SDS (*Isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10%(v/v)*) durante 15 minutos, para posteriormente ser lavadas 3 veces durante 10 minutos con TBS-T (*Tris·HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %(v/v)*).

Finalmente, se bloquea la membrana con leche descremada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T (*Tris·HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %(v/v)*) durante 1 hora a temperatura ambiente por medio de agitación, para proceder a su incubación con el anticuerpo primario deseado.

La inmunodetección se realizó con los anticuerpos especificados en la Tabla 1. Los anticuerpos primarios se diluyeron en leche descremada en polvo al 5% (p/v) en TBS-T (*Tris·HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %(v/v)*) y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al otro día se retiró el anticuerpo y las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con TBS-T (*Tris·HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %(v/v)*) para proceder a ser incubadas

durante 90 minutos con anticuerpo secundario diluido en leche al 5% (p/v) en TBS-T. Una vez finalizado este procedimiento, se realizó el lavado de las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBS-T y finalmente previo a la incubación con luminol (Ver *Tabla 2*) durante 5 minutos, se realiza un último lavado con TBS (*Tris·HCl 20 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM*) durante 10 minutos.

3.2.2.5 Elución de anticuerpos (Stripping)

En los casos donde se necesitó revelar frente a más de un anticuerpo, las membranas se sometieron a *Stripping*. Para ello, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación en una mezcla que contiene (*SDS 2%, Tris·HCL 62,5 mM pH 6,8 y β - Mercaptoetanol 100 mM*). Luego se procedió a lavar la membrana durante 15 minutos con una solución conteniendo *Isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10%(v/v)*. Luego se realizaron tres lavados en TBS-T durante 10 min y se procedió de nuevo a bloquear la membrana y a incubarla con el anticuerpo deseado.

3.2.3 Análisis computacional de las fotografías

El análisis densitográfico de las imágenes se llevó a cabo utilizando el programa UN-SCAN-IT y su porcentaje de saturación fue verificado con el programa WCIF ImageJ. Las intensidades de las bandas electroforéticas fueron normalizadas en base al incremento entre la intensidad de la banda de la proteína fosforilada y la intensidad de la banda correspondiente a la proteína total. El análisis estadístico y los gráficos se confeccionaron con el programa Sigma Plot. Los experimentos fueron realizados por triplicado, excepto aquellos en que se ha omitido un valor del error estándar.

Tabla 1 Anticuerpos Primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.

Se especifica la procedencia, la dilución utilizada y el tipo de anticuerpo secundario.

<i>Anticuerpos Primarios</i>				
Anticuerpos primarios	Procedencia	Dilución empleada	Tipo	Anticuerpo secundario
Phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling Technology	1:1000	Policlonal	Anti-conejo
mTOR	Cell Signaling Technology	1: 2000	Policlonal	Anti-conejo
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	1: 4000	policlonal	Anti-conejo
p- α -MAPK	Cell Signaling Technology	1:4000	policlonal	Anti-ratón
α -MAPK	Cell Signaling Technology	1:4000	policlonal	Anti-conejo
Actina (C-11):sc-1615	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1: 2000	policlonal	Anti-mono

Tabla 2 Anticuerpos Secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.

Se especifica la procedencia, la dilución utilizada y el tipo de anticuerpo secundario.

<i>Anticuerpos Secundarios</i>				
Anticuerpo Secundario	Procedencia	Dilución empleada	Anticuerpo reconocido	tipo
Anti-conejo HRP (GAR-HRP)	Jackson ImmunoResearch	1:10.000	p-mTOR (Ser2448) mTOR	Policlonal
		1:50.000	α -Akt(S473) α -MAPK	Policlonal
Donkey anti-goat (DAG- HRP)	Jackson ImmunoResearch	1:25.000	Actina C-11	Policlonal
Donkey anti-mouse (DAM-HRP)	Jackson ImmunoResearch	1:50.000	p- α -MAPK	Policlonal

* Los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada en polvo al 5% (p/v) en TTBS 1x [Tween-20 (composición)

*Los anticuerpos fueron detectados utilizando el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Tabla 3 Sustratos para western Blot

Sustrato	Medida o Color	Dilución del Anticuerpo (solución stock 1mg/mL)	Sensibilidad	Enzima
Super SignalWest Pico	425nm/ quimioluminiscencia	1º: 1:1000 – 1:5000 2º: 1:20000 – 1:10000	1 pg	HRP

Tabla 4: Tratamiento con inhibidores.

Nombre, concentración, tiempo de incubación y referencias de los distintos inhibidores de las posibles proteínas involucradas en la vía de activación de mTOR.

Inhibidor	Blanco de inhibición	Concentración	Tiempo de tratamiento	Referencia
LY294002	PI3Ks	10µM	30 minutos	Dato Experimental: <i>Figura 4.8</i>
Galleína	Modulador de la subunidad G _{β1γ2}	10µM	1Hora	(Lehmann et al., 2008)
AG1478	EGFR	1µM	30 minutos	(Fuentes et al., 2008)
Gö6983	PKC _{α,β,γ,δ,ε,η, θ}	10µM	30 minutos	(Fuentes et al., 2008)
PD98059	MEK1/2	50µM	30 minutos	(Fuentes et al., 2008)
1-butanol	PLD	0,3%	15 minutos	(Fang et al., 2001)

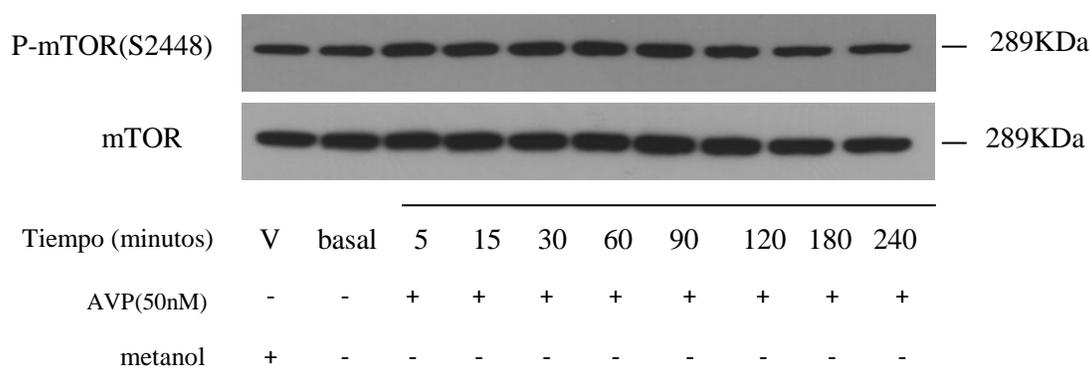
4. RESULTADOS

4.1 Determinar el grado de fosforilación de mTOR en respuesta a vasopresina en células A-10 cultivadas en concentración de glucosa normal (5,5 mM).

4.1.1 Efecto de AVP(50 nM), sobre la fosforilación de mTOR

A fin de evaluar el espectro de fosforilación de mTOR inducido por AVP en células A-10 cultivadas en baja concentración de glucosa, estimulamos células durante distintos tiempos y evaluamos su perfil de fosforilación en respuesta a AVP (50 nM). Observándose que frente al estímulo hormonal, la respuesta en el perfil de activación de mTOR, no varió en los distintos tiempos de activación con respecto al basal, tal como se muestra en la *figura 4.1*. Sin embargo, podemos ver una ligera diferencia a los 240 minutos, donde ocurrió una disminución en la fosforilación de mTOR con respecto al basal de aproximadamente un 16%.

(a)



(b)

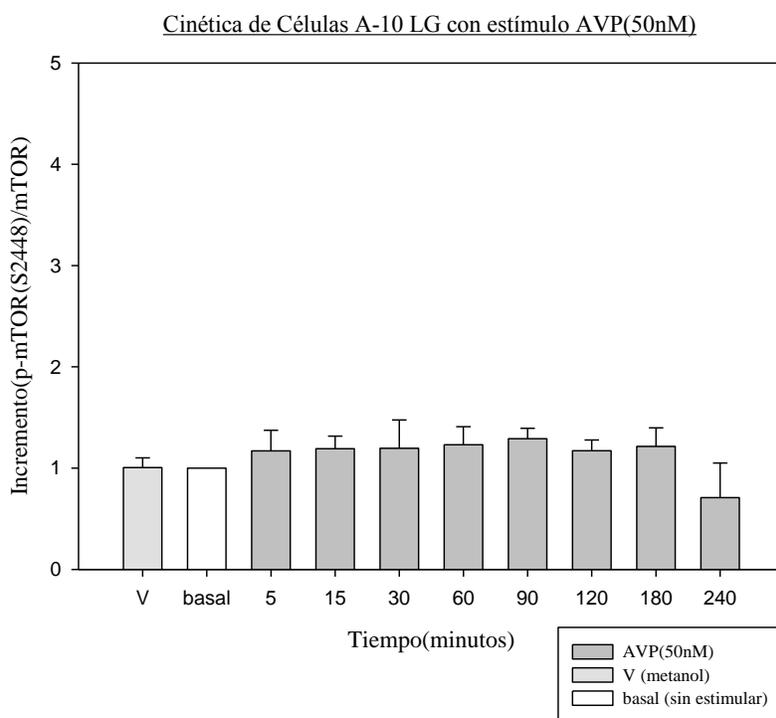


Figura 4.1: Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en baja concentración de glucosa.

(a) Células A-10 fueron cultivadas en medio DMEM LG y posteriormente estimuladas con AVP (50 nM) durante 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 o 240 minutos (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento p-mTOR(S2448)/ mTOR utilizando el programa UN-SCAN-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto al basal (n=3) (p<0,05).

4.1.2 Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de AKT/PKB inducida por AVP (50 nM).

Se ha visto que PI3K es necesaria para la activación de AKT/PKB, proteína involucrada dentro de la vía clásica de activación de mTOR, dependiente de factores de crecimiento. Además se han propuesto otras vías de activación complementaria e independiente de PI3K para la activación de esta proteína. Es por esto que evaluamos el efecto de un inhibidor estructural de PI3K en la activación de AKT/PKB, inducida por AVP. LY294002, un inhibidor específico de PI3K a bajas concentraciones; alrededor del orden micromolar. Como se muestra en la *figura 4.2*, la fosforilación de AKT en células A-10 LG, estimuladas con AVP (50 nM) durante distintos tiempos, se produce un aumento poco significativo en la fosforilación de AKT alrededor de las 4H, alcanzando casi el nivel basal de activación. Sin embargo, la fosforilación de AKT/PKB, disminuye dramáticamente con el tratamiento previo de inhibición con LY294002 (10 μ M), ya que tanto el control, que sólo contiene el inhibidor y los distintos tiempos que fueron estimulados con AVP(50 nM), y que fueron pre-incubadas con LY294002, no se observó fosforilación de AKT(S473), desapareciendo completamente la banda de fosforilación, sin embargo, podemos volver a observar levemente la fosforilación de esta proteína alrededor de 3 hrs, aunque su fosforilación es menor del 50% con respecto al basal, tal y como podemos apreciar en la *figura 4.3*.

Ambos efectos se pueden observar en paralelo, al observar la *figura 4.4*, en donde vasopresina no es capaz de activar a AKT en presencia del inhibidor LY294902.

