



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Señalización mediada por las proteínas quinasas PKA y  
AMPK en la regulación de la supervivencia ante estrés  
nutricional en células hepáticas**

Presentada por Anabela Cecilia Ferretti

Rosario, Argentina

2013

# Señalización mediada por las proteínas quinasas PKA y AMPK en la regulación de la supervivencia ante estrés nutricional en células hepáticas

Anabela Cecilia Ferretti  
Licenciada en Biotecnología  
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 al 13 de diciembre de 2013, bajo la dirección de los Dres. Cristián Favre y María Cecilia Larocca

Director: Cristián Favre

Co-Directora: María Cecilia Larocca

Jurado de Tesis:

Dra. Cristina Ester Carnovale

Dra. Mónica Lidia Kotler

Dra. María Fernanda Troncoso

Fecha de defensa: 3 de marzo de 2014

*A mi familia,  
por su apoyo incondicional*



Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron divulgados en las revistas y congresos que se detallan a continuación:

#### **Trabajos publicados:**

- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Ochoa J. E., Larocca M. C., Favre C. (2012). Protein Kinase A signals apoptotic activation in glucose-deprived hepatocytes: Participation of reactive oxygen species. *Apoptosis* 17(5), 475-491.
- **Ferretti A. C.**, Larocca M. C., Favre C. (2012). Nutritional stress in eukaryotic cells: oxidative species and regulation of survival in time of scarceness. *Mol. Genet. Metab.* 105 (2), 186-192.

#### **Trabajos en preparación:**

- **Ferretti A. C.**, Tonucci F., Larocca M. C., Favre C. (2013). Simultaneous effects of AMPK and PKA activation in the regulation of survival of glucose starving HepG2 cells.

#### **Trabajos presentados en Congresos Nacionales:**

- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Ochoa J. E., Larocca M. C., Favre C. La asociación de PKA a sus proteínas de anclaje es necesaria para la inducción de eventos que conducen a la apoptosis mitocondrial en hepatocitos deprivados de glucosa. LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2009. Abstract: *Medicina* Vol 69 (Supl. I): 172, 2009.
- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Ochoa J. E., Larocca M. C., Favre C. Papel del estrés oxidativo en la inducción de apoptosis mediada por proteína-quinasa A en hepatocitos deprivados de glucosa. LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2010. Abstract: *Medicina* Vol 70 (Supl. II): 108, 2010.
- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Taborda D., Larocca M. C., Favre C. La señalización AMPc/PKA modula la producción mitocondrial de ROS y la activación apoptótica en hepatocitos. LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad

Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2011. Abstract: Medicina Vol 71 (Supl.III): 239, 2011.

- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Tonucci F., Larocca M. C., Favre C. Regulación de la supervivencia ante estrés nutricional en células HepG2: participación de las quinasas AMPK y PKA. Reunión Anual 2012 de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS), Rosario, Argentina. Octubre 2012.

#### **Trabajos presentados en Congresos Internacionales:**

- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Ochoa J. E., Larocca M. C., Favre C. Oxidative stress in the induction of apoptosis mediated by protein-kinase A in glucose-deprived hepatocytes. 17 th Annual Meeting of the Society for Free Radicals Biology and Medicine (SFRBM), Orlando, FL, 2010.
- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Taborda D., Larocca M. C., Favre C. PKA inhibition prevents mitochondrial ROS production and apoptotic activation of hepatocytes subjected to glucose withdrawal. VII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) y São Paulo Advanced School on Redox Processes in Biomedicine (ESPCA). Sao Paulo, Brazil. Agosto 2011.
- **Ferretti A. C.**, Mattaloni S. M., Tonucci F., Larocca M. C., Favre C. AMPK and PKA signaling modulate survival in glucose starving hepatoma cells. Cancer and Metabolism 2013 Abcam Conference, Amsterdam, Holanda. 24-25 de junio de 2013.

# Índice General

Abreviaturas y Símbolos	i
Lenguaje Especial	v
<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>5</b>
2.1. Regulación de la supervivencia celular	5
2.1.1. Ciclo celular	5
2.1.2. Muerte celular	8
2.1.2.1. Muerte celular por apoptosis	8
2.1.2.1.1. Participantes moleculares de la apoptosis	9
2.1.2.1.1.1. Caspasas	9
2.1.2.1.1.2. Familia de proteínas Bcl-2	10
2.1.2.1.2. Activación de la apoptosis	11
2.1.2.1.2.1. Apoptosis activada por receptores de muerte	11
2.1.2.1.2.2. Apoptosis activada por vía mitocondrial	12
2.1.2.1.3. Rol de p53 en la apoptosis	13
2.1.2.2. Muerte celular por necrosis	14
2.1.2.3. Otras formas de muerte celular	15
2.1.3. Estrés oxidativo y muerte celular	17
2.1.3.1. Generación de ROS por la cadena de transporte de electrones mitocondrial	18
2.1.3.2. Defensas antioxidantes intracelulares	20
2.1.3.3. Rol de ROS en la muerte celular programada	21
2.2. Quinasas implicadas en vías de regulación de la viabilidad en células eucariotas en respuesta a estrés nutricional: de las levaduras a las células tumorales	23
2.2.1. Proteína quinasa dependiente de AMPc	23
2.2.1.1. Proteínas de anclaje de PKA (AKAPs)	25
2.2.1.2. Intervención de PKA en complejos/vías que modulan metabolismo y supervivencia celular	26
2.2.2. Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)	28

2.2.2.1. AMPK coordina el control del crecimiento celular	30
2.2.2.2. Distintos roles de AMPK en la regulación de la supervivencia celular	31
2.2.2.3. Relación entre las vías de señalización de PKA y AMPK	32
2.3. El hepatocito como modelo de estudio	34
2.3.1. El hígado: Generalidades	34
2.3.2. Metabolismo energético hepático	34
2.3.2.1. Rol del hepatocito en la homeostasis de la glucosa	35
2.4. Características metabólicas de las células tumorales	36
2.4.1. Hepatocarcinoma	39
2.4.1.1. Generalidades	39
2.4.1.2. Características de las células HepG2	40
<b>3. Objetivos</b>	42
<b>4. Materiales y Métodos</b>	43
4.1. Animales	43
4.2. Tratamiento y modelos experimentales	43
4.2.1. Cultivo primario de hepatocitos aislados de hígado de rata	43
4.2.2. Línea celular HepG2	44
4.3. Ensayos de viabilidad celular	45
4.3.1. Exclusión de Azul de Tripán (EAT)	45
4.3.2. Liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)	45
4.3.3. Evaluación de la viabilidad celular mediante detección de actividad metabólica a través del ensayo de MTT	46
4.4. Estimación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )	47
4.5. Determinación de los niveles intracelulares de ATP	47
4.6. Evaluación de apoptosis	47
4.6.1. Determinación de actividad Caspasa 3	47
4.6.2. Microscopía de Fluorescencia	49
4.6.3. Ensayo de Anexina V/ Ioduro de Propidio por citometría de flujo	49
4.7. Determinación de la distribución de las células en el ciclo celular	50
4.8. Preparación de fracciones subcelulares	51
4.9. Inmunoprecipitación de Bax	52
4.10. Inmunoprecipitación de AMPK $\alpha$	53

4.11. Western blot	53
4.12. Determinación de los niveles de ROS	54
4.13. Determinación de la generación de ROS mitocondrial	55
4.14. Determinación de niveles de AMPc intracelulares y mitocondriales	56
4.15. Aislamiento de ARN total	56
4.16. Análisis estadístico	58
<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>59</b>
<b>Capítulo 1. Regulación de la muerte celular durante la restricción de glucosa en cultivo primario de hepatocitos de rata</b>	<b>59</b>
5.1.1. Estudios de viabilidad celular y de parámetros bioenergéticos	59
5.1.2. Evaluación de muerte celular en hepatocitos deprivados de glucosa	61
5.1.3. Estudio de la participación de PKA en la apoptosis inducida por falta de glucosa en hepatocitos	65
5.1.4. Rol del estrés oxidativo en la inducción de apoptosis durante la restricción de glucosa	69
5.1.5. Participación de PKA en el desbalance de ROS durante la ausencia de glucosa	72
5.1.5.1. Participación de PKA en el secuestro de ROS	72
5.1.5.2. Participación de PKA en la producción de ROS mitocondrial durante la respiración	74
5.1.8. Discusión	77
<b>Capítulo 2. Regulación de la supervivencia en células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A ante restricción de glucosa</b>	<b>85</b>
5.2.1. Estudios de viabilidad celular y proliferación durante la falta de glucosa	85
5.2.2. Participación de las quinasas AMPK y PKA en la regulación de la supervivencia en células HepG2	92
5.2.2.1. Determinación de apoptosis y necrosis en células HepG2 ayunadas y no ayunadas ante activación de AMPK ó PKA	96
5.2.2.2. Efecto de la activación de AMPK y PKA sobre la progresión del ciclo celular en células HepG2 privadas de glucosa	100
5.2.3. Interacción entre las vías de señalización de PKA y AMPK en la regulación de la supervivencia ante la restricción de glucosa	103

5.2.3.1. Regulación de AMPK por PKA	107
5.2.6. Discusión	111
<b>6. Conclusiones</b>	123
<b>7. Referencias Bibliográficas</b>	125
Agradecimientos	146

## Abreviaturas y Símbolos

ACC	AcetilCoA-Carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranósido
AKAPs	Proteínas de anclaje a quinasa A
Akt/PKB	Proteína quinasa B
AMP	Adenosín monofosfato
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANT	Del inglés <i>adenine nucleotide translocator</i>
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Del inglés <i>Bovine serum albumin</i>
CAT	Catalasa
CBP	Del inglés <i>CREB-binding protein</i>
CCCP	Cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
Cdk <sub>i</sub>	Inhibidor de Cdk
COX	Citocromo c oxidasa
CREB	del inglés <i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

dbAMPc	Dibutiril AMPc
DCF	2', 7' –dicloro-fluorescina
DCFH-DA	Diacetato de 2',7' dicloro-dihidro-fluoresceína
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EAT	Exclusión de Azul de Tripán
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a FAS
FoxO	Clase O de factores de transcripción forkhead box
GLUT	Del inglés <i>Glucose Transporter</i>
G6PDH	Glucosa6P-deshidrogenasa
GPX1	Glutación peroxidasa 1
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H89	N-[2-(p-bromo-cinnamilamino)etil]-5-isoquinolinosulfonamida
HCC	Hepatocarcinoma celular
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HepG2/C3A	Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano
HK	Hexoquinasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Huh7	Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina

IL-3	Interleuquina-3
IP	Ioduro de propidio
JNK	Quinasa c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal
LDH	Lactato deshidrogenasa
MOMP	Del inglés <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
mTOR	Del inglés <i>mammalian Target of Rapamicin</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	Del inglés <i>GeneBank of the National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Factor nuclear κB
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
PBS	Buffer fosfato en solución salina
PCG1α	Del inglés <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK2	Fosfofructoquinasa 2
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKAc	Subunidad catalítica de PKA
PKC	Proteín-quinasa C