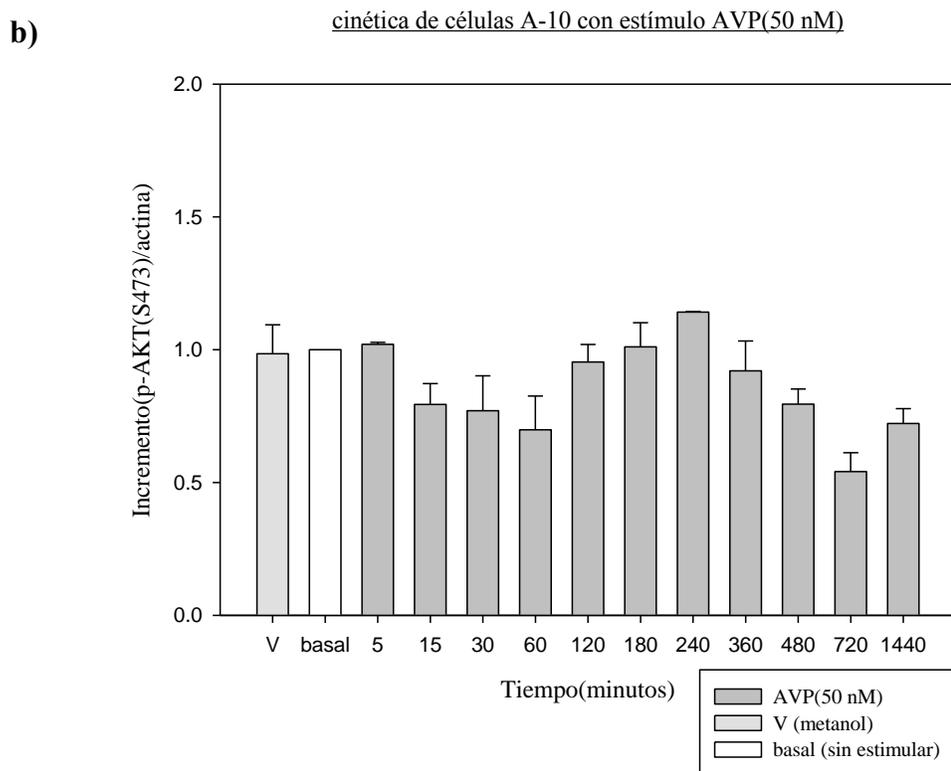
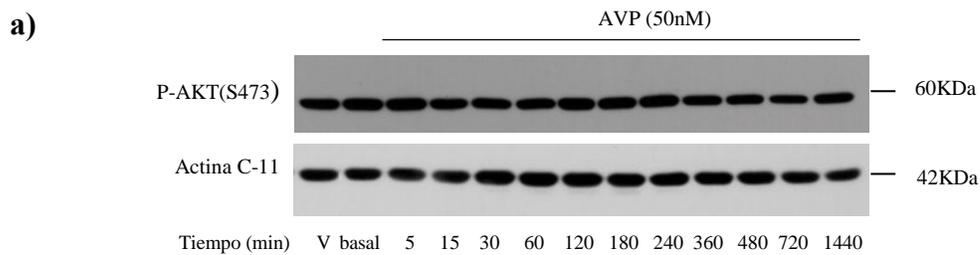
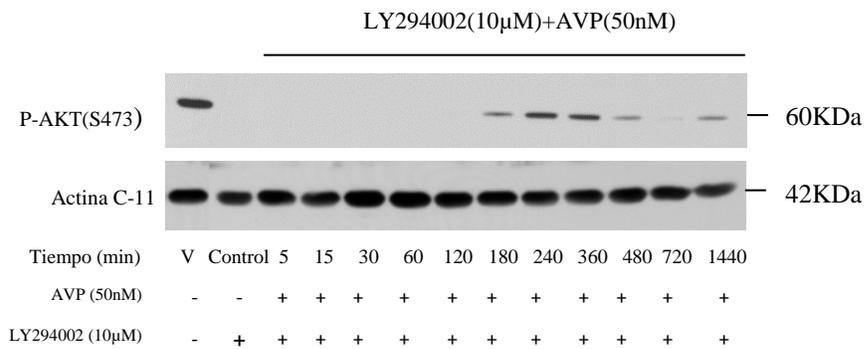


Figura 4.2: Vasopresina no induce la fosforilación de AKT(S473) en células A-10 cultivadas en medio DMEM LG.

(a) Células A-10 fueron estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-AKT(S473)/Actina utilizando el programa UN-SCAN-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto al basal (n=3).

a)



b)

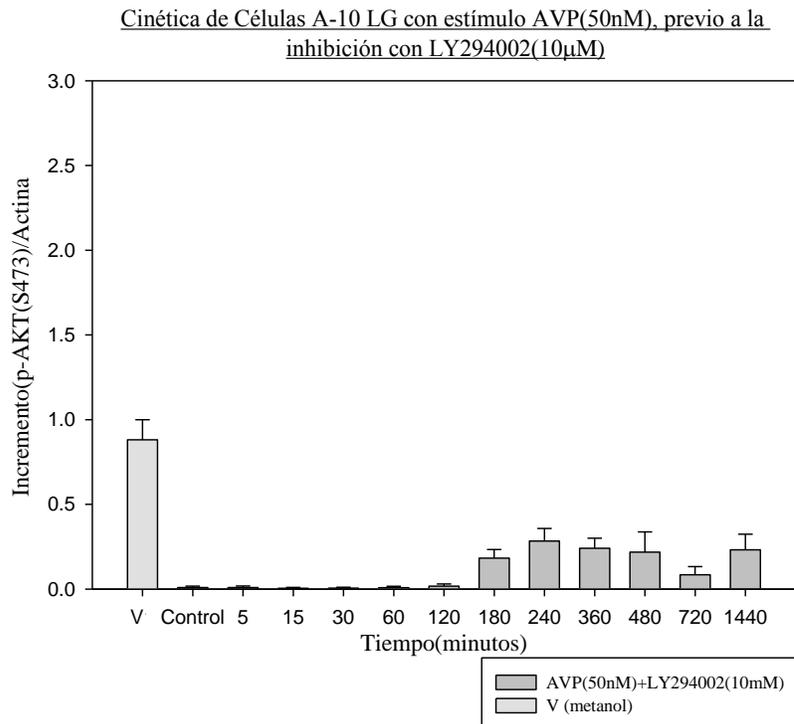
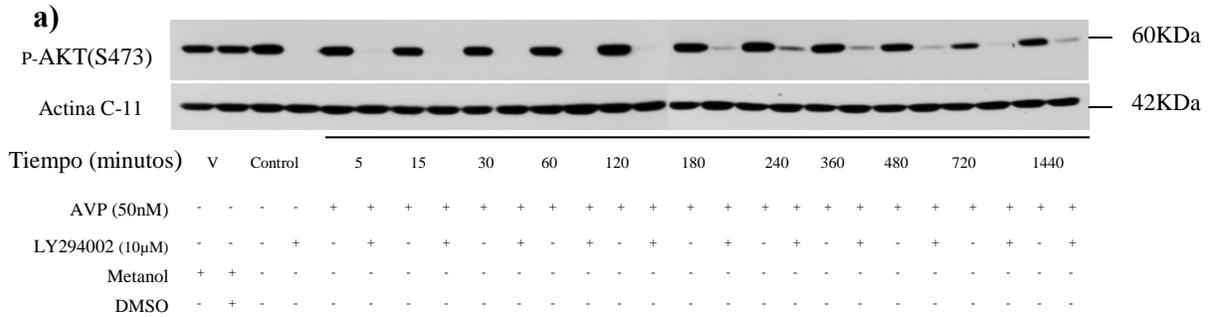


Figura 4.3: Efecto del inhibidor LY294002 (10 μ M) sobre la fosforilación de AKT(S473) , inducida por AVP (50 nM) en células A-10 cultivadas en medio DMEM LG.

(a) Células A-10 fueron pre-incubadas con el inhibidor LY294002 (10 μ M) durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120,180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos, (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-AKT(S473)/Actina utilizando el programa UN-SCAN-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto al basal de la figura 4.2 (n=3) (Control: Tratamiento con LY294002 (10 μ M) durante 30 minutos).



b)

Cinética de Células A-10 LG con estímulo AVP(50nM), previo a la inhibición con LY294002(10µM).

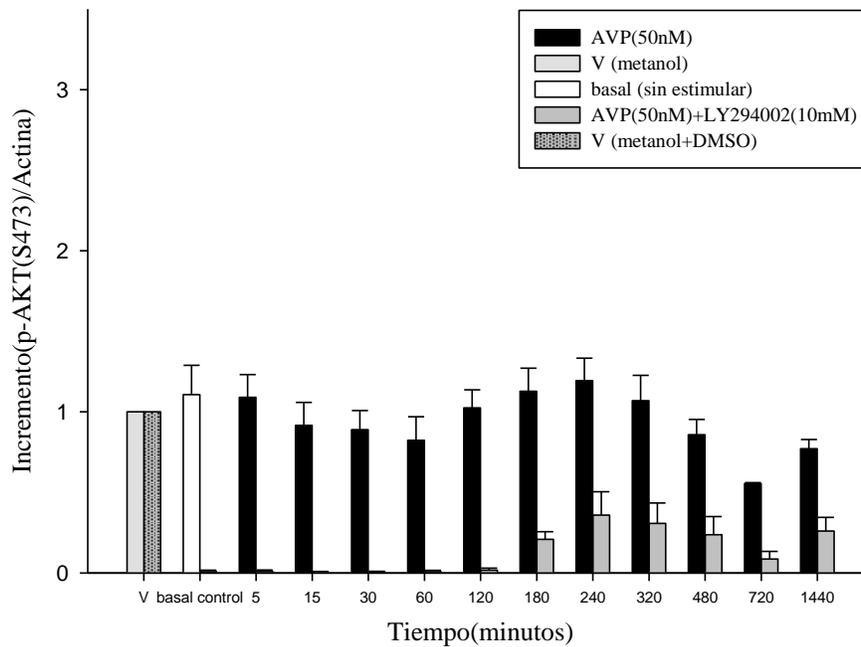


Figura 4.4: Vasopresina no induce la fosforilación de AKT (S473) en presencia del inhibidor LY294002 a tiempos cortos, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG (a) Células A-10 fueron pre-incubadas con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos, y posteriormente estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-AKT(S473)/Actina utilizando el programa UN-Scan-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto al vehículo (n=3) (control: Tratamiento con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos).

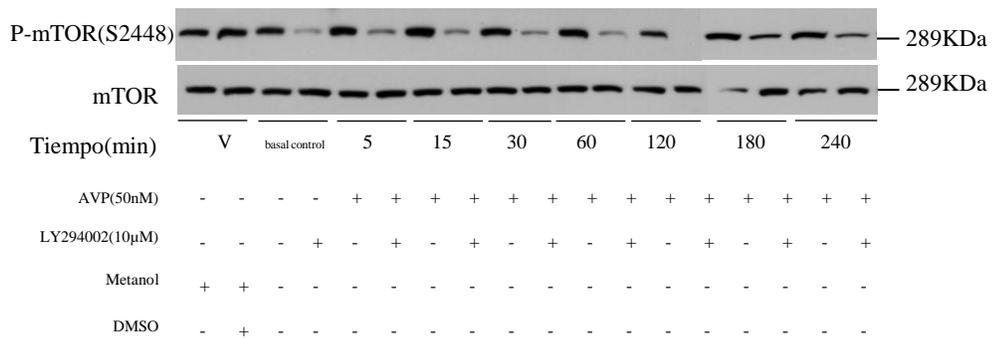
4.1.3 Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de mTOR inducida por AVP (50 nM).

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió investigar si la inhibición de PI3K, que disminuye la activación de AKT/PKB, una proteína involucrada dentro de la vía clásica de activación de mTOR río arriba, también ejerce algún tipo de efecto sobre la fosforilación de mTOR. Para visualizar el efecto de este inhibidor sobre la fosforilación de mTOR, células A-10 fueron estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos, previo a la inhibición con LY294002, durante 30 minutos.

Se observa claramente en la *figura 4.5*, que la inhibición de PI3K produce una disminución en la fosforilación de mTOR en los distintos tiempos de activación. Sin embargo, AVP es capaz de inducir la fosforilación de mTOR, aún en presencia del inhibidor LY294002. La inhibición de la fosforilación de mTOR al inhibir PI3K no es tan fuerte como la que produce sobre AKT, sin embargo, aún en presencia del inhibidor, AVP es capaz de inducir la activación de mTOR, sin lograr el máximo de estimulación con respecto al control sin inhibidor. Por otra parte, esta inhibición se ve aún más atenuada por AVP entre los 180 y 240 minutos.

Si bien se observa un aumento de 1,4 veces a los 180 minutos con respecto al basal en la fosforilación de mTOR inducido por AVP, este aumento es producto del cambio en el lote del suero empleado en el cultivo celular, ya que mTOR al ser altamente sensible a la cantidad de nutrientes del medio, aumenta su fosforilación aún en presencia del medio de cultivo DMEM LG (observar *figura 4.1*, en donde no se observan cambios con respecto al basal en la cinética de células A-10 LG con estímulo AVP).

a)



Cinética de células A-10 LG con estímulo AVP(50 nM), previa inhibición con LY294002(10µM).

b)

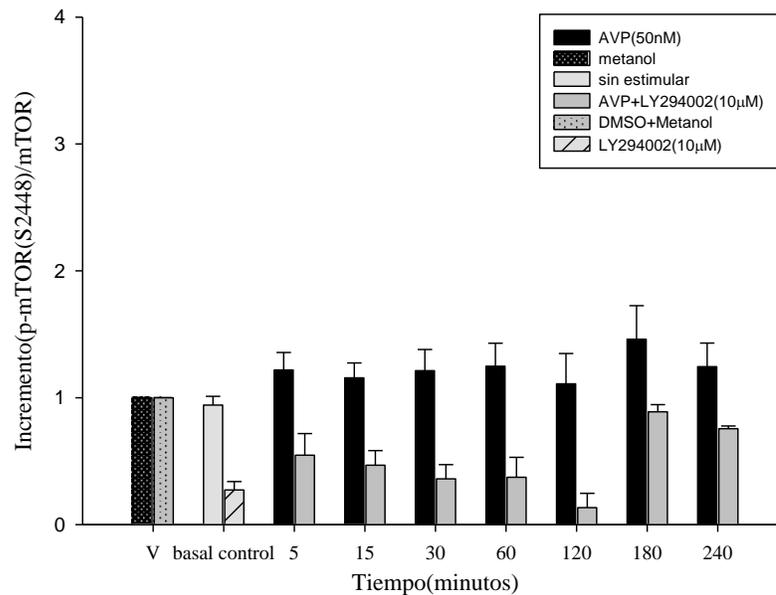


Figura 4.5: Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en presencia del inhibidor LY294002, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG (a) Células A-10 fueron pre-incubadas con LY294002 (10µM) durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos, (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-mTOR(S2448)/mTOR utilizando el programa UN-Scan-IT. Los datos se encuentran expresando en base al incremento con respecto al basal (n=3) (control: Tratamiento con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos).