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP	Fosfatasas
PTP	Poro de transición de permeabilidad
PVDF	Polivinilideno difluoruro
RI $\alpha/\beta$	Subunidades regulatorias tipo I de PKA
RII $\alpha/\beta$	Subunidades regulatorias tipo II de PKA
Rb	Proteína de retinoblastoma
RIPA	Buffer de lisis de radioinmunoprecipitación
ROS	Del inglés <i>reactive oxygen species</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
SOD	Superóxido dismutasa
Thr	Treonina
TIGAR	Del inglés <i>Tp53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i>
TMRM	tetra-metil-rodamina-metil-ester
VDAC	Del inglés <i>voltage-dependent anion channel</i>
ZMP	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido monofosfato
Z-VAD-FMK	carbобенzoxi-valil-alanil-aspartil-[O-metil]- fluorometilcetona

## **Lenguaje Especial**

### **Del inglés**

*buffer*: solución tamponada

*cluster*: grupo o racimo

*lag*: retardo

*loop*: horquilla, asa

*pellet*: precipitado

*western blot*: inmunoelectrotransferencia

### **Del latín**

*in vitro*: aplicado al trabajo con células en cultivo

*in vivo*: que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo viviente

*per se*: por sí

Resumen

---

## 1. Resumen

El estrés nutricional regula la supervivencia en todas las células eucariotas -de levaduras a mamíferos- y muchas de las vías de quinasas involucradas en esta regulación están conservadas como parte de una respuesta ancestral de regulación de la viabilidad celular ante escasez de sustratos. Aclarar los mecanismos de esta regulación es importante para comprender la biología del proceso y para indagar cómo es la señalización del mismo y su resultante en la “ejecución” de células tumorales, que son esencialmente sensibles a la falta de glucosa debido a sus características metabólicas.

Los hepatocitos poseen una gran especialización en su metabolismo glucídico y resultan un modelo celular atractivo para estudiar la regulación de la supervivencia/muerte celular ante estrés por falta de glucosa. La utilización de la glucosa en las células de mamíferos depende de su metabolismo secuencial en la glucólisis seguida de la respiración mitocondrial y la contribución de cada una de estas etapas está determinada por el tipo celular y su estado, normal ó de transformación cancerígena. Por ejemplo, las células tumorales presentan una alta dependencia de los niveles de glucosa y la glucólisis anaeróbica es la principal fuente de energía. Por el contrario, en células normales como los hepatocitos la producción de energía es predominantemente a través de la fosforilación oxidativa.

La restricción de glucosa desata vías regulatorias en las que están implicadas proteínas quinasas constituyendo una compleja red de regulación de la viabilidad en respuesta a la disponibilidad energética de la célula. Entre las proteínas quinasas involucradas, la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) intervienen en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis en respuesta a distintas señales metabólicas y de crecimiento. Dependiendo de la situación y del tipo celular, ambas proteínas pueden tener roles duales.

PKA puede regular la supervivencia celular y apoptosis, teniendo efectos tanto pro como anti- supervivencia. Además, esta quinasa ha sido implicada en la regulación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de la modulación de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en distintos tipos celulares de mamíferos y aun en los eucariotas más sencillos. Por su parte, la quinasa AMPK es clave en la adaptación celular al estrés energético, y la misma puede tener roles

opuestos en la proliferación y la muerte celular: en algunos contextos promueve apoptosis y/o arresto de la proliferación, y en otros favorece la supervivencia.

Los sistemas de señalización de AMPc regulan muchas de las mismas vías metabólicas de carbohidratos, lípidos, y metabolismo de proteínas que son reguladas por el sistema de señalización de AMPK. Existen conexiones entre ambas vías de señalización en músculo, hígado y tejido adiposo. Concretamente, se han identificado residuos de AMPK que son fosforilados por PKA, y de esta manera PKA es capaz de modular la actividad de dicha proteína. Sin embargo, aun con las evidencias que demuestran la modulación de la actividad de la quinasa AMPK por la quinasa PKA regulando así ciertas funciones metabólicas, nada se sabe hasta el momento de realización de este trabajo de tesis del rol que este cruce entre vías puede tener sobre la regulación de la supervivencia celular.

En base a los antecedentes presentes en la literatura los Objetivos del trabajo de Tesis fueron, en primer lugar, estudiar los cambios en la supervivencia ante la falta de glucosa en hepatocitos normales y en células de hepatocarcinoma humano, HepG2; y en segundo lugar, analizar el rol de las quinasas PKA y/o AMPK en la regulación de dicho proceso.

En la primera etapa de la tesis se realizaron estudios en cultivos primarios de hepatocitos de rata. En primer lugar caracterizamos la muerte celular inducida durante la restricción de glucosa en dichas células. Describimos que la ausencia de glucosa durante 6 horas en hepatocitos, induce la activación la vía mitocondrial de apoptosis, la cual es dependiente de la actividad de PKA y de su interacción con sus proteínas de anclaje. En segundo lugar, comenzamos a dilucidar los mecanismos que llevan a la activación de esta apoptosis y analizamos la participación de PKA en los mismos. Demostramos que la ausencia de glucosa produce un aumento temprano en los niveles de ROS de origen mitocondrial y que dicho evento es el causante de la activación apoptótica luego de 6 horas en ausencia de glucosa.

Nuestros resultados indicaron además que la ausencia de glucosa en hepatocitos induce, de alguna manera, un aumento en los niveles de AMPc intracelular y mitocondrial llevando a un aumento en la señalización por PKA en ambos compartimientos. Demostramos que esta activación de PKA señala una represión en la expresión de genes de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa y Catalasa. Por

otro lado, PKA activada en mitocondria señala un aumento en la producción de ROS durante la respiración mitocondrial, probablemente regulando la actividad de alguno/os de los complejos respiratorios. Ambos eventos mediados por PKA intracelular y mitocondrial resultarían en una mayor acumulación de ROS y en la inducción de muerte apoptótica en ausencia de glucosa. Proponemos que esto constituiría un eje AMPK-PKA compartimentalizado en la mitocondria que podría gatillar el suicidio en las células eucarióticas en respuesta a la carencia de su fuente de carbono principal, la glucosa.

Durante el desarrollo de la segunda etapa de la tesis estudiamos la supervivencia ante la falta de glucosa en células HepG2, y su modulación por AMPK y PKA. En primer lugar, demostramos que la ausencia de glucosa produce una pérdida de la viabilidad progresiva en estas células que es potenciada si las células son tratadas a la vez con el activador de AMPK, AICAR. Al analizar los procesos causantes de la disminución de la viabilidad en estas condiciones, observamos que la falta de glucosa induce no solamente muerte apoptótica y necrótica, sino también el arresto de la duplicación celular. En efecto, las células se detienen en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular y dicho evento, según nuestros hallazgos, estaría mediado por el aumento en los niveles proteicos del inhibidor del ciclo celular, p21. Nuestros resultados, además, indicaron un aumento en la señalización de las quinasas PKA y AMPK durante la restricción de glucosa. Por otro lado corroboramos que la deprivación de glucosa induce tempranamente un desbalance en las especies reactivas del oxígeno también en estas células. En efecto, existe un aumento significativo de los niveles de ROS en las células HepG2 cultivadas en ausencia de glucosa desde las 6 horas que es impedido por la presencia del inhibidor de PKA H89. Estos datos soportan la hipótesis que la falta de glucosa que conduce a la muerte celular tiene un componente oxidativo que está asociado a la activación de PKA. En este sentido, la activación de PKA induce un aumento en los niveles de ROS y apoptosis, pero no tiene efectos en la proliferación. Por su parte, AMPK induce apoptosis y un arresto en la progresión del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a través de la inducción de p53-p21.

En segundo lugar indagamos la posible interconexión entre las vías de señalización de PKA y AMPK. Nuestros resultados indicaron que la coactivación de ambas quinasas no produce ningún efecto en la muerte apoptótica, pero sin embargo, la activación de PKA contrarresta el efecto antiproliferativo de AMPK activada. Dicha

prevención está asociada a la represión del aumento en los niveles proteicos de p21 inducido por la activación de AMPK. En concordancia con esto, demostramos que PKA fosforila a AMPK y de esta manera regula negativamente su activación. En resumen, los resultados indican que la falta de glucosa en células HepG2 involucra la señalización a través de estas dos vías de quinasas que regulan diferencialmente la muerte y la proliferación y que existe una interregulación entre AMPK y PKA controlando la expresión de proteínas claves para el arresto del ciclo celular. Así, el control del crecimiento tumoral en este tipo celular puede ser una resultante tanto de las intervenciones nutricionales que regulan la activación de estas quinasas como de los niveles hormonales capaces de modular las mismas.

# Introducción

---

## 2. Introducción

### 2.1. Regulación de la supervivencia celular

La vida de una célula eucariótica se ve condicionada tanto por los factores que estimulan ó reprimen su crecimiento y su consecuente proliferación mitótica, como por aquellos que promueven ó evitan su muerte. Una red de señalización comprendida por proteínas quinasas y proteínas oncosupresoras son capaces de regular la proliferación y la muerte celular modulando actores involucrados en dichos procesos. De esta manera controlan las defensas a estrés, los niveles de los reguladores del ciclo celular y de las proteínas pro y anti apoptóticas, la actividad de los complejos respiratorios y de las enzimas metabólicas, etc. Esta compleja red de señalización regula diferencialmente la viabilidad en respuesta a la disponibilidad energética de la célula dependiendo del tipo celular y del grado de transformación cancerígena, cuando es el caso. En las siguientes secciones comentaremos algunos aspectos de estos procesos.

#### 2.1.1. Ciclo celular

En los organismos multicelulares, el crecimiento celular (es decir, el aumento en la masa celular) y la proliferación (aumento en el número de células) son estrictamente controlados por factores de crecimiento. En presencia de exceso de nutrientes, los factores de crecimiento activan cascadas de señalización que llevan a la captación y uso de nutrientes. La mayoría de las cascadas de señalización luego de la activación de los receptores de factores de crecimiento convergen finalmente en la activación de proteínas reguladoras del ciclo celular (1).

Un ciclo celular típico está compuesto por dos grandes fases, a saber: la Interfase, que se divide en tres fases, G1, S y G2, y la Mitosis (2). En la Interfase, en G1 se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la fase S se caracteriza por la replicación del ADN nuclear; finalmente, en G2, definida por el tiempo que transcurre entre la fase S y el inicio de la Mitosis, la célula se prepara para la mitosis (1,3). El ciclo celular culmina con la mitosis, donde se divide la cromatina duplicada de modo tal que cada célula hija obtiene una copia del material genético, es decir, un cromosoma de cada tipo. El final de la Mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o puede que la célula entre en una fase

quiescente,  $G_0$ , que corresponde a un estado de latencia respecto al ciclo celular característica de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Figura 2.1) (2-4).

Como todo proceso orgánico, el ciclo celular está sujeto a regulación. Ésta es realizada en momentos específicos del ciclo, llamados puntos de control o de chequeo, que pueden frenar o disparar diversos procesos que le permiten a la célula proseguir con su ciclo normal de replicación del material genético, crecimiento y división. Los puntos de chequeo ocurren en momentos cruciales del ciclo celular, definidos entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente. En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, el estado del ADN y el estado de otros componentes celulares necesarios para la progresión de un ciclo celular típico normal (5,6).

El sistema de control del ciclo celular está regulado por la acción coordinada de diversas ciclinas, y de las quinasas dependientes de las mismas (Cdk), como así también por inhibidores de las Cdk (Cdk<sub>i</sub>) y por genes supresores de tumor. La concentración de las ciclinas es variable a lo largo del ciclo celular: cuando su concentración es baja, la función de su correspondiente quinasa se mantiene reprimida, mecanismo en el cual son fundamentales los Cdk<sub>i</sub>. La ciclina D es la primera en aumentar ante la activación de las vías de señalización inducidas por mitógenos, y es responsable del paso de un punto de restricción en la fase G<sub>1</sub>, a partir del cual las células quedan comprometidas en la progresión hacia la división celular. El aumento en la actividad de las quinasas dependientes de ciclina D (Cdk4 y 6) lleva a la inactivación por fosforilación de los Cdk<sub>i</sub> y liberación del factor de transcripción E2F, lo que induce el aumento en la transcripción de la ciclina E. La ciclina E se une a la Cdk2 sobre el final de la fase G<sub>1</sub>, y esta quinasa así activada induce la transición G<sub>1</sub>/S. Durante la fase S, se forman los complejos ciclina A-Cdk2, que contribuyen a la transición a la fase G<sub>2</sub>. En esta última fase aumenta la ciclina B, activando a Cdk1 y permitiendo la conclusión de la Mitosis (8).

La proteína de retinoblastoma o proteína Rb es abundante en el núcleo de las células de mamífero, y es sustrato de los complejos Cdk-ciclina D y Cdk2-ciclina E. En estado de reposo, o al principio de G<sub>1</sub>, Rb actúa inactivando a la familia de los factores de transcripción E2F. El complejo Rb-E2F asegura que la fase S no se inicie, ya que genes cuyos productos son esenciales para las fases S y M dependen de la actividad de

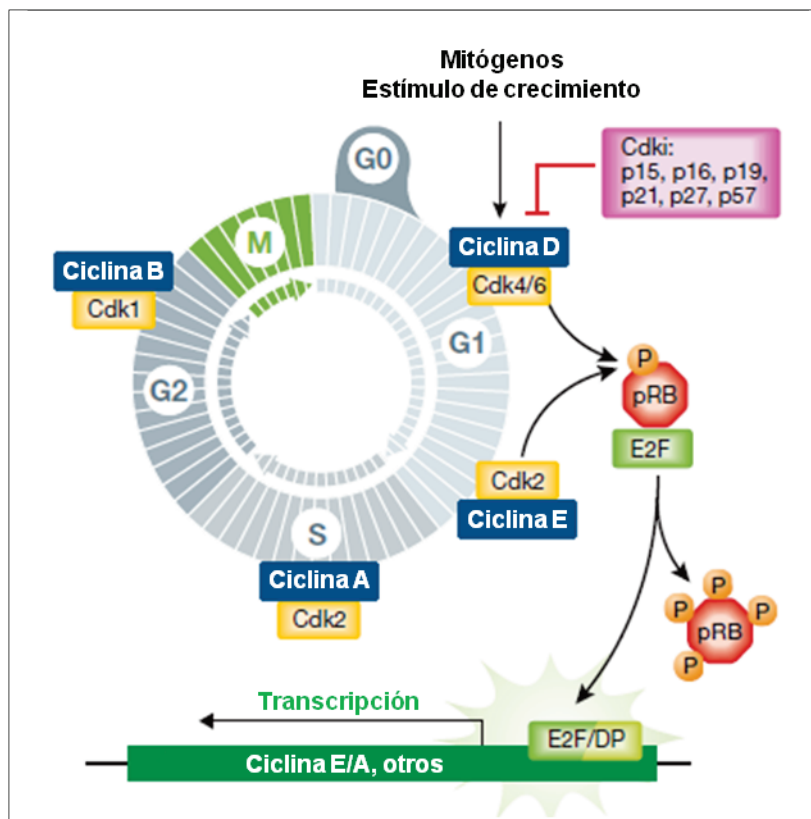
E2F (3,9,10). En G1 o G<sub>0</sub>, Rb es fosforilada por las quinasas Cdk4,6-ciclina y permite la liberación de E2F. Así, se libera la represión mantenida por el complejo E2F-Rb y los genes requeridos para la fase S y M se activan (3,11). Los Cdk<sub>i</sub> regulan negativamente este proceso inhibiendo la actividad de los complejos ciclina/Cdk y la fosforilación de Rb, resultando en el arresto en G1 (12,13).

La proteína supresora de tumor p53, considerada icónicamente como un guardián del genoma por su rol en la prevención de la acumulación de alteraciones genéticas, juega un papel central en la decisión de si una célula sometida a diversos tipos de estrés, incluyendo daño en el ADN, hipoxia y activación de oncogenes, sufre arresto del ciclo celular o muerte (14,15). La actividad transcripcional de p53 es regulada fundamentalmente por modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación y acetilación (16). En células normales, los niveles de proteína p53 se mantienen bajos debido a la ubiquitinación mediada por Mdm2 y degradación a través de la vía proteosomal. Mdm2 también regula la actividad de p53 facilitando su exportación nuclear (17). Luego de un daño al ADN, p53 es fosforilada en varios sitios en su dominio de transactivación, inhibiendo de esta manera la interacción de p53 con Mdm2 (18), y llevando a su estabilización (19).

P53 es esencial para el arresto en G1 en respuesta a daños en el ADN. Su principal blanco transcripcional es el inhibidor p21 (p21CKI) (20). P21 pertenece a la familia de inhibidores de Cdk Cip y Kip, que incluye p21, p27 y p57. P21 inhibe la progresión del ciclo celular principalmente a través de la unión e inhibición del complejo ciclina D-Cdk4 y de la inhibición de Cdk2, que son requeridos no solamente para la fosforilación de Rb, si no también para el disparo de los orígenes de replicación y para la actividad de las proteínas directamente involucradas en la síntesis de ADN. Además, p21 se une al antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, y de esta manera interfiere con la actividad ADN polimerasa dependiente de PCNA, lo que provoca la inhibición de la replicación de ADN y la modulación de distintos procesos de reparación del ADN dependientes de PCNA (21).

Además de estos efectos promovidos por p53 como factor transcripcional regulando la progresión del ciclo celular, no son menos importantes sus acciones regulando la muerte, o sus consecuencias modulando el metabolismo celular por efectos

en el citosol sobre diversas enzimas (22-24). Detallaremos algunas de estas funciones en ítems posteriores de esta Introducción.



**Figura 2.1. Regulación molecular del ciclo celular.** Las vías de transducción de señal inducidas por mitógenos llevan a la acumulación de complejos ciclinaD-Cdk durante la fase G1. La activación de estos complejos lleva a la fosforilación de RB con la consiguiente liberación del factor de transcripción E2F, el cual induce la expresión de la ciclina E, necesaria para la transición G1/S. Las Cdk son luego activadas por la ciclina A para conducir la transición de fase S a la fase G2, antes de entrar a la mitosis. La actividad y función de los complejos ciclina-Cdks son reguladas por CKIs. *Ilustración adaptada de (1).*

## 2.1.2. Muerte celular

### 2.1.2.1. Muerte celular por apoptosis

La apoptosis es una forma común de muerte que implica un programa fisiológico de “suicidio celular”, que es esencial para el desarrollo embriológico, la función del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en organismos multicelulares. La desregulación de la apoptosis está involucrada en numerosas patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, autoinmunidad y cáncer (25).

Morfológicamente la apoptosis se caracteriza por un encogimiento citoplasmático, condensación y fragmentación nuclear, formación de protrusiones de membrana plasmática y eventualmente fragmentación de la célula en “cuerpos apoptóticos”. Estos cuerpos consisten en componentes nucleares y citoplasmáticos con organelas intactas rodeados por membrana plasmática, que resultan posteriormente fagocitados por células adyacentes y macrófagos, en donde sufren degradación lisosomal (26). La apoptosis constituye un proceso celular, no tisular, ya que las células apoptóticas no producen respuesta inflamatoria y solamente son afectadas células individuales (26). Dentro de los cambios bioquímicos asociados con la apoptosis se encuentran: externalización de residuos de fosfatidil serina, ruptura proteolítica de sustratos intracelulares y fragmentación escalonada del ADN. Todo el proceso juega un rol crítico en muchos eventos fisiológicos y patológicos (27).

La membrana mitocondrial externa sufre cambios en fases tempranas de la activación apoptótica que incluyen la pérdida de su gradiente electroquímico por la formación de poros (28), como describiremos a continuación al ir presentando a la maquinaria involucrada.

### **2.1.2.1.1. Participantes moleculares en la apoptosis**

#### **2.1.2.1.1.1. Caspasas**

Las caspasas son un grupo de cisteín proteasas, altamente conservadas en organismos multicelulares, que median reacciones claves en el proceso apoptótico (29). Las caspasas son expresadas constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares como zimógenos inactivos que son activados por procesamiento proteolítico. Los zimógenos de caspasas contienen varios dominios incluyendo un pro-dominio N-terminal, una subunidad grande y una subunidad pequeña. La activación de una caspasa involucra la hidrólisis del zimógeno en un residuo específico de ácido aspártico con la consiguiente remoción del pro-dominio. El sitio activo está formado por un heterodímero que contiene una subunidad grande y una pequeña, de manera que la proteína caspasa activa es un tetrámero compuesto por dos heterodímeros (29,30).

Las caspasas “iniciadoras”, tales como la caspasa 8 y 9, se encuentran comúnmente como zimógenos de baja abundancia cuyos extensos pro-dominios median su oligomerización y autoactivación en respuesta a señales específicas corriente arriba

en la cascada apoptótica. Las caspasas iniciadoras, una vez activadas, procesan las formas precursoras de las caspasas efectoras, tales como las caspasas 3, 6 y 7, que se encuentran en cantidades abundantes y clivan sustratos celulares específicos que llevan a la muerte apoptótica (29-31).

#### **2.1.2.1.1.2. Familia de proteínas Bcl-2**

La familia de proteínas Bcl-2 incluye un gran número de proteínas que poseen un dominio de homología Bcl-2 (BH). Estructuralmente, las proteínas Bcl-2 pueden ser divididas en tres grupos: *proteínas anti-apoptóticas*, que incluyen, Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-xl; *proteínas pro-apoptóticas "BH-123"*, que llevan tres de los dominios de homología BH e incluyen Bax y Bak; y las *proteínas pro-apoptóticas "BH3-only"*, que solamente poseen el dominio BH3 necesario para su actividad pro-apoptótica, e incluyen Bid, Bad, Bim, Puma y Noxa entre otras (25,30,31).

Los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 están implicados en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas mitocondriales tales como citocromo c. Los miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas, como Bcl-2, parecen proteger a la célula de la apoptosis secuestrando proteínas pro-apoptóticas o interfiriendo con su actividad (30,31).