4.1.4 Efecto de la activación de ERK1/2, inducida por AVP.

Todas las células eucariotas coordinan el crecimiento de las células con la disponibilidad de nutrientes en su medio ambiente. mTOR ha surgido como un blanco crítico del crecimiento, recibiendo señales estimuladoras de Ras y PI3K río abajo de los factores de crecimiento, así como también de nutrientes, en la forma de aminoácidos, glucosa y la disponibilidad de oxígeno.

Con el fin de evaluar la activación de ERK inducida por AVP y su posible vinculación con la activación de la fosforilación de mTOR, se estudió la fosforilación de ERK1/2 en células A-10 estimuladas con AVP (50 nM) a distintos tiempos de modo tal de poder establecer una correlación entre los resultados anteriormente expuestos.

Se observa en la *figura 4.6*, un rápido aumento en la fosforilación de ERK1/2 de aproximadamente 4 veces con respecto al basal a los 5 minutos y luego disminuye su fosforilación, volviendo a aumentar alrededor de 3 veces con respecto al basal a los 120 minutos, para posteriormente decaer progresivamente en su activación en los tiempos largos de estimulación.

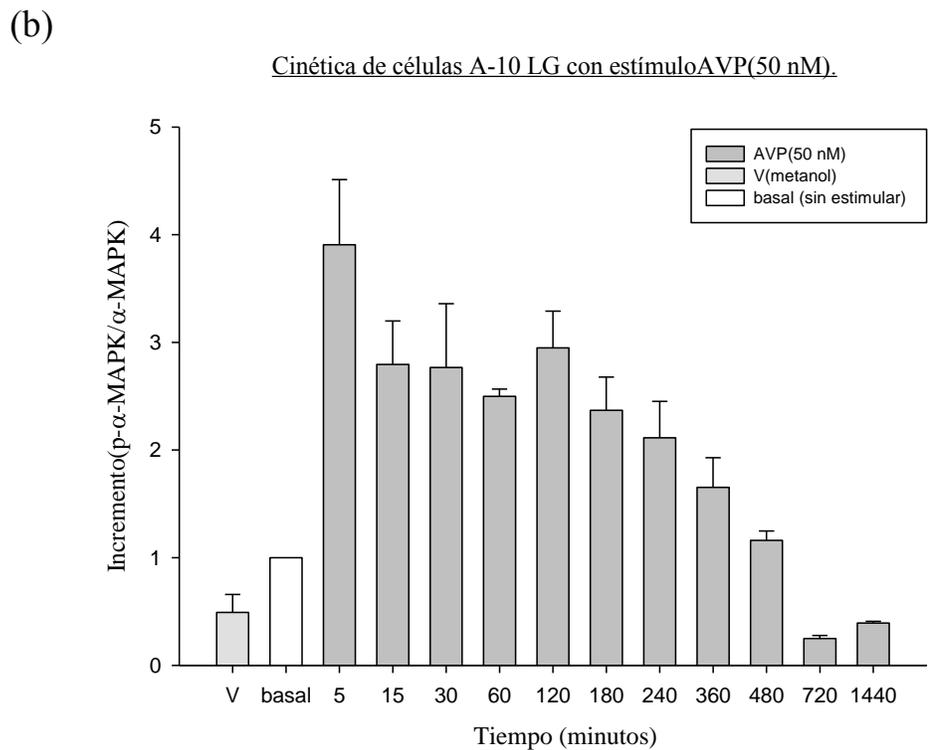
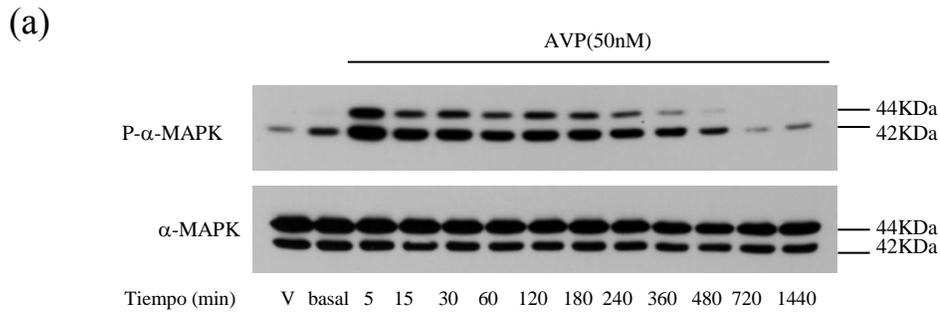


Figura 4.6: AVP induce la activación de p-α-MAPK en tiempos cortos, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM LG (a) Células A-10 fueron estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-α-MAPK con respecto al control. (n=2)

4.2 Determinar el grado de fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa (25 mM) por diferentes tiempos.

4.2.1 Efecto de AVP, sobre la fosforilación de mTOR.

Del mismo modo que investigamos la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas medio DMEM LG, determinamos el espectro de fosforilación de esta proteína cultivada en alta concentración de glucosa durante 10 días para su posterior estimulación con AVP(50 nM).

Podemos observar en la *figura 4.7* un aumento progresivo en la fosforilación de mTOR ya que a los 15 minutos se produce un aumento de 1,5 veces con respecto al basal y luego entre los 180 y 240 minutos, su fosforilación aumenta al doble, alcanzando su máxima fosforilación a los 240 minutos, frente al estímulo con AVP (50 nM).

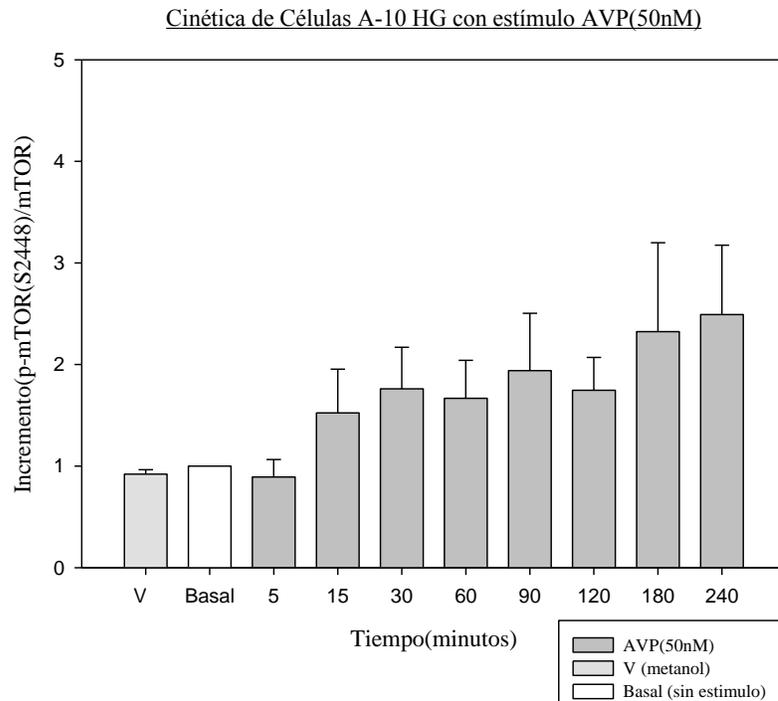
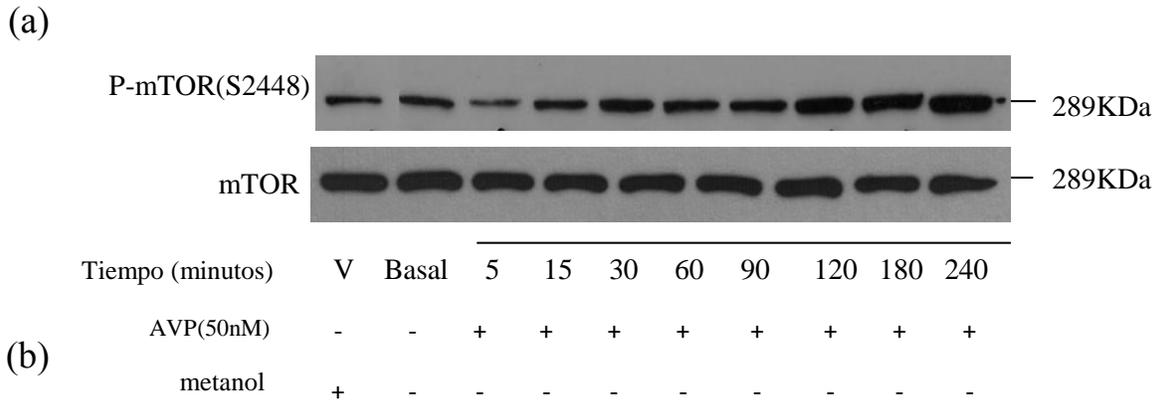


Figura 4.7: Vasopresina induce la fosforilación de mTOR en células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa extracelular. (a) Células A-10 fueron cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días y posteriormente estimuladas con AVP (50 nM) durante 5, 15, 30, 60, 90, 120 o 180 minutos (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento p-mTOR(S2448)/mTOR con el programa UN-SCAN-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto al basal (n=3)

4.2.2 Determinación de la concentración de LY294002 sobre la inhibición de mTOR.

Previo a la realización de experimentos con el inhibidor LY294002, tanto en medio de cultivo DMEM LG y HG, decimos determinar la concentración inhibitoria que podríamos emplear para nuestro modelo celular, en contraste con las concentraciones empleadas en las distintas publicaciones. Para lo cual en base a los experimentos realizados en alta concentración de glucosa, fijamos el tiempo de estímulo de AVP a las 4 horas, ya que es donde vemos el mayor grado de fosforilación de mTOR y variamos la concentración del inhibidor para observar la fosforilación de mTOR en función de la cantidad de inhibidor que empleamos. Independiente de cómo ocurra el efecto del inhibidor sobre su blanco (unión o interacción química), la concentración de éste en el sitio de acción controla su efecto. Sin embargo, la respuesta a la concentración puede ser compleja y a menudo es no lineal. La dosis-respuesta se grafica típicamente como la dosis en función del efecto medido, que en este caso es la disminución en la fosforilación de mTOR, debido a que el efecto del inhibidor es una función de la dosis y del tiempo, dicho gráfico muestra la relación dosis-respuesta independientes del tiempo. Sin embargo, no se graficó la curva dosis-respuesta típica, ya que no logramos alcanzar el máximo de inhibición con la concentración stock de nuestro inhibidor, razón por lo cual realizamos un gráfico de barras para mostrar el efecto sobre la fosforilación de mTOR, tal y como se puede apreciar en la *figura 4.8*, donde en nuestro modelo experimental, la concentración donde mejor podemos apreciar una disminución en la activación de mTOR es empleando una concentración 10 μ M del inhibidor LY294002, ya que disminuye cerca del 50% del incremento con respecto al basal, lo cual concuerda con las concentraciones que mayoritariamente se emplean en las publicaciones actuales.

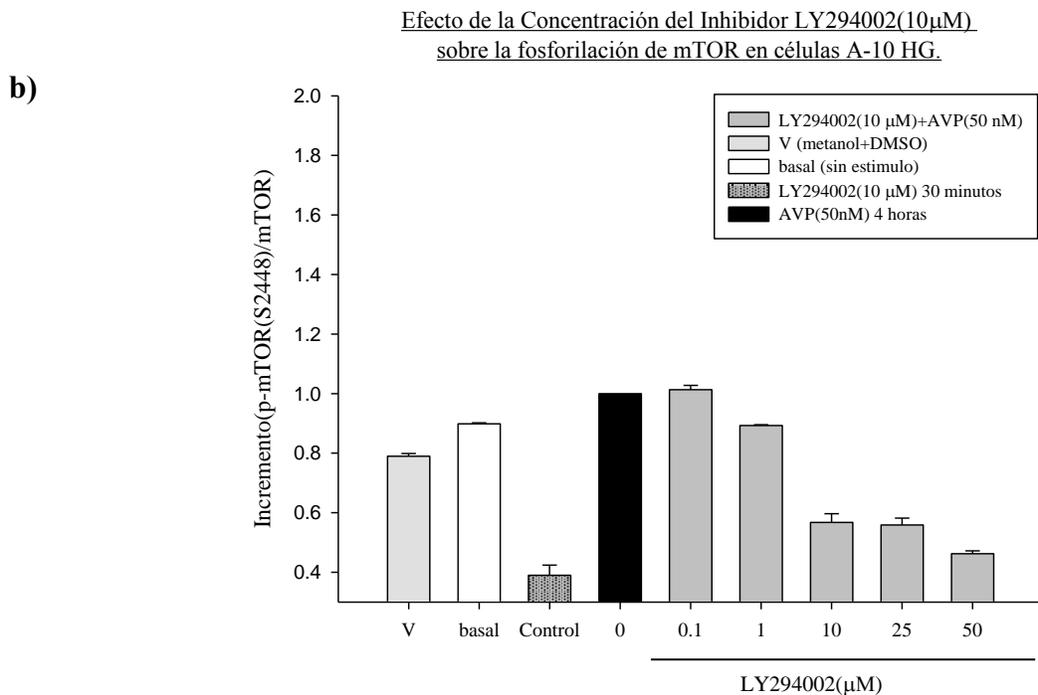
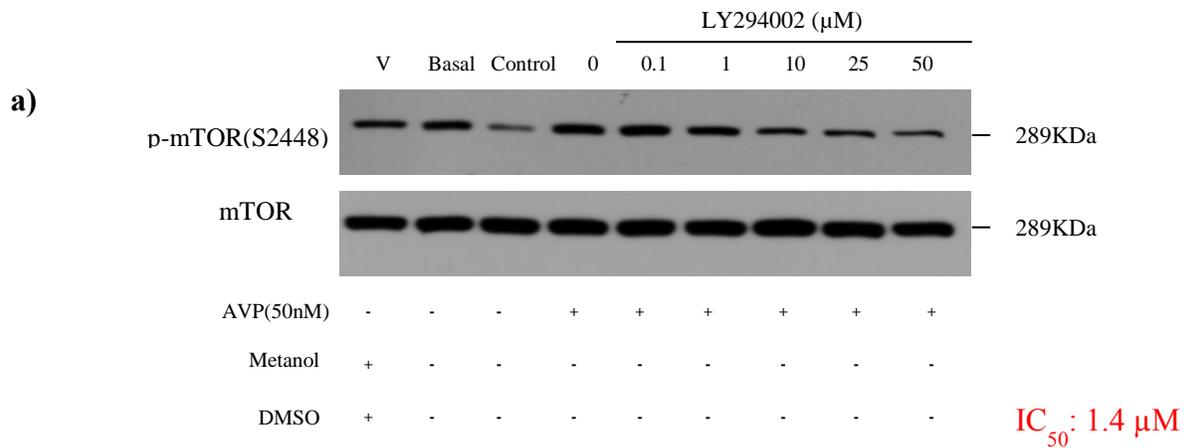


Figura 4.8: Efecto de la concentración del Inhibidor LY294002 sobre la fosforilación de mTOR en células A-10, cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días. (a) Células A-10 fueron pre-incubadas con el inhibidor LY294002 en concentraciones ascendentes de 0, 0.1, 1, 10, 25 y 50 μ M durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con AVP (50 nM) durante 4 horas (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento p-mTOR(S2448)/mTOR con el programa UN-SCAN-IT. Los datos se encuentran expresados en base al incremento con respecto a la placa estimulada sólo con AVP (50 nM) durante 4 horas (n=3).