En ausencia de señales apoptóticas, la proteína pro-apoptótica Bax existe como un monómero citoplasmático inactivo que, ante estímulos apoptóticos, puede ser inducido a oligomerizar y migrar a la mitocondria por distintas proteínas BH3-only. Esta oligomerización en la mitocondria se correlaciona con la inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Se postula que Bax monomérico está plegado de forma que su dominio BH3 está escondido, pero es expuesto luego de la unión de una proteína BH3-only activadora. Este monómero de Bax activado interacciona con un segundo monómero, desplazando su dominio BH3 y generando así una reacción en cadena de activación y oligomerización de Bax. Bax oligomerizado genera, entonces, una estructura de poro alterando la integridad de la membrana mitocondrial externa. Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 secuestran Bax activado y/o proteínas BH3-only y así previenen esta reacción en cadena letal (30).

### **2.1.2.1.2. Activación de la apoptosis**

La apoptosis puede ser inducida en respuesta a muchos estímulos externos (“vía extrínseca”) que incluyen la activación de receptores de superficie, tales como Fas, TNFR1 (receptor de factor de necrosis tumoral 1), TRAIL-R1 (receptor1 de ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF), TRAIL-R2 y otros. La “vía intrínseca”, en cambio, es activada por la combinación de factores inductores de estrés extracelulares e intracelulares, tales como falta de factores de crecimiento, hipoxia, daño en el ADN e inducción de oncogenes. Las señales transducidas en respuesta a estas condiciones de estrés convergen principalmente en la mitocondria (25).

#### **2.1.2.1.2.1. Apoptosis activada por receptores de muerte**

Nos referiremos brevemente en primer lugar a la activación apoptótica mediada por receptores. La unión de los ligandos correspondientes (ligando Fas, TNF $\alpha$ , y TRAIL) a sus respectivos receptores de muerte causa la oligomerización y activación del receptor, que transmite la señal que resulta en la muerte celular apoptótica. Estos receptores de muerte tienen dos dominios de señalización distintivos: un dominio de muerte (DD) y un dominio efector de muerte (DED) que les permite interactuar con otras proteínas involucradas en la cascada de apoptosis. Los tres receptores inician el procesamiento de la pro-caspasa 8 a caspasa 8 activa, la cual activa directamente a la caspasa 3, que lleva a la fase final de la muerte celular apoptótica (26,29,31). Este mecanismo de activación de la muerte apoptótica tiene lugar, por ejemplo, en células del sistema inmune durante la respuesta citotóxica de los linfocitos T que expresan el ligando Fas en su superficie. Al unirse estos ligandos a los receptores Fas presentes en células blanco desencadenan la muerte por apoptosis de las mismas (32).

En algunos tipos de células, como por ejemplo los hepatocitos de los que nos ocuparemos en este trabajo de tesis, la existencia de una vía mitocondrial acelera la señalización apoptótica dependiente de caspasa 8. La caspasa 8 procesa al miembro pro-apoptótico Bid, generando tBid, el cual se transloca a la mitocondria y libera a Bax/Bak de la inhibición por Bcl-2 o Bcl-xl, causando la permeabilización mitocondrial y liberación de efectores de apoptosis mitocondriales como citocromo c (26).

### 2.1.2.1.2.2. Apoptosis activada por vía mitocondrial

En la vía mitocondrial de apoptosis, la activación de caspasa está ligada a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). En general hay dos clases de mecanismos responsables de esta MOMP durante la apoptosis, aquel que también involucra la membrana mitocondrial interna y aquel en el que participa solamente la membrana mitocondrial externa (26,28,30).

En el primer mecanismo se forma un poro en la membrana mitocondrial interna que permite el pasaje de agua y moléculas de hasta 1.500 Da. La mayoría de los modelos postulados para este poro involucran al transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna y al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana externa. La apertura de este poro, conocido como poro de transición de permeabilidad (PTP), puede ser inducida por múltiples estímulos y lleva a la pérdida del potencial de membrana interna a medida que los iones se equilibran a través de esta membrana y al hinchamiento de la matriz mitocondrial a medida que el agua entra. Esto último puede resultar en una hinchazón suficiente como para alterar la estructura de la membrana externa y producir MOMP (26,28).

La segunda clase de mecanismo involucra a las proteínas de la familia Bcl-2, tales como tBid, Bax y Bak, que promueven la formación de canales específicos que median la liberación del citocromo c a través de la membrana mitocondrial externa. Algunos estudios han implicado a la proteína VDAC de la membrana externa en el proceso de MOMP. VDAC, es requerido para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, producción de ATP celular y liberación de factores apoptogénicos, sirviendo así como un importante regulador del metabolismo y la apoptosis (33). Bax y Bak pueden unirse a VDAC con efectos posiblemente diferentes. Aunque se sugiere que la interacción Bax-VDAC causa MOMP, la interacción de Bak con la isoforma VDAC-2 parece ser inhibitoria. Una posibilidad es que la función de VDAC sea secuestrar pequeñas cantidades de cardiolipina y lípidos relacionados presentes en la membrana externa, formando microdominios con concentraciones apropiadas para permitir la permeabilización de la membrana por Bax o Bak activados (28).

Luego de producirse la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, se liberan proteínas del espacio intermembrana, incluido el citocromo c. El citocromo c en el citosol actúa como un activador de caspasa a través de su interacción con Apaf-1,

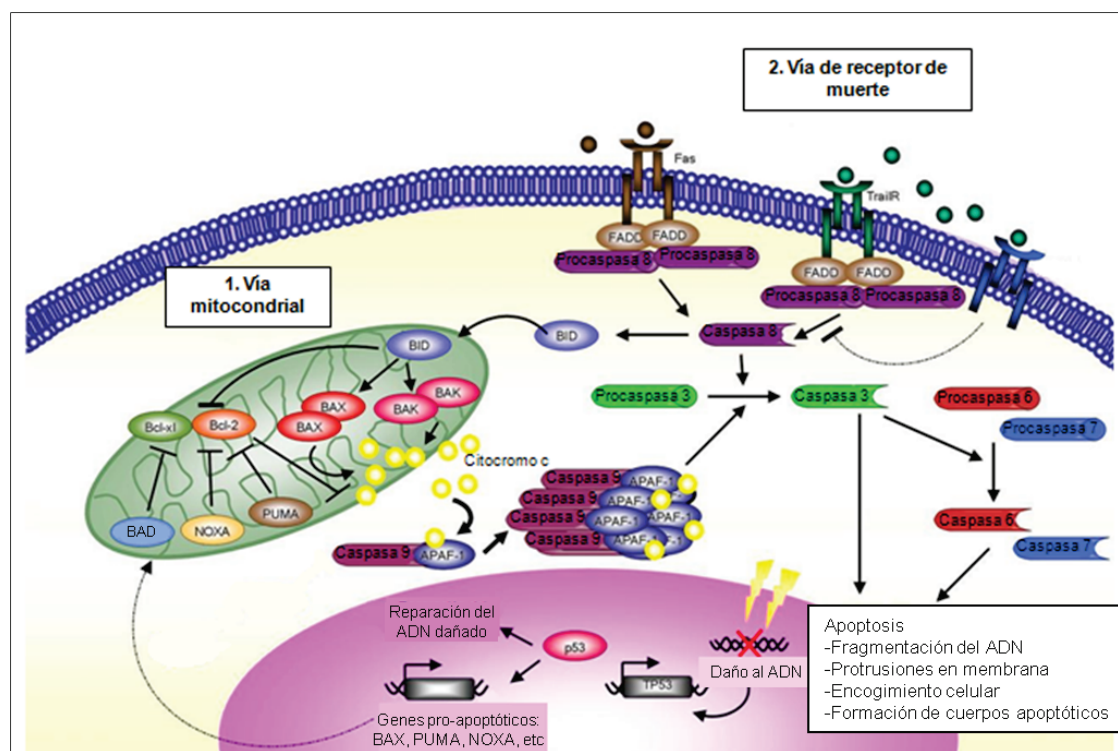
dATP y pro-caspasa 9 en un complejo proteico llamado apoptosoma. La caspasa 9 es procesada y activada cuando es parte del apoptosoma, donde puede procesar y activar caspasas ejecutoras como la caspasa 3 (25) (ver Figura 2.2).

Sin embargo, aun sin activación de caspasas, la permeabilización de la membrana generalmente resulta en la muerte celular tanto por la liberación de múltiples efectores de muerte independientes de caspasa, como por la pérdida de funciones mitocondriales esenciales (28).

### **2.1.2.1.3. Rol de p53 en la apoptosis**

p53 es un componente clave en la respuesta celular a estrés, y es activada por numerosas señales de estrés, muchas de las cuales ocurren durante la transformación maligna, incluyendo daños genotóxicos, activación de oncogenes, pérdida de contacto entre células, y privación de nutrientes y/o oxígeno. La respuesta a estrés de p53 depende del tipo celular y contexto así como de la extensión, duración y origen del estrés. En condiciones de estrés leve la respuesta de p53 consiste en reparar y prevenir el daño. En esos casos p53 puede inducir respuestas antioxidantes para disminuir los niveles de estrés oxidativo o participar en procesos de reparación del ADN, en simultáneo a un arresto transiente del ciclo celular y, de esta manera, permite a las células sobrevivir hasta que el daño sea resuelto. Sin embargo, en condiciones de estrés elevado y sostenido o en presencia de daño irreversible, p53 induce la activación apoptótica y la eliminación de células dañadas (24). P53 induce apoptosis a través de la activación de la transcripción de los genes que codifican las proteínas pro-apoptóticas Bax, Puma, Noxa, Bid, p53AIP1, y varios genes asociados a la apoptosis mediada por receptor, como Fas, Killer/DR5 y PIDD. P53 también puede reprimir la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Mcl-1 (20,35). Además, p53 puede tener un rol pro-apoptótico de una manera independiente de su actividad transcripcional, modulando o perturbando la función de proteínas implicadas en la maquinaria apoptótica (36). P53 es capaz de asociarse con la mitocondria bajo condiciones apoptóticas y tener un rol directo en el armado de la maquinaria apoptótica. Esta acción pro-apoptótica de p53 mitocondrial se debe a su habilidad autónoma para permeabilizar la membrana mitocondrial externa. Este efecto es logrado, en primer lugar, por su unión e inhibición de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-xl y Bcl-2, activando así indirectamente a las

proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak. En segundo lugar, p53 interacciona con Bak y con Bax citosólico induciendo la homodimerización y activación de dichas proteínas (37,38).



**Figura 2.2. Resumen esquemático de la maquinaria apoptótica. Actores involucrados en la vía mitocondrial y en la vía mediada por receptor de muerte.** En la vía mitocondrial, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa por la formación de poros formados por Bax y Bak, lo que lleva a la liberación de citocromo c y la consiguiente formación del apoptosoma que lleva a la activación de caspasa 3 y al desenlace de la apoptosis. En la vía mediada por receptor de muerte, la unión del ligando lleva a la oligomerización del receptor y al reclutamiento de caspasa 8 que finalmente llevará a la activación de caspasa 3. La caspasa 8 puede procesar a Bid e inducir su translocación mitocondrial, lo que llevará también a la activación de la vía mitocondrial. *Ilustración adaptada de (34).*

### 2.1.2.2. Muerte celular por necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un proceso de destrucción celular traumática, que se caracteriza por la ganancia de volumen celular, hinchazón y degradación de las organelas y ruptura de la membrana plasmática, lo que resulta en la pérdida de contenido intracelular (25). No hay formación de vesículas o “cuerpos apoptóticos” y a menudo se afectan grupos de células adyacentes. Las células necróticas remanentes son fagocitadas por macrófagos y generan respuestas inflamatorias *in vivo*. La necrosis es, usualmente, una consecuencia de una condición fisiopatológica, tal como una infección, inflamación o isquemia (25-27,31).

La necrosis ha sido interpretada durante muchos años como un modo accidental de muerte celular, y por lo tanto considerada como un proceso desregulado. Sin embargo, existe evidencia creciente de que la ejecución de la muerte por necrosis es un proceso regulado por una serie de vías de señalización (39-42). Se han descrito varias cascadas de señalización que están involucradas en la propagación de la muerte celular por necrosis. La serina/treonina quinasa RIP1 es una de las mediadoras claves de la muerte celular por necrosis (43). Otros mediadores involucrados en la propagación de la señal necrótica son las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el calcio (43,44). Tanto los niveles de ROS como los de calcio pueden causar daños en organelas y macromoléculas, lo que contribuye a la pérdida de la integridad celular. Además, muchos estímulos que conducen a la necrosis pueden inhibir la maquinaria apoptótica. El aumento del calcio citosólico también induce la activación de calpaína, lo que puede llevar al clivaje e inactivación de caspasas, mientras que las ROS pueden dirigirse al sitio activo de las caspasas e inactivarlas (43,44). Diversos estímulos que conducen a la necrosis pueden inhibir la maquinaria apoptótica. Tanto la apoptosis como la necrosis pueden ser dependientes de mitocondria pero de dos maneras diferentes. En ambos casos se liberan factores apoptogénicos del espacio intermembrana. En la apoptosis aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa por la formación de poros mediada por Bax y Bak, mientras que en la necrosis, el PTP es formado en la membrana interna de manera que la membrana externa se rompe al hincharse la matriz mitocondrial. Históricamente se ha propuesto que el PTP está involucrado en la apoptosis. Sin embargo se ha descubierto que la ciclofilina D mitocondrial, una enzima involucrada en la apertura del PTP, no es necesaria para varios tipos de apoptosis pero es sí crítica para algunos tipos de necrosis (45,46).

El tratamiento de células en cultivo con  $H_2O_2$  es un modelo establecido de necrosis en tejidos isquémicos. En respuesta a este estrés oxidativo, p53 se acumula en la matriz mitocondrial donde interacciona con ciclofilina D, regulador clave del PTP, conduciendo a la apertura del PTP y necrosis (46,47).

### **2.1.2.3. Otras formas de muerte celular**

Otra vía de muerte celular, a la cual nos referiremos aquí sólo concisamente, es la autofagia. Durante la autofagia los componentes celulares destinados al reciclado son secuestrados en el citoplasma por vesículas de doble membrana llamadas

autofagosomas. Luego de un proceso de maduración los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, lo que lleva a la degradación de sus contenidos (48).

La autofagia es esencialmente un mecanismo de limpieza intracelular que puede convertirse en un mecanismo de supervivencia durante la falta de nutrientes o durante otros tipos de estrés. En este proceso, la célula degrada sus organelas y componentes citosólicos para asegurar suficientes metabolitos cuando los nutrientes escasean (48). Los componentes involucrados en la vía de la autofagia (Atg), conservados desde las levaduras, incluyen a la serina/treonina quinasa Atg1 y sus subunidades regulatorias asociadas, Atg13 y Atg17 (49). El proceso autofágico progresa hacia una forma de muerte celular si las condiciones de la célula no mejoran en el tiempo o cuando la autofagia está patológicamente sobreactivada (50). El descubrimiento de genes relacionados a la autofagia, primero en levaduras y luego en humanos, ha aumentado enormemente el entendimiento molecular de los mecanismos que están involucrados en el control de la misma (44,51). El producto proteico del gen supresor de tumor Beclina 1 es el homólogo en mamíferos de Atg6 de levadura (44,51,52). Existe evidencia de una interconexión entre la apoptosis y la autofagia a nivel molecular, particularmente en relación a la familia Bcl-2. Además de su rol en inhibir la apoptosis, Bcl-2 es capaz de inhibir la autofagia y la muerte celular por autofagia (44,53,54). Este efecto es mediado a través de la habilidad de Bcl-2 de interactuar con la proteína clave en la formación del autofagosoma Beclina 1. De hecho, se ha demostrado que Beclina 1 es una particular proteína BH3-only que interactúa con distintos miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w y Mcl-1 (44,46,55,56).

P53 tiene un rol complejo y dual en la regulación de la autofagia. P53 localizada en el núcleo puede inducir autofagia al activar la transcripción de genes inductores de autofagia (como DRAM y sestrinas 1 y 2). Otros genes blancos de p53 como Bax y Puma también pueden regular positivamente la inducción de autofagia (23). Por otro lado, la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) por p53 y la subsiguiente inhibición de mTOR puede llevar a la autofagia (57). Algunos aspectos de esta regulación serán discutidos en secciones posteriores. Sin embargo p53 citoplasmático también se ha asociado a la inhibición de autofagia por mecanismos menos claros (23).

### 2.1.3. Estrés oxidativo y muerte celular

El término estrés oxidativo da cuenta de los procesos deletéreos que resultan de un desbalance entre la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y/o especies reactivas del nitrógeno (RNS) y las defensas antioxidantes. Pequeñas fluctuaciones en la concentración de estos oxidantes pueden jugar un rol en la señalización intracelular, mientras que incrementos descontrolados en su concentración llevan a reacciones en cadena mediadas por radicales libres que afectan indiscriminadamente a proteínas, lípidos, polisacáridos y ADN. Estas reacciones pueden conducir a la muerte de la célula por activación de alguno/s de los mecanismos de muerte mencionados anteriormente (58).

Las ROS involucran a una variedad de moléculas y radicales libres (especies químicas con un electrón desapareado) derivadas del oxígeno molecular. La reducción del oxígeno molecular por un electrón genera intermediarios relativamente estables, estas especies incluyen el anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , el producto de la reducción por un electrón del oxígeno que es el precursor de la mayoría de las ROS y el mediador de las reacciones oxidativas en cadena. La dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual a su vez puede ser totalmente reducido a agua o parcialmente reducido al radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ), uno de los oxidantes más fuertes en la naturaleza. La formación de  $OH\cdot$  es catalizada por metales de transición reducidos, los cuales a su vez pueden ser re-reducidos por  $O_2^{\cdot-}$  propagando este proceso (59). Además, el  $O_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con otros radicales, incluyendo radical óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), en una reacción controlada por la tasa de difusión de ambos radicales. El producto, peroxinitrito, es también un oxidante muy poderoso. Los oxidantes derivados de  $NO\cdot$  se conocen como especies reactivas del nitrógeno (58,60).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial constituye la principal fuente de ROS intracelular, sin embargo otros componentes celulares tales como enzimas unidas al retículo endoplasmático, sistemas de enzimas citoplasmáticas y la superficie de la membrana plasmática también contribuyen. La actividad de múltiples sistemas enzimáticos, como el sistema del citocromo P450 monooxigenasa, la xantina oxidoreductasa, la óxido nítrico sintasa y las NADPH oxidasas presentes sobre la membrana celular de las células polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales pueden también intervenir en la generación de ROS (58,61-63).

### 2.1.3.1. Generación de ROS por la cadena de transporte de electrones mitocondrial

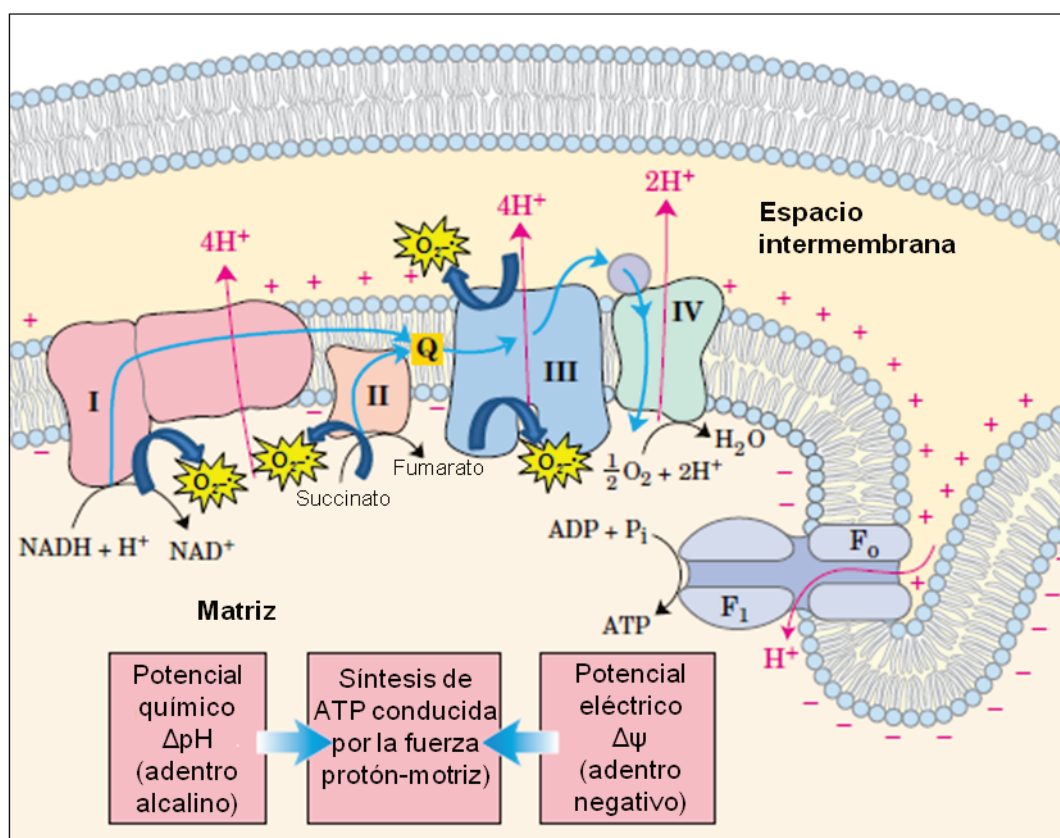
La cadena de transporte de electrones contiene varios centros redox que pueden liberar electrones que reaccionen con el oxígeno, constituyendo la fuente primaria de  $O_2^{\cdot -}$  en la mayoría de los tejidos (64).