4.2.3 Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de AKT/PKB inducida por AVP.

Utilizando células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa, determinamos el espectro de fosforilación de AKT/PKB frente al estímulo con AVP y la respuesta de esta proteína frente a la inhibición con el inhibidor LY294002 10 μ M. Como se puede apreciar en la *figura 4.9*, observamos un máximo de fosforilación a los 5 minutos con un aumento de 1,9 veces con estímulo AVP, sin embargo la utilización del inhibidor previo al estímulo hormonal, produce una dramática desaparición en la fosforilación de AKT (S473) entre los 5 minutos y los 60 minutos, para posteriormente comenzar a aparecer tenuemente fosforilada, sin lograr superar la fosforilación del control, con un máximo a los 360 minutos.

Cabe destacar que en todos los tiempos de activación de AKT en respuesta a AVP, se encuentra más fosforilada con respecto al control en células cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días (*figura 4.9*) que en medio DMEM LG (*figura 4.4*).

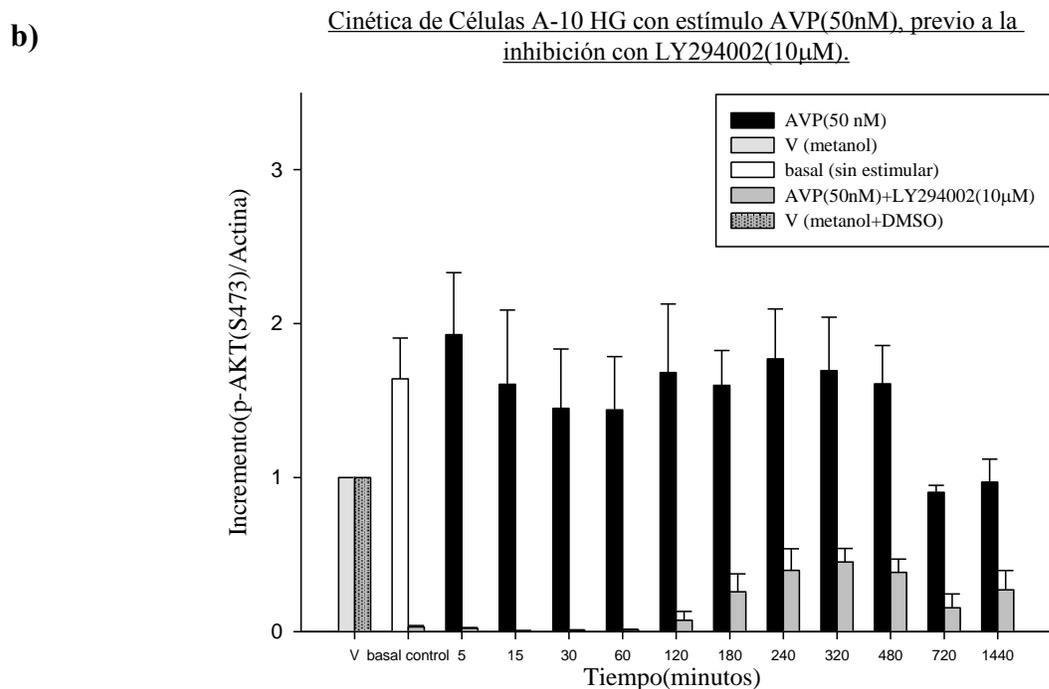
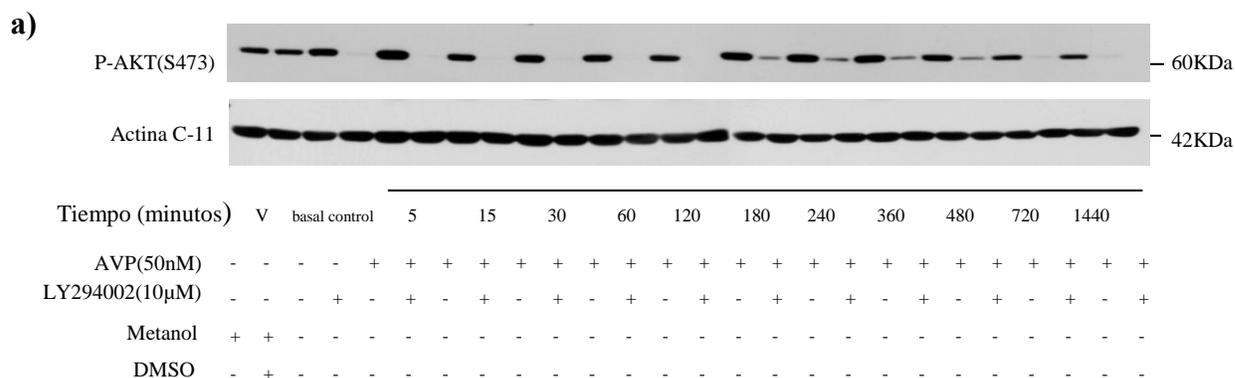


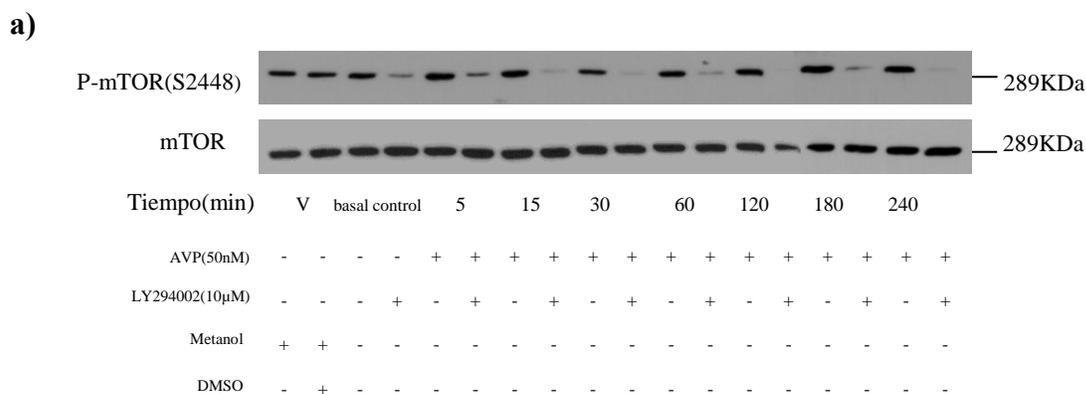
Figura 4.9: Efecto del Inhibidor LY294002 (10 µM) sobre la activación de p-AKT(S473), inducida por AVP (50 nM) en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG (25 mM) durante 10 días. (a) Células A-10 fueron pre-incubadas con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-AKT(S473) con respecto al vehículo (n=3) (control: Tratamiento con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos).

4.2.4 Efecto de la inhibición de PI3K en la fosforilación de mTOR inducida por AVP (50 nM).

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió investigar si la inhibición de PI3K, que disminuye la activación de AKT/PKB, una proteína involucrada dentro de la vía clásica de activación de mTOR río arriba, también ejerce algún tipo de efecto sobre la fosforilación de mTOR, al igual que en el medio de cultivo DMEM LG. Para visualizar el efecto de éste inhibidor sobre la fosforilación de mTOR, células A-10 fueron estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos, previo a la inhibición con LY294002, durante 30 minutos.

En la *figura 4.10* se observa claramente que la inhibición de PI3K produce una disminución en la fosforilación de mTOR en los distintos tiempos de activación. Sin embargo, AVP es capaz de inducir la fosforilación de mTOR, aún en presencia del inhibidor LY294002, sin alcanzar el nivel basal de activación. La inhibición de la fosforilación de mTOR con inhibir PI3K no es tan fuerte como la que produce sobre AKT, sin embargo, aún en presencia del inhibidor, AVP es capaz de inducir ligeramente la activación de mTOR, a los 5 minutos sin lograr el máximo de estimulación con respecto al control sin inhibidor. Por otra parte, esta inhibición se ve aún más atenuada por AVP entre los 120 y 240 minutos.

Si bien se observa un aumento de 1,9 veces a los 180 minutos con respecto al basal en la fosforilación de mTOR inducido por AVP, este aumento es producto del cambio en el lote del suero empleado en el cultivo celular, ya que mTOR al ser altamente sensible a la cantidad de nutrientes del medio, aumenta su fosforilación aún en presencia del medio de cultivo DMEM HG (observar *figura 4.7*, donde no se observan cambios con respecto al basal en la cinética de células A-10 HG con estímulo AVP).



b) Cinética de Células A-10 HG con estímulo AVP(50nM), previa inhibición con LY29400(10µM).

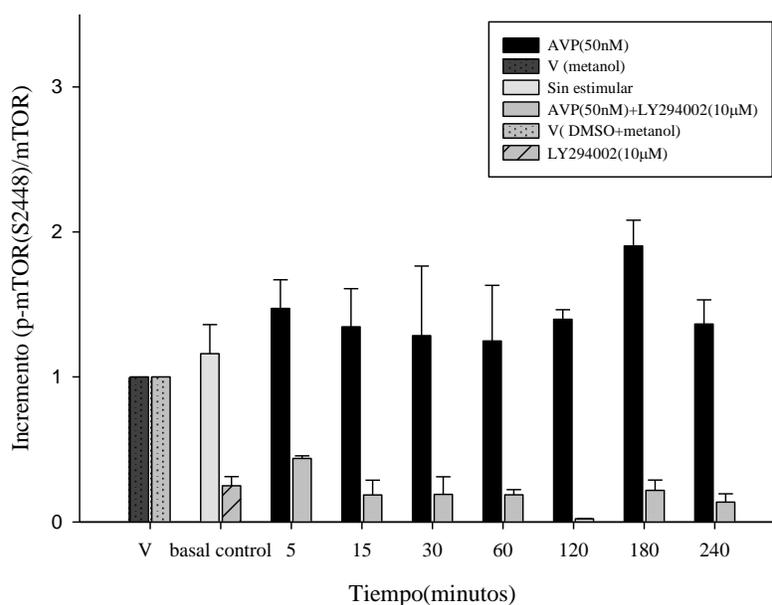


Figura 4.10: Vasopresina no induce la fosforilación de mTOR en presencia del inhibidor LY294002, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG (a) Células A-10 fueron cultivadas durante 10 días en alta glucosa. Previo a la estimulación con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180 o 240 minutos, las células fueron incubadas con LY294002 (10µM) durante 30 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-mTOR(S2448)/mTOR utilizando el programa UN-Scan-IT. Los datos se encuentran expresando en base al incremento con respecto al basal (n=2) (control: Tratamiento con LY294002 (10 µM) durante 30 minutos).

4.2.5 Efecto de activación de mTOR en la inhibición de la Autofagia

La disminución dramática de energía y nutrientes disponibles, conocido como *Starvation*, produce la activación de autofagia en las células eucariotas mediante la inhibición de mTOR, que juega un papel clave en la interfaz de las vías que regulan el equilibrio entre el crecimiento celular y la autofagia en respuesta al estado nutricional, factores de crecimiento y las señales de estrés.

La autofagia es el proceso responsable de la degradación del material intracelular, donde los componentes citoplasmáticos son secuestrados por membranas formando los autofagosomas que se fusionan a lisosomas para su degradación.