El NADH y el  $FADH_2$  generados durante la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos proveen energía para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa que se da a nivel de la cadena transportadora de electrones (Figura 2.3). La cadena respiratoria mitocondrial consiste en una serie de transportadores de electrones que actúan secuencialmente, y la mayoría de ellos son proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos capaces de aceptar uno o dos electrones. Otros tipos de moléculas transportadoras de electrones que participan en la cadena respiratoria son la ubiquinona y los citocromos. El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona. El complejo II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa) transfiere electrones del succinato a la ubiquinona. Esta última puede también ser reducida por electrones cedidos por diferentes deshidrogenasas que contienen  $FADH_2$  y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. El complejo III (ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa) transporta electrones de la ubiquinona reducida ( $QH_2$ ) al citocromo c. Finalmente el complejo IV (citocromo c oxidasa) completa la secuencia transfiriendo electrones del citocromo c al oxígeno molecular ( $O_2$ ). Por cada par de electrones transferidos al  $O_2$  a través de los complejos I, III y IV, se bombean diez protones al espacio intermembrana lo que genera un gradiente protónico llamado fuerza protón-motriz. La energía almacenada en este gradiente tiene dos componentes: la energía potencial química dada por la diferencia de concentración de una especie química ( $H^+$ ), y la energía potencial eléctrica que resulta de la separación de cargas. Esta fuerza protón-motriz conduce la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen pasivamente de vuelta a la matriz mitocondrial a través de un poro asociado con la ATP sintasa (complejo V) (65-67).

Cuando en este proceso se da un aumento en la disponibilidad de equivalentes de reducción, generando un ambiente intramitocondrial altamente reductor, los distintos componentes respiratorios, incluyendo flavoproteínas, clusters hierro-azufre y ubisemiquinona, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno.

Además, la mayoría de los pasos en la cadena respiratoria involucran reacciones de un electrón, favoreciendo la reducción monovalente del oxígeno (58,68).

Los complejos respiratorios I, II y III contienen sitios donde los electrones pueden reducir al oxígeno, resultando en la formación de superóxido. Mientras que los complejos I y II producen ROS solamente en la matriz mitocondrial, el complejo III puede producir ROS sobre ambos lados de la membrana mitocondrial interna, siendo el sitio principal de generación de ROS (64,69). La contribución relativa de cada sitio a la producción total de  $O_2^{\cdot -}$  varía de órgano a órgano y también depende de si la mitocondria está respirando activamente (estado 3) o si la cadena respiratoria está altamente reducida (estado 4) (70).



**Figura 2.3. La cadena de transporte de electrones como fuente de ROS.** Los complejos mitocondriales I y II usan los electrones donados del NADH y  $FADH_2$  para reducir a la coenzima Q (ubiquinona). La coenzima Q cede los electrones al complejo III, donde son transferidos al citocromo c. El complejo IV usa los electrones del citocromo c para reducir el oxígeno molecular a agua. La acción de los complejos I, III y IV producen un gradiente de  $H^+$ , y la energía del mismo es usada para fosforilar ADP por la ATP sintasa. Los complejos I, II y III producen superóxido a partir de la reducción incompleta del oxígeno a superóxido. Mientras que los complejos I y II producen superóxido solamente dentro de la matriz mitocondrial, el complejo III produce superóxido tanto en la matriz como en el espacio intermembrana. *Ilustración adaptada de (67).*

En ausencia de ADP, el movimiento de  $H^+$  a través de la ATP sintasa cesa, y se acumula el gradiente de  $H^+$  llevando al enlentecimiento del flujo de electrones y a una cadena respiratoria más reducida (estado 4 de respiración). Como resultado, la concentración fisiológica de  $O_2^{\cdot-}$  aumenta (58). Por lo tanto, la generación de  $O_2^{\cdot-}$  por la cadena respiratoria es dependiente del  $\Delta\Psi$ , y está favorecida durante el estado 4. Por otro lado, los desacoplantes que disipan el  $\Delta\Psi$  inhiben este proceso (45,71,72).

### 2.1.3.2. Defensas antioxidantes intracelulares

La célula posee diversos mecanismos para protegerse de los efectos nocivos de las ROS, conformados por defensas antioxidantes enzimáticas y defensas no enzimáticas. Entre las defensas no enzimáticas se encuentran compuestos con propiedades antioxidantes intrínsecas como la vitamina C y E y el glutatión. Las defensas enzimáticas incluyen, fundamentalmente, a las superóxidos dismutasas (SODs), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (73).

Las SODs son un grupo de enzimas que dismutan efectivamente el  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . En mamíferos han sido caracterizadas dos SODs altamente compartimentalizadas, la SOD1 ó CuZnSOD, que es un homodímero que contiene un mol de Cu y uno de Zn y se encuentra exclusivamente en citoplasma, y la SOD2 ó MnSOD que es homotetramérica y tiene localización mitocondrial (74,75). El  $H_2O_2$  derivado del  $O_2^{\cdot-}$  es transformado en agua por la glutatión peroxidasa y por la catalasa. La catalasa, la principal enzima neutralizante de  $H_2O_2$ , se localiza mayoritariamente en peroxisomas, excepto en corazón donde se localiza exclusivamente en mitocondrias (76,77). La glutatión peroxidasa, en cambio, está presente en citosol. Esta enzima acopla la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  con la oxidación del glutatión reducido, GSH, a glutatión disulfuro, GSSG (forma oxidada), el cual es reducido nuevamente a GSH, lo que depende, directamente, de su reducción enzimática que, indirectamente, está asociada a la actividad de la vía de las pentosas fosfato (73). El glutatión es un tripéptido de L-glutamato, L-cisteína y glicina. La oxidación de los grupos sulfhidrilos de la cisteína une dos moléculas de glutatión con un puente disulfuro para formar GSSG. La glutatión reductasa dependiente de NADPH cataliza la recuperación del glutatión (78). En mamíferos, el glutatión es el antioxidante intracelular más concentrado. La mayor parte del glutatión se encuentra en el citosol, y en menor proporción en mitocondria y retículo endoplasmático (79). La depleción del

glutación mitocondrial ha sido asociada a la muerte celular (80). La mayoría del glutatión intracelular se encuentra en la forma reducida GSH. Bajo condiciones de estrés oxidativo, la relación GSH/GSSG disminuye. La oxidación del GSH además de ocurrir por acción directa con las especies reactivas, puede ocurrir por vía enzimática (81). Cabe mencionar también a las hemo oxigenasas como enzimas antioxidantes que utilizan el O<sub>2</sub> molecular y NADPH para remover el grupo hemo que es un pro-oxidante y liberar hierro, biliverdina (antioxidante) y monóxido de carbono (73).

El metabolismo de la glucosa también es importante para la reducción de los niveles de ROS a través del direccionamiento de la glucosa-6-fosfato (G6P) hacia la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfatos (ox-PPP). El primer paso regulatorio clave de la ox-PPP es catalizado por la glucosa6P-deshidrogenasa (G6PDH) y es uno de los dos pasos en esta vía donde se genera NADPH. Entre otras cosas, el NADPH es requerido para la conversión de GSSG a GSH por la glutatión reductasa, como antes mencionamos. Por lo tanto la G6PDH juega un rol importante en la prevención de apoptosis inducida por ROS (48).

### **2.1.3.3. Rol de ROS en la muerte celular programada**

Aunque en condiciones normales hay un balance entre la formación de ROS y las defensas antioxidantes, en varios escenarios patológicos las defensas antioxidantes se vuelven insuficientes resultando en estrés oxidativo. A menudo estas situaciones de desbalance llevan a la inducción de apoptosis y a la muerte celular.

En primer lugar, un aumento en la formación mitocondrial de ROS conduce a la activación de la vía mitocondrial de apoptosis, al aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a través de la apertura del PTP. No se conoce exactamente el mecanismo por el cual el estrés oxidativo lleva a la apertura de este poro, pero se cree que actuaría directamente sobre ANT. Como resultado de este proceso, el citocromo c se mueve desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma donde induce la activación de caspasas y al desarrollo de la apoptosis (82).

Las especies reactivas del oxígeno, además, pueden iniciar cascadas de señalización así como afectar directamente ADN, proteínas y lípidos relevantes para la apoptosis. Algunas proteínas son susceptibles a la regulación redox y a la oxidación de sus cisteínas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De esta forma este oxidante puede cambiar el estado de activación de enzimas involucradas en diferentes procesos. Por ejemplo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede

llevar a la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), ERK, JNK y p38, a través de la activación de una MAPKKK. ERK, JNK y p38 se encuentran involucradas en diferentes procesos, como proliferación, diferenciación, adaptación a estrés y apoptosis. Específicamente la activación de JNK mediada por ROS está fuertemente relacionada a la muerte celular por apoptosis (35). Por otro lado, las ROS pueden estimular la producción de otras especies de moléculas reactivas tales como las RNS, que pueden nitrosilar y regular positiva o negativamente la actividad de proteínas inductoras de apoptosis (48). Se han descrito otros roles más directos de las ROS en la apoptosis, por ejemplo, se ha demostrado que, en algunos contextos, para activar totalmente las caspasas, el citocromo c citosólico debe ser oxidado por ROS (83).

Uno de los blancos de las ROS en la activación de la apoptosis es p53. La inducción de esta proteína por ROS se puede producir indirectamente, a través del daño al ADN o por modulación directa del estado redox de una cisteína crítica en su dominio de unión al ADN (35). El papel de p53 en el estrés oxidativo es complejo ya que puede ejercer roles tanto anti-oxidantes como pro-oxidantes. P53 puede inducir transcripcionalmente a TIGAR (del inglés *Tp53-inducible glycolysis and apoptosis regulator*) el cual puede actuar a nivel glucolítico y promover el direccionamiento hacia la vía de las pentosas fosfatos, contribuyendo así, a la producción de NADPH. En el mismo sentido, p53 también puede inducir la expresión de Glutaminasa 2 que estimula la producción de glutamato, un precursor de GSH, y de las proteínas sestrinas, que actúan como antioxidantes protegiendo a las células del daño producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa 1 (GPX1), la aldehído deshidrogenasa 4 (ALDH4) y la MnSOD también son blancos transcripcionales de p53 (84,85). Existe otra conexión en sentido inverso entre ROS y p53, ya que p53 puede regular el estado redox promoviendo la producción de ROS, lo que finalmente lleva a la activación apoptótica (86). P53 puede en este sentido inhibir la expresión de GPX1, ALDH4 y MnSOD aumentando el estrés oxidativo. Por otro lado, un rol menos directo de p53 es la estimulación de la fosforilación oxidativa a través de la inducción de genes involucrados en este proceso, lo cual conduce a la generación de ROS a través de la respiración mitocondrial. Es probable que bajo condiciones normales o de estrés leve p53 aumente su respuesta antioxidante protegiendo a la célula de un potencial daño

oxidativo. Sin embargo, bajo condiciones de estrés severo, p53 pasaría a promover el aumento de ROS y facilitar la apoptosis (22-24).