LC3 es un constituyente principal de los autofagosomas y durante la autofagia, la forma citoplásmica de esta proteína (LC3 I) es procesada y reclutada a los autofagosomas, donde se genera LC3 II por proteólisis sitio específico y lipidación cerca del extremo C-terminal. La característica distintiva de activación autofagia es la formación celular de autofagosomas que contienen LC3 II, por lo tanto la actividad autofágica se mide bioquímicamente como la cantidad de LC3 II que se acumula, razón por la cuál y dada la activación de mTOR inducida por AVP en alta concentración de glucosa, determinamos si la activación de mTOR, causa la inhibición de la autofagia, a través de la determinación de la razón LC3I/II.

Las células A-10 fueron estimuladas con AVP durante distintos tiempo, observándose que entre el período de tiempo comprendido entre los 60 minutos y los 240 minutos, la cantidad de LC3II disminuye notoriamente con respecto a LC3I, observándose una desaparición significativa a los 60 minutos (casi 11 veces), en donde la autofagia se inhibe y mTOR se encuentra activo, tal como se muestra en la *figura 4.11*.

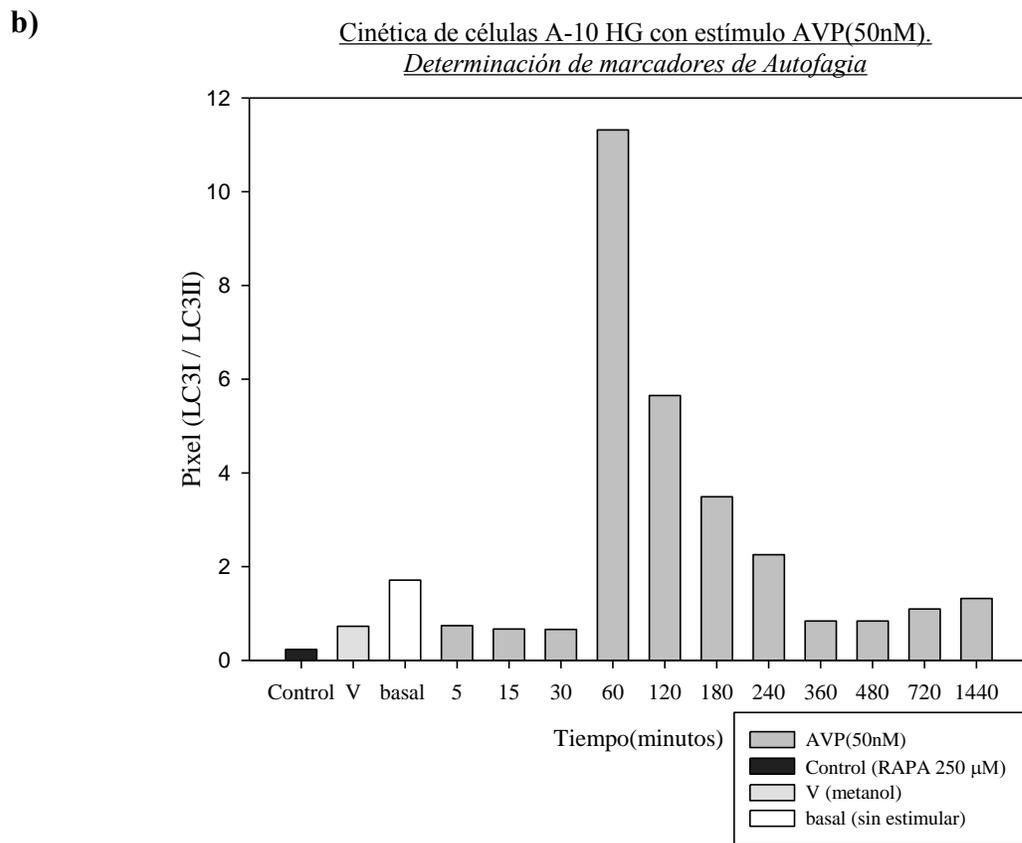
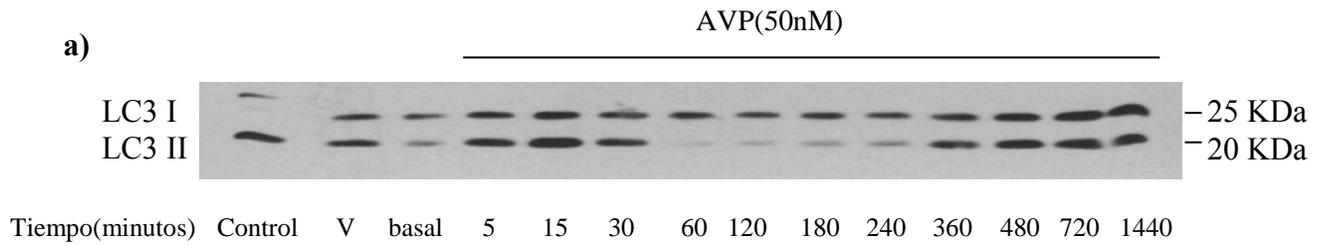


Figura 4.11: La activación de mTOR, inducida por AVP (50 nM) en células A-10, cultivadas en medio DMEM HG durante 10 días, inhibe la activación de Autofagia. (a) Células A-10 fueron estimuladas con AVP durante 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720 o 1440 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes la razón de LC3I/LC3II, con el programa UN-SCAN-IT (n=1) (control: tratamiento con RAPA 250 μ M)

4.2.6 Efecto de los distintos inhibidores sobre la activación de mTOR.

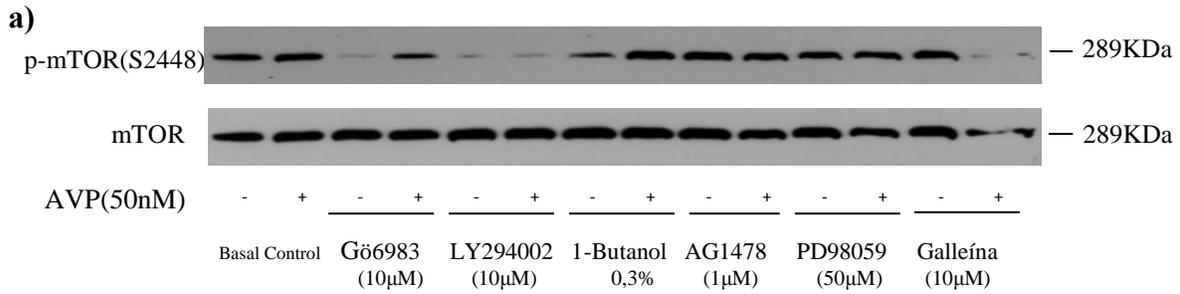
Células A-10 fueron cultivadas en alta concentración de glucosa durante 10 días para su posterior estimulación con AVP. En base a los experimentos realizados en alta concentración de glucosa, fijamos el tiempo de estímulo de AVP a las 4 horas, puesto que es aquel tiempo donde se observa el mayor grado de fosforilación de mTOR y analizamos el efecto que distintos inhibidores farmacológicos de posibles vías en la fosforilación de mTOR. Como se muestra en la *figura 4.12*, la utilización del inhibidor de PKCs, Gö6983, disminuye la fosforilación de mTOR, sin embargo, AVP produce un incremento en la fosforilación de mTOR aún en presencia de éste inhibidor, sin alcanzar el nivel del control.

La utilización del inhibidor de PI3K, LY294002, produce la inhibición de mTOR de manera irreversible, puesto que AVP no es capaz de inducir la fosforilación de mTOR en presencia de éste inhibidor.

La inhibición de la actividad de la PLD, con 1-butanol, es capaz de producir una reducción considerable de la actividad de mTOR durante 15 minutos de tratamiento, probablemente al disminuir la producción de PA. Sin embargo, AVP es capaz de inducir nuevamente la fosforilación de mTOR.

La transactivación del receptor de EGF puede ser inhibida con el compuesto AG1478, que inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor, sin embargo tanto el control como la estimulación con AVP no producen cambios en la fosforilación de mTOR. Descartando la posibilidad que el efecto de AVP se deba a la transactivación del EGFR.

La inhibición de MEK con PD98059, no produce cambios en la fosforilación de mTOR, aún en presencia del inhibidor, al igual que la inhibición de subunidad $G_{\beta\gamma}$, con galleína. A pesar de que el gráfico de la *figura 4.12* muestra diferencias para las placas tratadas con galleína, esta diferencia es sólo virtual, debido a falla en la transferencia en el borde derecho. Hecho que fue constatado al correr muestras tratadas con galleína en otro gel, en donde no se aprecia diferencias entre células pre-incubadas con galleína y posteriormente estimuladas con AVP (50 nM) durante 4 horas y células sólo tratadas con éste inhibidor (el gel y gráfico no se ha incluido dentro de la tesis).



Efecto de inhibidores en la fosforilación de mTOR, inducida por AVP(50nM) durante 4 horas.

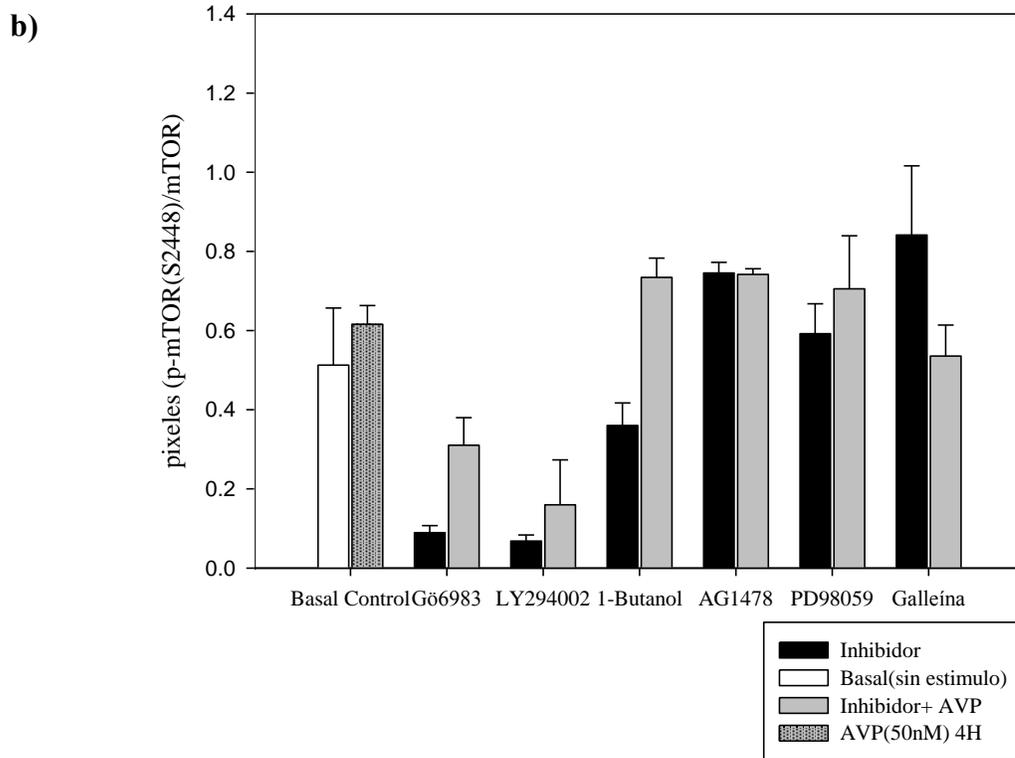


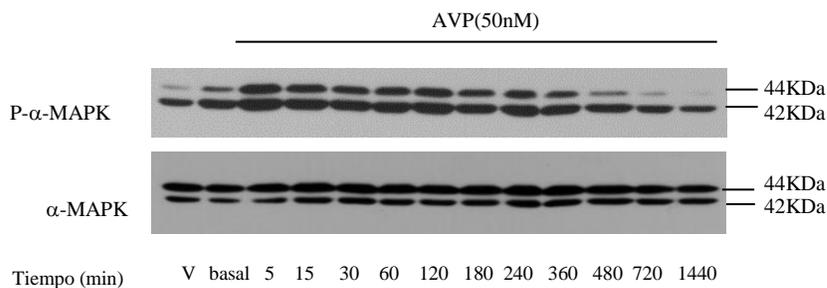
Figura 4.12: Efecto de los distintos inhibidores en la fosforilación de mTOR, inducida por AVP (50 nM) durante 4H en DMEM HG (a) Células A-10 fueron cultivadas durante 10 días en alta concentración de glucosa. Previo a la estimulación con AVP durante 4 horas, las células fueron tratadas con distintos inhibidores (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes la razón entre de p-mTOR(S2448)/mTOR con respecto al basal (n=4)

4.2.7 Efecto de la activación de ERK1/2, inducida por AVP

Con el fin de evaluar la activación de ERK inducida por AVP y su posible vinculación con activación de la fosforilación de mTOR en alta concentración de glucosa, se estudió el aumento de la fosforilación de ERK1/2 en células A-10 estimuladas con AVP (50 nM) a distintos tiempos de modo tal de poder establecer una correlación entre los resultados anteriormente expuestos.