## **2.2. Quinasas implicadas en vías de regulación de la viabilidad en células eucariotas en respuesta a estrés nutricional: de las levaduras a las células tumorales**

La glucosa es la fuente de energía más común en las células eucarióticas. Su utilización depende de su metabolismo secuencial en la glucólisis seguida de la respiración mitocondrial, aunque la contribución de cada una de estas etapas está determinada por el tipo celular y su estado, normal ó de transformación cancerígena (87-89). La restricción de glucosa desata vías regulatorias de la supervivencia celular, muchas de las cuales son comunes a todos los eucariotas y en las que están implicadas proteínas quinasas constituyendo un intrincado entramado regulatorio (87,88,90). El estrés por baja glucosa en los tejidos de mamíferos puede observarse tanto en condiciones fisiológicas, como el ayuno ó el envejecimiento, como patológicas, como la isquemia, por nombrar algunos ejemplos. Además, resulta importante entender su relevancia en el control del crecimiento tumoral, debido a la fuerte dependencia a la glucosa que en general presentan los tumores (87,88). En las páginas subsiguientes nos referiremos a algunas de las vías de las quinasas más importantes intervinientes en la respuesta a la falta de glucosa en células eucarióticas.

### **2.2.1. Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico**

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) es uno de los miembros mejor caracterizados de la superfamilia de proteínas quinasas. La fosforilación de sustratos nucleares y citoplasmáticos mediados por PKA es crítica para múltiples funciones celulares, incluyendo metabolismo, diferenciación, transmisión sináptica, actividad de canales iónicos, crecimiento y desarrollo. PKA es un homotetrámero que consiste de dos subunidades catalíticas (C) mantenidas en una conformación inactiva por un dímero de subunidades regulatorias (R). La unión de AMPc a las subunidades R de PKA libera la subunidad C activa que, en estas condiciones, puede fosforilar sustratos vecinos (91-96).

La identificación de PKA como el principal intermediario de la acción del AMPc dilucida el mecanismo por el cual el receptor acoplado a una proteína G asociada a una

adenilato ciclasa media los efectos biológicos de hormonas y neurotransmisores. Este panorama ha ganado en complejidad desde el descubrimiento de que PKA se concentra en membranas y organelas celulares a través de la interacción directa con distintas proteínas de anclaje a PKA (AKAPs). La localización de PKA en distintos compartimientos subcelulares, en proximidad a sus sustratos, dirige y amplifica los efectos biológicos de la molécula de AMPc altamente difusible. Además, la caracterización de una adenilato ciclasa soluble que se acumula en sitios intracelulares específicos, incluyendo mitocondrias, sugieren fuertemente la presencia de unidades de transducción donde el AMPc puede ser localmente generado focalizando así vías de señalización en localizaciones intracelulares discretas (92).

Las células eucariotas expresan múltiples formas de subunidades regulatorias y catalíticas de PKA que se ensamblan como diferentes isoformas de holoenzimas. Las formas funcionales y bioquímicas de las holoenzimas PKA son determinadas por la estructura y propiedades de las subunidades R. La holoenzima PKA de tipo-I contiene subunidades RI (RI $\alpha$  o RI $\beta$ ) y es principalmente citoplasmática, mientras que la holoenzima de tipo-II contiene subunidades RII (RII $\alpha$  o RII $\beta$ ) y está compartimentalizada en distintas estructuras subcelulares y anclada a compartimientos. RI $\alpha$  y RII $\alpha$  son ubicuas, mientras que RII $\beta$  y RI $\beta$  son expresadas predominantemente en tejido endócrino, cerebro, grasa y tejido reproductivo. Además de su distribución y expresión distintiva, las subunidades R difieren en sus propiedades bioquímicas y regulatorias (92).

La ubicuidad de funciones de PKA puede rastrearse evolutivamente ya en eucariotas inferiores. En efecto, en la levadura gemante *Saccharomyces cerevisiae* la estimulación de PKA por AMPc regula una variedad de funciones celulares, incluyendo el metabolismo de distintas fuentes de carbono, el crecimiento, la transcripción de genes, la adaptación a la privación de glucosa o sacarosa y la morfología celular. En este sentido, PKA es la quinasa principal en la regulación de la respuesta a glucosa en levaduras, mediando los cambios más importantes en el patrón de expresión génica ante modificaciones en la disponibilidad de fuente de carbono, fundamentalmente a través de los factores transcripcionales Msn2/4 (97).

La localización de PKA en compartimientos celulares específicos a través de su interacción con proteínas de unión a PKA representa un mecanismo conservado, que la

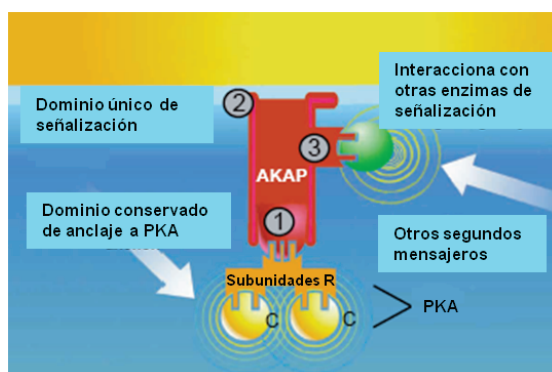
célula adopta en respuesta a cambios rápidos y drásticos en el medio extracelular (92). PKA juega un rol crítico en la fisiología mitocondrial de mamíferos. PKAc, RI y RII han sido aislados de mitocondrias purificadas. Varias proteínas mitocondriales son sustratos de PKA, incluyendo la subunidad del complejo I de 18-kDa codificada en el núcleo (NDUFS4), la proteína pro-apoptótica Bad y polipéptidos todavía no identificados. La fosforilación de NDUFS4 por PKA aumenta la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales. La identificación y caracterización de estos sustratos de PKA sugieren su rol regulatorio de funciones mitocondriales (92).

#### **2.2.1.1. Proteínas de anclaje de PKA (AKAPs)**

Las AKAPs son una familia de más de 50 proteínas estructuralmente muy diversas que tienen en común la habilidad de unir PKA. Todas las AKAPs contienen un dominio de unión a PKA y un dominio de “anclaje” que dirige el complejo PKA-AKAP a estructuras subcelulares definidas. Además de estos dos dominios, varias AKAPs también interactúan con otras proteínas involucradas en distintas vías de señalización. La compartimentalización de receptores, adenilato ciclasas y PKA por AKAPs, así como la generación de *pools* locales de AMPc dentro de la célula por la acción coordinada de adenilato ciclasas y de fosfodiesterasas, genera un alto grado de especificidad en la señalización mediada por PKA, a pesar de la amplia especificidad de sustrato de PKA. Las AKAPs contribuyen a la especificidad ubicando a PKA cerca de sustratos específicos, así como a la versatilidad ensamblando complejos de señalización multienzimáticos, incluyendo quinasas distintas de PKA, ser/treoninas fosfatasa y fosfodiesterasas. De este modo se generan sitios intracelulares donde distintas vías de señalización convergen y son localmente atenuadas o amplificadas. A través de este rol esencial en la integración temporal y espacial de efectores y sustratos, las AKAPs proporcionan un alto nivel de especificidad y regulación temporal a la vía de señalización AMPc/PKA (93,94).

Las AKAPs contienen una hélice anfipática de 14-18 residuos, que se une al dominio de dimerización N-terminal de la subunidad R de PKA. Aunque la mayoría de las AKAPs que han sido identificadas se unen a RII, también han sido caracterizadas varias AKAPs que se unen a RI (95). La disrupción del anclaje de PKA ha sido lograda experimentalmente usando Ht31, un péptido que contiene la región  $\alpha$  helicoidal anfipática de una AKAP (96) (ver representación en Figura 2.4).

Específicamente, en hepatocitos se ha demostrado que la interacción de PKA con las AKAPs es necesaria para que la estimulación de PKA tenga un efecto anti-apoptótico durante la injuria isquémica (99). En hepatocitos se ha descrito la presencia de la AKAP WAVE-1, miembro de la familia de proteínas Wiskott Aldrich (100) y de AKAP350 (101).



**Figura 2.4.** Representación esquemática de un complejo de señalización AKAP. El modelo ilustra los motivos funcionales de las AKAPs. (1) Un dominio de unión a RII conservado interactúa con la superficie de unión a AKAP del dímero de subunidades reguladoras de la holoenzima PKA. (2) Un dominio blanco único dirige el complejo de señalización AKAP a localizaciones subcelulares discretas. (3) También se encuentran presentes sitios de unión a otras enzimas de señalización, tales como quinasas y fosfatasas. *Ilustración adaptada de (98).*

### 2.2.1.2. Intervención de PKA en complejos/vías que modulan metabolismo y supervivencia celular

Diversos trabajos han descrito la intervención de PKA en la regulación de la supervivencia o muerte celular en respuesta a distintas señales metabólicas y de crecimiento. Dependiendo de la situación y del tipo celular, la misma puede inducir efectos opuestos. Está reportado que en células de linfoma-T S49 y de adenocarcinoma mamario MCF7 los glucocorticoides activan PKA, la cual fosforila a la proteína proapoptótica Bim, induciendo de esta forma, apoptosis en dichas células (102,103). Por otro lado, IL-3 media la activación de PKA anclada a mitocondria en células hematopoyéticas FL5.12, lo que conduce a la fosforilación de Bad y a la inhibición de apoptosis (104). Está reportado también que la proteína de anclaje WAVE-1 actúa como un nexo estructural entre el metabolismo de la glucosa y la maquinaria de apoptosis en la membrana externa mitocondrial de hepatocitos, en donde nuclea un complejo que contiene PKA, la proteína proapoptótica Bad, glucoquinasa y la fosfatasa PP1. En este contexto, la fosforilación de Bad por PKA es requerida para el metabolismo de la glucosa y es además una señal pro-supervivencia en presencia de glucosa (100). Han sido designados otros roles para PKA en mitocondria también en relación con la supervivencia celular. Estudios de los últimos años demuestran la producción interna de AMPc y la activación de PKA en mitocondrias de hígado, en donde PKA regula la

actividad de la cadena respiratoria, ajustando así la bioenergética celular a diferentes situaciones metabólicas (105). En concordancia con esto, la activación de PKA mitocondrial inducida por isquemia en cardiomiocitos lleva a la fosforilación de subunidades de la citocromo c oxidasa, lo que conduce a la disminución de la actividad de este complejo produciendo una disminución en la respiración y un incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno, explicando de esta forma la injuria necrótica del corazón *in vivo* (106).

Este rol de PKA en la función mitocondrial está conservado en los eucariotas inferiores. Recientemente se describió que la actividad respiratoria mitocondrial de *S. cerevisiae* durante la escasez de glucosa es sensible a la señalización por AMPc/PKA; además, la activación de una de las subunidades de PKA en estas levaduras en fase estacionaria es suficiente para llevar a la célula a muerte apoptótica a través de producir disfunción mitocondrial y aumento de la producción de ROS (107).