Se observa en la figura 4.13, un aumento a los 5 minutos en la fosforilación de ERK1/2 de aproximadamente el doble respecto al basal y luego disminuye, volviendo a aumentar alrededor de los 120 minutos en aproximadamente 2,3 veces, para posteriormente decaer progresivamente en su activación en los tiempos largos de estimulación.

a)



b)

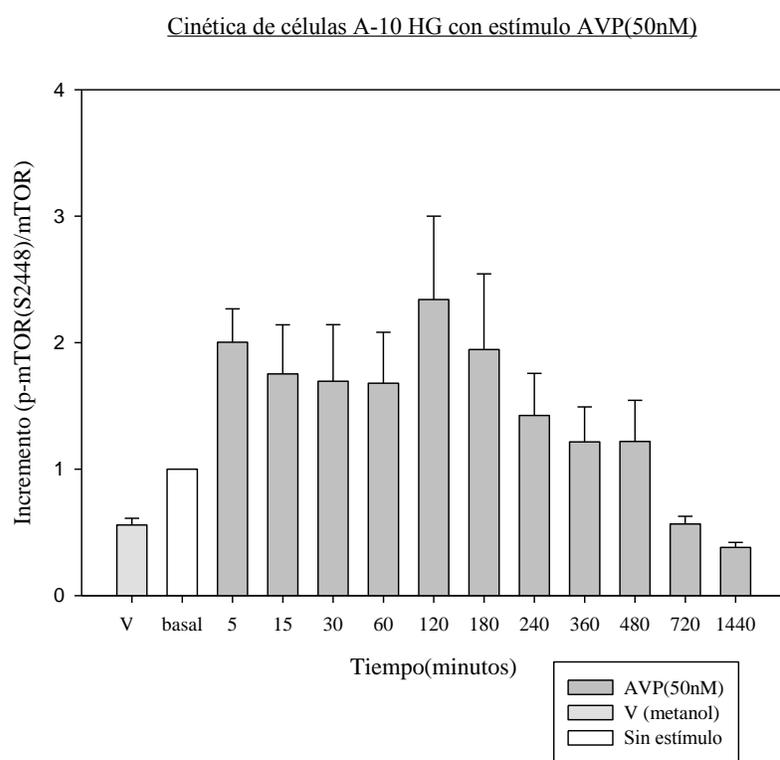


Figura 4.13: AVP induce la activación de p-α-MAPK, en células A-10 cultivadas en medio de cultivo DMEM HG (a) Células A-10 fueron estimuladas con AVP (50 nM) durante 5, 15, 30, 60, 120,180,240,360,480,720 o 1440 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes al incremento de p-α-MAPK con respecto al basal (n=3).

4.3 Determinar el grado de fosforilación de mTOR en células A-10 incubadas con alta concentración de glucosa (25 mM)

Finalmente para evaluar si el medio de cultivo participa en el cambio del perfil de fosforilación de mTOR, como sensor de nutrientes y energía, por sobre el estímulo hormonal que produce AVP, es que estimulamos durante 15, 30, 60, 360, 720, 1440, 2880 o 4320 minutos a células A-10 cultivadas en medio DMEM LG con glucosa 25mM. Además, se decidió realizar tiempos largos de incubación para evaluar si dependiendo del tiempo sometido a este tratamiento se produce o no un cambio significativo. No obstante, como se puede apreciar en la *figura 4.14* el perfil de fosforilación en los distintos tiempos de activación no varía mucho respecto al control, observándose un ligero aumento alrededor de las 24 hrs.

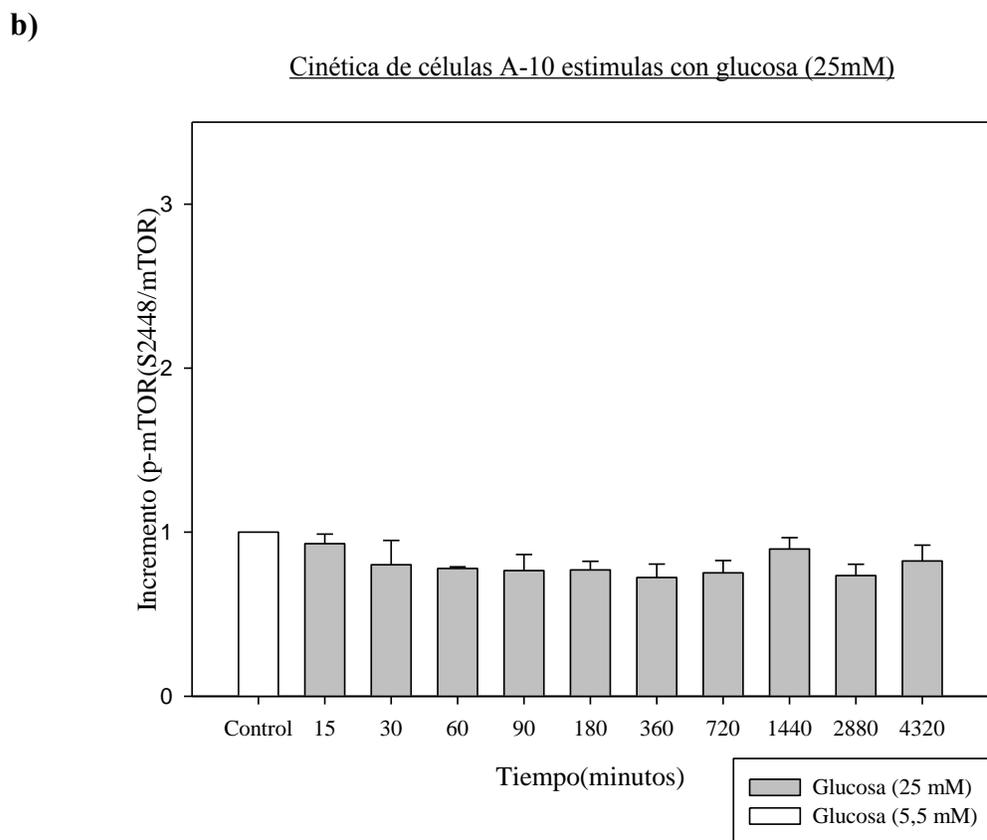
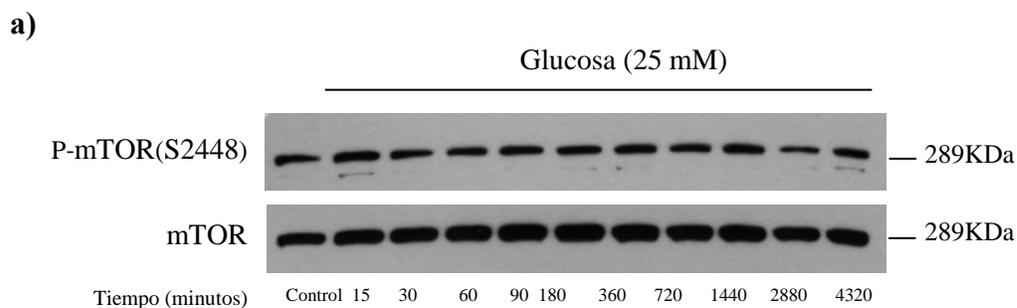


Figura 4.14: Cinética de Células A-10 incubadas en alta concentración de glucosa (25 mM) (a) Células A-10 fueron cultivadas en medio DMEM LG, para posteriormente ser estimuladas con glucosa 25 mM, empleando medio de cultivo DMEM HG 25 mM durante 15, 30, 60, 180, 360, 720, 1440, 2880 o 4320 minutos. (b) Análisis densitométrico de las bandas de p-mTOR(S2448) graficadas en base al control que contiene glucosa (5,5 mM) (medio DMEM LG 5,5 mM) (n=3)

5. DISCUSIÓN

mTOR juega un rol fundamental en la síntesis de proteínas y la proliferación celular. En este estudio nos propusimos investigar los efectos de la exposición crónica a niveles elevados de glucosa en VSMC y el efecto que AVP produce sobre mTOR bajo estas condiciones. A su vez, exploramos si la vía PI3K y la vía MAPK participan en la vía de activación de mTOR inducida por AVP en células cultivadas en alta concentración de glucosa.

Resultados obtenidos por *Western blotting* mostraron que en células cultivadas en alta concentración de glucosa (25 mM), se produce un aumento de la activación de mTOR en respuesta a AVP. Sin embargo, la incubación de las células en alta concentración de glucosa por si sola, no es capaz de inducir la activación de mTOR, indicando que AVP promueve cambios en el estado de fosforilación de mTOR dependiente de la concentración extracelular de glucosa, puesto que bajo condiciones de glucosa normal, AVP no fue capaz de inducir la fosforilación de mTOR.

En nuestro estudio, pudimos observar que células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa durante 10 días y posterior estímulo con AVP, se produjo un aumento en la fosforilación de AKT/PKB. En cambio bajo condiciones de glucosa normal, se observó sólo una ligera activación AKT/PKB en respuesta a AVP. Sin embargo, AVP no fue capaz de inducir la activación de mTOR cuando se inhibió PI3K con LY294002, tanto en alta glucosa extracelular como en glucosa normal.

Un estudio realizado en células musculares lisas aisladas de aorta de cerdo expuestas durante 24 horas a alta concentración de glucosa (25 mM), mostró que hay un incremento en la fosforilación

de AKT/PKB comparado con 5 mM glucosa. A su vez, al igual que nuestro modelo experimental, cultivaron a las VSMC durante 10 días bajo alta concentración de glucosa y observaron un aumento significativo en la fosforilación de esta quinasa. Del mismo modo pudieron observar un aumento de la fosforilación de ERK1/2 (Campbell et al., 2003). Por lo tanto, AVP y alta concentración de glucosa (25 mM), producen un efecto sumatorio sobre la activación de AKT/PKB, activando a mTOR.

Se ha visto que la alta concentración de glucosa afecta VSMC, alterando la proliferación en la capa media arterial, característica clave en las lesiones ateroscleróticas, observándose una hiperproliferación de este tipo celular. Existen evidencias que sugieren que las especies reactivas de oxígeno participarían en la proliferación de VSMC (Sharpe et al., 1998), puesto que muchas investigaciones apuntan al estrés oxidativo, como un factor clave en el desarrollo de las anormalidades vasculares en pacientes diabéticos (Peiro et al., 2001). Las especies reactivas de oxígeno participan como segundos mensajeros en la transducción de señales mitogénicas, en donde el H₂O₂ incrementa la fosforilación de receptores de tirosina quinasa en ausencia de la unión de factores de crecimiento, de ese modo induce la activación río abajo de otras proteínas, entre ellas PI3K y AKT, promoviendo la supervivencia celular y la proliferación (Radisavljevic and Gonzalez-Flecha, 2004). La glucosa en una concentración fisiológica elevada, activa fuertemente a mTOR, tanto en roedores como en los islotes pancreáticos humanos aislados. Sin embargo, mTOR puede ser activado por nutrientes independientes de la insulina y otros factores de crecimiento (Kwon et al., 2004), lo cual indica que existen otros factores que son capaces de inducir su activación, entre los cuales se encuentran las ROS. *Shaw y Cohen* (1998) vieron en células HEK292 que las isoformas de AKT/PKB se activan cuando éstas son expuestas a estrés oxidativo (H₂O₂). Asimismo mostraron que esta activación es completamente inhibida por

inhibidores de PI3K (LY294002 y Wortmanina) (Shaw et al., 1998). Lo cual concuerda con nuestros datos, puesto que si bien en las células A-10 cultivadas en alta concentración de glucosa se produce un leve aumento en la fosforilación de AKT/PKB y mTOR, tal vez a raíz del estrés oxidativo inducido por la alta concentración de glucosa, la estimulación con AVP, produce un incremento significativo en la fosforilación de estas proteínas, la cual es inhibida por LY294002, sugiriendo la participación de AKT/PKB en la fosforilación de mTOR. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, el estímulo de glucosa en ausencia de AVP no produce cambios en el estado de activación de mTOR sobre su nivel de activación basal durante un periodo de 72 horas de exposición, lo cual indica que la exposición crónica a elevados niveles de glucosa son requeridos para producir cambios en el estado de fosforilación de esta proteína en respuesta a AVP. En un primera etapa, las células como mecanismo de defensa frente al estrés producido por los elevados niveles de glucosa utiliza sus antioxidantes endógenos para protegerse contra el ataque de las especies reactivas del oxígeno, entre los cuales se incluyen a las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX) (Sharpe et al., 1998; Chong and Maiese, 2012). Además, existe un componente antioxidante no-enzimático de la fase acuosa, que tal vez es el protector más importante y versátil; el glutatión, en donde su reducción ha sido descrita en el plasma, eritrocitos, leucocitos y plaqueta provenientes de pacientes con diabetes mellitus (Sharpe et al., 1998). Sharpe y sus colaboradores (1998) mostraron que en VSMC provenientes de aorta de cerdo cultivadas durante 10 días en alta concentración de glucosa (25 mM), la concentración intracelular de glutatión disminuye en aproximadamente un 50% en comparación con células cultivadas en un medio conteniendo 5 mM glucosa, mientras que la concentración de SOD se incrementa, lo cual explica en parte el aumento intracelular de H₂O₂. Asimismo, observaron que a partir del sexto día de incubación de estas células tanto en

baja como en alta concentración de glucosa, mientras que el número de células comienza a aumentar significativamente cuando se encuentran cultivadas en alta concentración de glucosa, revelando que una exposición prolongada con un mínimo de 4 días de exposición es requerida para un incremento en el número de células (Sharpe et al., 1998).

La progresión de la enfermedad vascular está gobernada por el equilibrio entre la proliferación de las VSMC y la muerte celular. Sumado el hecho de que la hiperglicemia puede potenciar el proceso de formación de las lesiones macrovasculares a través de la inhibición de la apoptosis de VSMC. Además, numerosos estudios han demostrado que los vasos pueden adaptarse a los cambios crónicos en el flujo de sangre al someterse a ajustes compensatorios en el tamaño del lumen vascular (Kumar and Lindner, 1997).

El tratamiento con el inhibidor específico para PI3K, LY294002 (10 μ M), mostró que AVP activa a mTOR en forma dependiente de PI3K en células cultivadas en altas concentraciones de glucosa. Esto se ve apoyado por el hecho que AVP aumentó la fosforilación de AKT/PKB (vía PI3K) en células cultivadas en alta concentración de glucosa. Por otra parte, la inhibición de PKC, en células expuestas a alta glucosa (25 mM), atenuó la fosforilación de mTOR en respuesta a AVP, indicando la participación de PKC en el mecanismo de fosforilación de mTOR inducido por AVP.

El mecanismo prototipo en la regulación de la activación de mTOR por las señales mitogénicas es la vía de señalización PI3K/AKT. PI3K puede ser activada a través de la unión de factores de crecimiento, la activación de GPCR, así como por oncogenes como Ras. Una vez activada, PI3K fosforila fosfoinositoles, generando lípidos biológicamente activos, Ptds(3,4)P2 y Ptds(3,4,5)P3; siendo este último el cual se une al dominio PH de AKT, promoviendo su translocación a la

membrana celular. Una vez en la posición correcta en la membrana, AKT puede ser fosforilada por PDK1 en el residuo Thr308 y la fosforilación del residuo Ser473 es llevada a cabo por mTORC2 tanto *in vitro* como *in vivo*, indicando que mTOR puede actuar tanto como sustrato o efector de AKT (Memmott and Dennis, 2009). La fosforilación de ambos residuos es requerida para la activación completa de AKT (Hay and Sonenberg, 2004). mTOR posee 2 sitios adyacentes de fosforilación (Thr2446 y S2448) que son fosforilados por AKT, observándose tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha sugerido que la fosforilación directa de AKT en el residuo S2448 de mTOR se correlaciona con la activación de mTORC1 (Manning and Cantley, 2007). Esto explica por qué el tratamiento previo de células A-10 con el inhibidor de PI3K (LY294002) que controla a AKT, disminuyó la fosforilación de mTOR en el residuo S2448. Por otra parte, AKT tanto *in vivo* como *in vitro*, es capaz de fosforilar directamente a TSC2 en los residuos de Ser939 y Thr1462. Análisis de células deficientes de TSC2, así como la sobre-expresión de TSC1 y TSC2, claramente demostraron que el heterodímero TSC1/TSC2 es un regulador negativo río arriba de mTOR. Mutantes de TSC2 en los cuales los sitios de fosforilación de AKT fueron sustituidos por alanina actúan como un inhibidor dominante de la actividad de mTOR, bloqueando su activación en respuesta a factores de crecimiento. Las observaciones descritas proveen evidencia que AKT activa a mTOR, al menos en parte a través de la fosforilación e inactivación de TSC2 (Hay and Sonenberg, 2004). Por lo tanto, la inhibición de PI3K juega un rol importante en la disminución de la activación de mTOR debido a que la inactivación de AKT, libera la inhibición que ésta proteína produce sobre TSC1/2, activándola e induciendo una disminución en la activación de mTOR, tal como pudimos demostrar tanto en alta como en baja concentración glucosa.

La unión de AVP a los receptores V_{1a} promueve la activación de fosfolipasa C (PLC) mediante la activación de la proteína $G_{q/11}$, con el consiguiente aumento de los segundos mensajeros: inositol trifosfato (PIP3) y DAG (Birnbaumer, 2000; Rozengurt, 2007). Mientras que, PIP3 se une a receptores intracelulares presentes en el retículo endoplasmático, promoviendo la movilización de calcio desde el RE hacia el citosol. DAG activa a las distintas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), clásicas (α , β , γ) y nuevas (δ , ϵ , ζ). Al mismo tiempo se ha reportado que altas concentraciones extracelulares de glucosa conducen a alteraciones de los mecanismos que regulan las vías de señalización implicadas en la regulación del tono vascular y en la proliferación celular, pudiendo contribuir a las complicaciones vasculares asociada a Diabetes Mellitus. Se ha descrito que, tanto células endoteliales, como células musculares lisas mantenidas en altas concentraciones de glucosa, presentan un aumento en los niveles de DAG, lo que se traduce en un aumento en la actividad de la PKC (Inoguchi et al., 1992; Williams et al., 1997).

Este trabajo sugiere que existen mecanismos dependientes e independientes de PI3K que modulan la fosforilación de mTOR, en el cual participa vasopresina, puesto que la inhibición de PKC disminuyó dramáticamente la fosforilación de mTOR; sin embargo, la inhibición de la PI3K produce una inhibición irreversible de su fosforilación aún bajo el estímulo de vasopresina. Posiblemente la proteína río abajo involucrada tanto directa como indirectamente en la activación y/o inhibición de mTOR es el complejo TSC1/2. Andrew R. Tee y colaboradores (2003) mostraron en células HEK293E que la vía de señalización PI3K/AKT inhibe al complejo TSC1/2, puesto que la activación de AKT produce la fosforilación de TSC2 en los residuos de Ser939 y Thr1462. Curiosamente, la fosforilación de estos sitios también se produce tras la activación de la vía de señalización PKC/MAPK, previa inhibición de la vía PI3K, inactivando la función supresora que ejerce el TSC1/2 sobre la activación de mTOR. Proponemos un modelo en

el que tanto las vías de señalización PI3K/AKT y PKC/MAPK convergen de manera independiente en el complejo TSC1/2. Esta proposición es apoyada por el hecho que la mutación en los sitios de TSC2 (tuberina) (S939A/T1462A), que normalmente son fosforilados por Akt, inhiben la activación de S6K1 a través de mTOR la cual es mediada por PKC/MAPK (Tee et al., 2003). Este antecedente respalda nuestros resultados, ya que AVP induce la activación de PKC, induciendo probablemente la inhibición de TSC2 al igual que AKT y promoviendo la activación de mTOR a través de vías independientes. Sin embargo, la inhibición de PI3K reduce significativamente la activación de mTOR con o sin AVP, indicando que ésta quinasa es la principal vía de activación de mTOR.

Otro componente que podría participar dentro de la vía de activación de mTOR es el ácido fosfatídico (PA). El PA ha sido implicado como un mediador de la acción mitogénica de varios factores de crecimiento y hormonas en distintos tipos de mamíferos (Parmentier et al., 2006). La estimulación mitogénica conduce a un aumento en la cantidad de PA como resultado de la activación de la fosfolipasa D (PLD). Sin embargo, la activación de ERK1/2 y AKT no es afectada por la inhibición de la PLD con 1-butanol, un alcohol primario que es comúnmente utilizado como sustrato para medir la actividad de esta enzima, bajo las mismas condiciones (Fang et al., 2001).

Se ha demostrado que el tratamiento con PA exógeno, produce un aumento en la actividad de mTORC1 y la inhibición en su producción con 1-butanol, reprime la actividad de esta quinasa (Bai and Jiang, 2010). Se han propuesto 2 mecanismos que pueden mediar el efecto de PA sobre mTORC1. Recientemente se reportó que el PA es capaz de reducir la asociación de FKBP38 con mTOR (Sun and Chen, 2008). Por otra parte, se ha visto que la supresión en la producción de PA,

bloquea la asociación de mTOR con Raptor, sugiriendo que la asociación de PA es requerida para mantener la integridad de mTORC1 (Toschi et al., 2009), razón que podría explicar por qué el tratamiento control durante 15 minutos con 1-butanol disminuye la actividad de mTOR. Por otra parte, el estímulo con AVP durante 4 horas es capaz de activar a mTOR nuevamente en células tratadas con 1-butanol, lo que descarta la participación de PLD en la activación de mTOR inducida por AVP. El mecanismo a través del cual este proceso de activación podría ser, más bien, dependiente de la producción de DAG, inducida por AVP. A pesar de la inhibición de la PLD, con la subsecuente disminución del PA, existen 2 enzimas capaces de producir PA: LPA (ácido lisofosfatídico) aciltransferasa (LPAAT) y la diacilglicerol quinasa (DGK), que también han mostrado regular la señalización de mTOR a través de la producción de PA (Foster, 2007; Sun and Chen, 2008; Foster, 2009). DAG puede ser metabolizado en 3 formas y en la mayoría de las circunstancias, su conversión a PA se considera la ruta principal para el metabolismo de la señalización de DAG, reacción catalizada por la DGK (Luo et al., 2004).

La inhibición de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ con galleína, no pareciera contribuir de manera significativa a la señalización que induce AVP sobre la fosforilación de mTOR. Probablemente esta subunidad presenta una pequeña actividad basal que sólo es ligeramente estimulada con la unión de AVP al receptor V_{1a} y su actividad podría verse solapada a través de la activación de $PI3K_{\gamma}$, $PI3K_{\beta}$ y PLC_{β} (Schwindinger and Robishaw, 2001), a través de otras proteínas efectoras.

Así como otros GPCRs, el receptor V_1 transactiva a receptor EGF (EGFR) pudiendo activar la vía AKT/PI3K (Rozengurt, 2007). Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio muestran que AVP es capaz de inducir la transactivación del receptor EGFR a través del receptor V_{1a} (Fuentes et al., 2008), razón por la cual decidimos evaluar éste efecto y su participación en la

activación de mTOR, inhibiendo su actividad tirosina quinasa con el uso del inhibidor específico tirfostina (AG1478). Sin embargo, los resultados obtenidos descartan su participación en la inducción de la fosforilación de mTOR inducida por AVP, ya que tanto el control como la estimulación con AVP, previa inhibición del receptor de EGFR, no presentan cambios.

Finalmente y tal como ya se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización de mTOR integra las señales de los nutrientes, el estado de energía y factores de crecimiento para regular muchos procesos, entre los cuales se encuentran la biogénesis ribosomal, la autofagia y el metabolismo. En este estudio surgió la necesidad de preguntarnos qué sucedería con otros procesos bajo las condiciones en donde la disponibilidad de nutrientes es favorable, tal como en alta concentración glucosa durante 10 días, en donde las células pueden sintetizar proteínas y proliferar, mediante la activación de mTOR, ya que al contrario de esta situación, las células responden a la privación de nutrientes a través de inhibición de estos procesos que consumen energía, estimulando procesos catabólicos, tales como la autofagia (*Diaz-Troya et al., 2008*). Nuestros resultados claramente muestran que la activación de mTOR en alta concentración de glucosa durante 10 días y posterior estimulación con AVP, activan a mTOR con un máximo de activación a las 4 hrs, con la consecuente disminución en la activación de la autofagia, la cual fue medida a través del radio LC3I/II. La característica distintiva de activación autofagia es la formación celular de autofagosomas que contienen LC3 II, por lo tanto la actividad autofágica se mide bioquímicamente como la cantidad de LC3 II que se acumula en ausencia o presencia de actividad lisosomal (*Mizushima and Yoshimori, 2007*), en donde nuestros resultados revelan que entre los 60 y 240 minutos de estimulación con AVP, el marcador LC3II disminuye significativamente mientras que mTOR gradualmente se activa bajo estas condiciones.

En conclusión, este trabajo ha mostrado que posiblemente la alta concentración de glucosa que induce estrés oxidativo podría ser un importante mecanismo en la respuesta a AVP en la inducción de la disfunción de VSMC. Los resultados sugieren que AVP, es un factor que participa en el crecimiento de VSMC en presencia de alta concentración de glucosa a través de la activación de mTOR y sus diversas vías de señalización. Basados en la evidencia experimental, proponemos el siguiente esquema de activación de mTOR inducido por AVP, como se muestra en la *figura 5.1*.

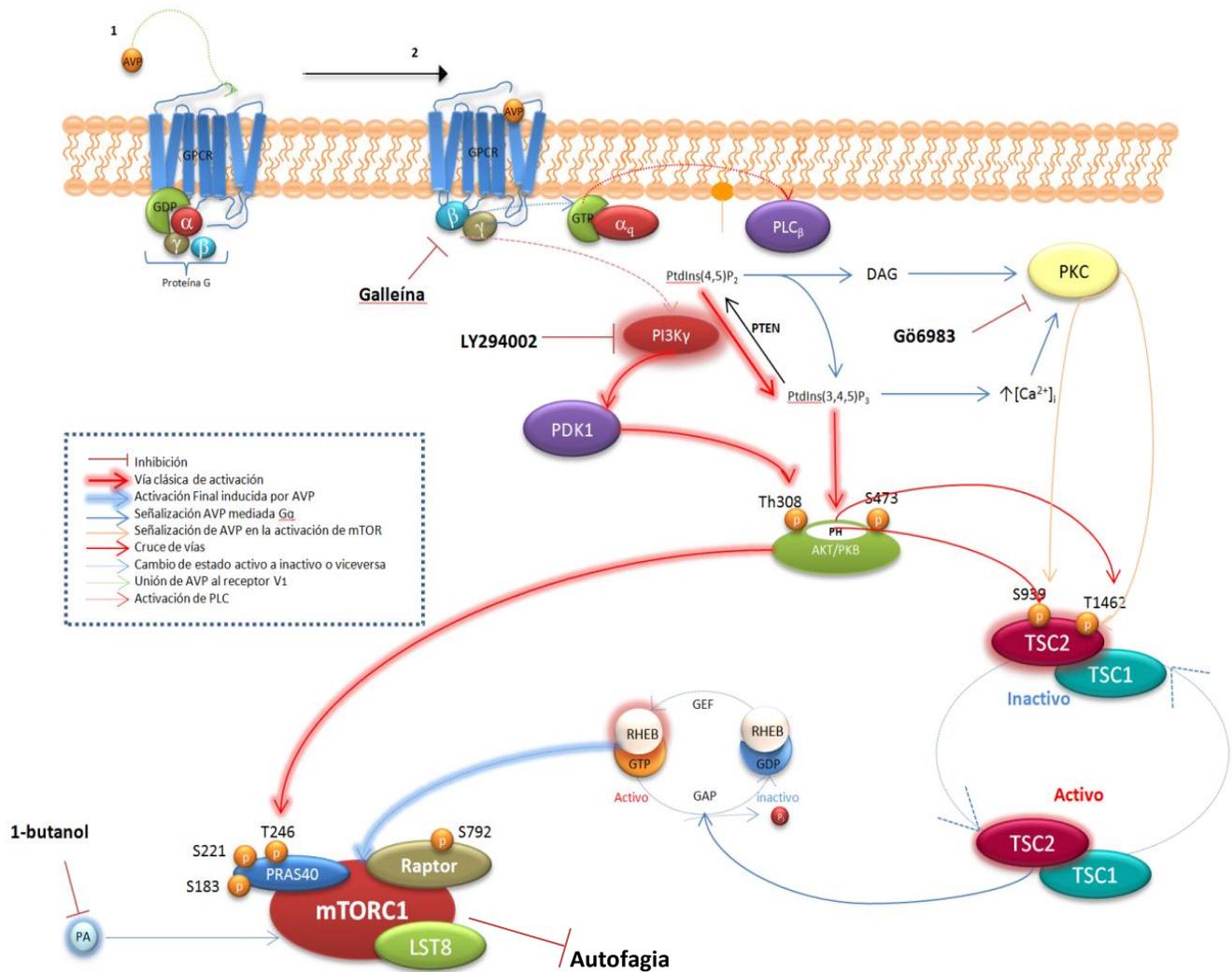


Figura 5.1: Representación esquemática del posible mecanismo a través del cual AVP induce la fosforilación de mTOR. AVP induce la estimulación PLC β , a través del receptor V_{1a}, promoviendo la hidrólisis de PIP₂. Esta reacción produce dos mensajeros intracelulares, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (PIP₃), el cual media la activación de PKC y la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático al citosol. Nuestros resultados sugieren que AVP es capaz de estimular a mTOR y consecuente inhibir la autofagia en las VSMC a través de la activación de PKC y la vía PI3K/AKT en alta concentración de glucosa extracelular. El mecanismo a través del cual estas dos vías de señalización podrían controlar la señalización de mTOR podría deberse a la fosforilación e inactivación del complejo TSC1/2.

6. CONCLUSIONES.

- 1.- La activación de mTOR inducida por AVP en células A-10, depende la concentración extracelular de glucosa.
- 2.- La alta concentración de glucosa por sí sola no es capaz de inducir la fosforilación de mTOR.
- 3.- La alta concentración de glucosa extracelular aumenta la fosforilación de AKT/PKB, proteína río arriba involucrada en la vía de señalización de mTOR.
- 4.- PI3K esta involucrada en la vía de activación de mTOR por AVP, puesto que su inhibición bloquea la activación.
- 5.- A su vez, PKC se encuentra involucrada en la vía de activación de mTOR por AVP, puesto que su inhibición bloquea su activación.
- 6.- Tanto la vía de señalización de PI3K y PLC/DAG+Ca²⁺/PKC convergen en la inactivación del complejo TSC1/2, en respuesta a AVP.
- 7.- En la inducción de la fosforilación de mTOR por AVP no estaría implicado PLD como tampoco la transactivación del EGFR.
- 8.- En condiciones de alta concentración de glucosa, la activación de mTOR por AVP inhibe la activación de la autofagia.

7. PERSPECTIVAS

La pared vascular es un órgano activo, flexible e integrado que presenta componentes celulares, como las células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos; y componentes no celulares, como la matriz extracelular. En forma dinámica estos componentes modifican su forma, aumentan, disminuyen o se reorganizan, en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, manteniendo así la integridad del vaso en condiciones fisiológicas o participando en la alteración vascular que aparece en enfermedades como la hipertensión y la aterosclerosis.

El presente estudio es un modelo útil que nos permite evaluar cuáles son las proteínas involucradas a nivel molecular que alteran la tasa de crecimiento de las células musculares lisas frente a la exposición crónica a alta concentración de glucosa y cómo esto podría agravar el proceso hipertensivo a través de la vía de activación de mTOR, siendo uno de los posibles blancos terapéuticos a tener en consideración cuando un paciente de forma asociativa padece de hipertensión y diabetes. Lo cual lo convierte en una herramienta terapéutica útil para prevenir o retardar el inicio de distintas patologías vasculares. Si bien está documentado el uso de stents recubiertos de Rapamicina que disminuyen significativamente el engrosamiento de la pared vascular tras una angioplastia, no se ha documentado su uso terapéutico en pacientes que de forma concomitante padezcan de hipertensión y diabetes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bai, X. and Jiang, Y. (2010). "Key factors in mTOR regulation." *Cell Mol Life Sci* 67(2): 239-253.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. and Hall, M. N. (2011). "Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* 10(11): 868-880.
- Birnbaumer, M. (2000). "Vasopressin receptors." *Trends Endocrinol Metab* 11(10): 406-410.
- Campbell, M., Allen, W. E., Silversides, J. A. and Trimble, E. R. (2003). "Glucose-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase-dependent upregulation of the platelet-derived growth factor-beta receptor potentiates vascular smooth muscle cell chemotaxis." *Diabetes* 52(2): 519-526.
- Coligan, J. E. (2003). Short protocols in protein science : a compendium of methods from Current protocols in protein science. Hoboken, Wiley.
- Chong, Z. Z. and Maiese, K. (2012). "Mammalian target of rapamycin signaling in diabetic cardiovascular disease." *Cardiovasc Diabetol* 11: 45.
- Das Evcimen, N. and King, G. L. (2007). "The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes." *Pharmacol Res* 55(6): 498-510.
- Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J. and Crespo, J. L. (2008). "The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals." *Autophagy* 4(7): 851-865.
- Dunlop, E. A. and Tee, A. R. (2009). "Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms." *Cell Signal* 21(6): 827-835.
- Dzau, V. J. and Gibbons, G. H. (1988). "Cell biology of vascular hypertrophy in systemic hypertension." *Am J Cardiol* 62(11): 30G-35G.

- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. and Chen, J. (2001). "Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling." *Science* 294(5548): 1942-1945.
- Foster, D. A. (2007). "Regulation of mTOR by phosphatidic acid?" *Cancer Res* 67(1): 1-4.
- Foster, D. A. (2009). "Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells." *Biochim Biophys Acta* 1791(9): 949-955.
- Fuentes, L. Q., Reyes, C. E., Sarmiento, J. M., Villanueva, C. I., Figueroa, C. D., Navarro, J. and Gonzalez, C. B. (2008). "Vasopressin up-regulates the expression of growth-related immediate-early genes via two distinct EGF receptor transactivation pathways." *Cell Signal* 20(9): 1642-1650.
- Hay, N. and Sonenberg, N. (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* 18(16): 1926-1945.
- Hsueh, W. A. and Anderson, P. W. (1992). "Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus." *Hypertension* 20(2): 253-263.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J. R., Heath, W. and King, G. L. (1992). "Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 11059-11063.
- Jiang, B. H. and Liu, L. Z. (2008). "Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment." *Drug Resist Updat* 11(3): 63-76.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. and Hardie, D. G. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metabolism* 1(1): 15-25.

- Kumar, A. and Lindner, V. (1997). "Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(10): 2238-2244.
- Kwon, G., Marshall, C. A., Pappan, K. L., Remedi, M. S. and McDaniel, M. L. (2004). "Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets." *Diabetes* 53 Suppl 3: S225-232.
- Lee, C. H., Inoki, K. and Guan, K. L. (2007). "mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 443-467.
- Lehmann, D. M., Seneviratne, A. M. and Smrcka, A. V. (2008). "Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation." *Mol Pharmacol* 73(2): 410-418.
- Liao, Q., Shi, D. H., Zheng, W., Xu, X. J. and Yu, Y. H. (2010). "Antiproliferation of cardamonin is involved in mTOR on aortic smooth muscle cells in high fructose-induced insulin resistance rats." *European Journal of Pharmacology* 641(2-3): 179-186.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B. and Dennis, P. A. (2008). "Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations." *Drug Resist Updat* 11(1-2): 32-50.
- Luo, B., Regier, D. S., Prescott, S. M. and Topham, M. K. (2004). "Diacylglycerol kinases." *Cell Signal* 16(9): 983-989.
- Madonna, R. and De Caterina, R. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes." *Vascul Pharmacol* 54(3-6): 68-74.

- Madonna, R. and De Caterina, R. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part II: cellular mechanisms and therapeutic targets." *Vascul Pharmacol* 54(3-6): 75-79.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." *Cell* 129(7): 1261-1274.
- Memmott, R. M. and Dennis, P. A. (2009). "Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer." *Cell Signal* 21(5): 656-664.
- Mita, M. M., Mita, A. and Rowinsky, E. K. (2003). "The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer." *Cancer Biol Ther* 2(4 Suppl 1): S169-177.
- Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." *Autophagy* 3(6): 542-545.
- Owens, G. K., Kumar, M. S. and Wamhoff, B. R. (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." *Physiol Rev* 84(3): 767-801.
- Parmentier, J. H., Pavicevic, Z. and Malik, K. U. (2006). "ANG II stimulates phospholipase D through PKC zeta activation in VSMC: implications in adhesion, spreading, and hypertrophy." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290(1): H46-H54.
- Peiro, C., Lafuente, N., Matesanz, N., Cercas, E., Llergo, J. L., Vallejo, S., Rodriguez-Manas, L. and Sanchez-Ferrer, C. F. (2001). "High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide." *Br J Pharmacol* 133(7): 967-974.

- Proud, C. G. (2004). "The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses." *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 927-934.
- Radisavljevic, Z. M. and Gonzalez-Flecha, B. (2004). "TOR kinase and Ran are downstream from PI3K/Akt in H₂O₂-induced mitosis." *J Cell Biochem* 91(6): 1293-1300.
- Risler, N. R., Cruzado, M. C. and Miatello, R. M. (2005). "Vascular remodeling in experimental hypertension." *ScientificWorldJournal* 5: 959-971.
- Rosner, M., Hanneder, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C. and Hengstschlager, M. (2008). "The mTOR pathway and its role in human genetic diseases." *Mutat Res* 659(3): 284-292.
- Rozengurt, E. (2007). "Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors." *J Cell Physiol* 213(3): 589-602.
- Russell, R. C., Fang, C. and Guan, K. L. (2011). "An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology." *Development* 138(16): 3343-3356.
- Schwindinger, W. F. and Robishaw, J. D. (2001). "Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation." *Oncogene* 20(13): 1653-1660.
- Sharma, S., Guthrie, P. H., Chan, S. S., Haq, S. and Taegtmeyer, H. (2007). "Glucose phosphorylation is required for insulin-dependent mTOR signalling in the heart." *Cardiovasc Res* 76(1): 71-80.
- Sharpe, P. C., Yue, K. K., Catherwood, M. A., McMaster, D. and Trimble, E. R. (1998). "The effects of glucose-induced oxidative stress on growth and extracellular matrix gene expression of vascular smooth muscle cells." *Diabetologia* 41(10): 1210-1219.
- Shaw, M., Cohen, P. and Alessi, D. R. (1998). "The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2." *Biochemical Journal* 336 (Pt 1): 241-246.

- Sheetz, M. J. and King, G. L. (2002). "Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications." *JAMA* 288(20): 2579-2588.
- Sun, Y. and Chen, J. (2008). "mTOR signaling: PLD takes center stage." *Cell Cycle* 7(20): 3118-3123.
- Tee, A. R., Anjum, R. and Blenis, J. (2003). "Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin." *J Biol Chem* 278(39): 37288-37296.
- Thibonnier, M., Plesnicher, C. L., Berrada, K. and Berti-Mattera, L. (2001). "Role of the human V1 vasopressin receptor COOH terminus in internalization and mitogenic signal transduction." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(1): E81-92.
- Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N. and Foster, D. A. (2009). "Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin." *Mol Cell Biol* 29(6): 1411-1420.
- Tsang, C. K., Qi, H., Liu, L. F. and Zheng, X. F. (2007). "Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases." *Drug Discov Today* 12(3-4): 112-124.
- Watanabe, R., Wei, L. and Huang, J. (2011). "mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets." *J Nucl Med* 52(4): 497-500.
- Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. and Orme, C. (1997). "Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro." *Diabetes* 46(9): 1497-1503.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* 124(3): 471-484.
- Yang, Q. and Guan, K. L. (2007). "Expanding mTOR signaling." *Cell Res* 17(8): 666-681.

Zoncu, R., Efeyan, A. and Sabatini, D. M. (2011). "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 21-35.