Por otro lado, se ha identificado en distintas líneas celulares una AKAP (AKAP121) que contribuiría a la regulación de la actividad metabólica mitocondrial localizando en mitocondrias proteínas que estimulan la actividad de la cadena respiratoria (108). Se ha estimado que la distribución relativa de la actividad de PKA en matriz, espacio intermembrana y membrana externa es de 79%:8%:13%, respectivamente. Desde allí es capaz de fosforilar y modular la actividad de numerosos sustratos mitocondriales. PKA fosforila las subunidades subunidades I, IV y V del complejo IV, disminuyendo la actividad del complejo en algunos casos (106,109-111), y estimulándola en otros (105). Esta quinasa también es capaz de fosforilar la subunidades estructurales de 18 y 6-10 kDa del complejo I lo que promueve la actividad de dicho complejo disminuyendo los niveles de ROS (111-115). Por otra parte, el sistema AMPc/PKA puede regular también la biogénesis del sistema respiratorio mitocondrial a través de la modulación de CREB (del inglés *cAMP response element (CRE) binding protein*). PKA fosforila y activa a CREB, el cual activa la expresión transcripcional de PGC-1 $\alpha$ . PGC-1 $\alpha$  promueve la expresión y actividad de los factores de transcripción NRF1 y NRF2 que controlan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas que forman parte de los complejos respiratorios y de la ATP sintasa, y de proteínas involucradas en la importación mitocondrial de estos componentes respiratorios que son codificados en el núcleo. Además CREB es importado a

mitocondria en donde es capaz de estimular la expresión de genes que codifican proteínas de los complejos respiratorios que están contenidos en el ADN mitocondrial (113,116).

La vía de PKA se ha vuelto también de gran interés para los estudios de envejecimiento, dado que mutaciones que causan la reducción en la señalización por PKA aumentan la longevidad en levaduras y en ratones. En efecto, en *S. cerevisiae*, mutaciones que generan una vía AMPc-PKA constitutivamente activa disminuyen la longevidad del organismo (117). Por otro lado, en esta levadura y como mencionamos anteriormente, PKA inhibe la transcripción de genes antioxidantes regulando la localización de factores de transcripción Msn2/4, homólogos funcionales de la familia FoxO, claves en la respuesta a estrés (118). En la levadura patógena *Candida albicans*, se ha descrito que la vía Ras/PKA está involucrada en la activación de apoptosis (119). En ratones, se ha demostrado que la delección de la subunidad RII $\beta$  de PKA extiende el tiempo de vida de los mismos y disminuye la aparición de marcadores asociados al envejecimiento (obesidad, desarrollo tumoral, hipertrofia cardíaca, etc) (120).

### **2.2.2. Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)**

AMPK (SNF1 en levaduras) es una serina/treonina quinasa, conservada en todos los eucariotas, fundamental en la adaptación celular a distintos tipos de estrés que disminuyen los niveles de ATP, como ausencia de glucosa, hipoxia y estrés oxidativo (121). Estructuralmente, es un heterotrímero conformado por una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades regulatorias  $\beta$  y  $\gamma$ . En mamíferos existen dos genes que codifican la subunidad catalítica de AMPK $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), dos genes para la subunidad  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y tres genes para la subunidad  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ ). La expresión de estas isoformas es específica de tejido y se han descrito diferencias funcionales asociadas a la subunidades  $\alpha$  en base a la respuesta a AMP y a la localización nuclear de AMPK $\alpha 2$  comparada a la  $\alpha 1$  (122). AMPK es un sensor de energía intracelular: el aumento en los niveles celulares de la relación AMP/ATP promueve la activación de AMPK a través de la unión alostérica de AMP a la subunidad  $\gamma$  y fosforilación mediada por quinasas de la subunidad  $\alpha$  (123-125). AMPK también puede ser activada a través de mecanismos menos claros, por citoquinas tales como IL-6, cannabinoides, fármacos como el antidiabético metformina, y productos naturales como el resveratrol. Otro activador de

AMPK es el compuesto permeable 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranósido (AICAR), que es metabolizado por una adenosina quinasa a 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido monofosfato (ZMP), el cual actúa como un análogo a AMP (87). Luego de su activación, AMPK fosforila e inactiva enzimas metabólicas involucradas en vías que consumen ATP, como acetilCoA-Carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, y mTOR; y, por otro lado, activa procesos que generan ATP, como la oxidación de ácidos grasos y la captación y oxidación de glucosa a través de la activación de la PFK2 e inducción de GLUT1, GLUT4 y hexoquinasas (126). La activación enzimática de AMPK se da por fosforilación de su Thr172, localizada dentro del *loop* de activación sobre la subunidad  $\alpha$ . La estructura completa del complejo de subunidades de esta quinasa fue recientemente resuelta en *S. cerevisiae* (127), y los estudios en este organismo han contribuido al entendimiento del mecanismo de su regulación. La fosforilación del sitio Thr172 es esencial para su actividad y puede ser catalizado por cuatro Thr172-AMPK quinasas, la serina/treonina quinasa LKB1, (cuyo ortólogo, Sak1, también se identificó en levaduras), las dos formas de la quinasa dependiente de calcio calmodulina, CaMKK $\alpha$  y CaMKK $\beta$ , y un miembro de la familia de MAPKKK, TAK1. LKB1 parece ser la más importante de las quinasas de AMPK y funciona también como un supresor tumoral, cuya mutación resulta en el síndrome de Peutz-Jeghers, el cual genera una predisposición a cánceres de colon, páncreas, mama y otros (126). Se ha demostrado que LKB1 puede ser activada por aumento de ROS, llevando así a la activación de AMPK independientemente de los niveles AMP/ATP (128). Además de la Thr172, han sido identificados otros sitios de fosforilación sobre las subunidades  $\alpha$ : AMPK  $\alpha$ 1-Ser485 (equivalente a AMPK  $\alpha$ 2-Ser491),  $\alpha$ 1-Ser497 y  $\alpha$ 1-Ser173. Los mismos han sido descritos tanto como posibles sitios de autofosforilación, así como blancos putativos para las proteínas quinasas Akt o PKA. Dependiendo del contexto y tipo celular, la fosforilación en estos residuos puede prevenir estéricamente la fosforilación en la Thr172, impidiendo de esta forma la activación de AMPK (87,129). La fosforilación en la Thr172 también está sujeta a regulación por fosfatasas, entre las que se encuentran la PP1, PP2A y PP2C (130,131).

Muchos sustratos de AMPK pueden estar involucrados, directa o indirectamente, con el balance oxidativo y afectar así la supervivencia celular. Por ejemplo, AMPK

puede regular la desacetilación de factores de transcripción como FoxO y PGC1 $\alpha$  indirectamente a través de la activación de la desacetilasa Sirt1, dichos factores de transcripción regulan genes del metabolismo oxidativo, como la subunidad IV de la citocromo c oxidasa y otros genes involucrados en respuesta a estrés (87). Además, AMPK puede promover el metabolismo oxidativo a través de la fosforilación y activación directa de PGC1 $\alpha$ , que, como ya mencionamos antes, es un factor de transcripción que induce la expresión de genes que codifican componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial (113).

### 2.2.2.1. AMPK coordina el control del crecimiento celular

La activación de AMPK puede causar el arresto del ciclo celular. Dicho mecanismo involucra la acumulación de p53 que lleva a la inducción y acumulación del inhibidor del ciclo celular, p21. En efecto, AMPK induce la acumulación de la proteína supresor de tumor p53, estabilizándola, por fosforilación en el residuo Ser-15 (132-134) o promoviendo su expresión a nivel transcripcional (135). Este hecho se ha puesto en evidencia en células madres neuronales (NSCs) (132), y en HepG2, en donde la activación de AMPK induce arresto del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G1 en forma dependiente de p53 (136).

AMPK también puede inhibir indirectamente la síntesis de la mayoría de las macromoléculas celulares, inhibiendo de esta manera el crecimiento celular a través de la inhibición de la vía de mTOR (del inglés *mammalian Target of Rapamycin*). AMPK fosforila a TSC2, en un sitio distinto al que lo hace la quinasa Akt, y dicha fosforilación aumenta la actividad del complejo inhibitorio TSC1-TSC2 llevando así a la inhibición de mTOR. Además, como otra función de mTOR es reprimir la autofagia, la activación de AMPK puede entonces inducir autofagia suprimiendo mTOR. Por tanto, la vía LKB1-AMPK-TSC2-mTOR es postulada como una habilidad adaptativa de las células normales para reciclar la energía cuando los nutrientes escasean (87,137-141).

Es de interés mencionar que puede existir una regulación inversa p53-AMPK. Es decir, AMPK es capaz de actuar tanto cascada arriba como cascada abajo de p53. Por un lado, la subunidad AMPK $\beta$  es un blanco transcripcional de p53. Por otro lado, y en el mismo sentido, p53 promueve la expresión de sestrinas, las cuales pueden activar a AMPK. De esta manera p53 puede inhibir indirectamente a mTOR e inducir autofagia (142). Otro hecho remarcable es que en hepatocarcinomas AMPK puede activar

indirectamente a p53 vía su acetilación a través de la inhibición de la desacetilasa Sirt1. Sin embargo, en la mayoría de los tejidos AMPK activa a Sirt1 y aumenta la desacetilación de p53, esto indica que la habilidad de AMPK para activar a p53 depende del contexto y del tipo celular (142).

#### **2.2.2.2. Distintos roles de AMPK en la regulación de la supervivencia celular**

La señalización por AMPK parece configurar una red que conecta el estado nutricional con la maquinaria apoptótica en diversas células de cáncer. De hecho, diferentes proteínas pro-apoptóticas BH3-only, y proteínas anti-apoptóticas pueden ser reguladas por esta quinasa. La activación de AMPK puede llevar a la reducción de los niveles de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 y promover la activación por fosforilación o a nivel transcripcional del miembro pro-apoptótico Bim (87). AMPK puede, además, activar la maquinaria apoptótica indirectamente al inducir la acumulación de p53, ya sea mediando su activación transcripcional o estabilizando dicha proteína por fosforilación en su Ser-46 (143). Luego, p53 induce la activación apoptótica estimulando la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax, Puma y Noxa (87). En células tan diversas como timocitos, células derivadas de osteosarcoma U2OS, células de hepatocarcinoma de rata FTO2B y en hepatocitos normales la activación de AMPK se ha asociado a la inducción de apoptosis, dependiente de p53 en la mayoría de los casos (135,143,144) (Ver esquema resumido en Figura 2.5).

Sin embargo, AMPK puede tener también efectos pro-supervivencia en algunos tipos y situaciones celulares particulares. Por ejemplo, en las células de cáncer de estómago, AGS, y de colon, HCT116, la activación de AMPK ejerce un rol protector contra los efectos citotóxicos del cisplatino, uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivo y ampliamente usado. La causa de esta resistencia es que la activación de AMPK, inducida por cisplatino, suprime una señal apoptótica mediada por ERK (134). Han sido descriptos otros roles anti-apoptóticos de AMPK durante diferentes tipos de estrés en células no tumorales: la activación de AMPK previene la apoptosis inducida por ácidos grasos, en astrocitos (145); por hiperglicemia, en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) (146) y por glucocorticoides, en timocitos (147). En el mismo sentido, AMPK tiene un rol importante en limitar el daño y activación apoptótica asociados con la isquemia reperfusión en miocardiocitos de ratón (148).

### 2.2.2.3. Relación entre las vías de señalización de PKA y AMPK

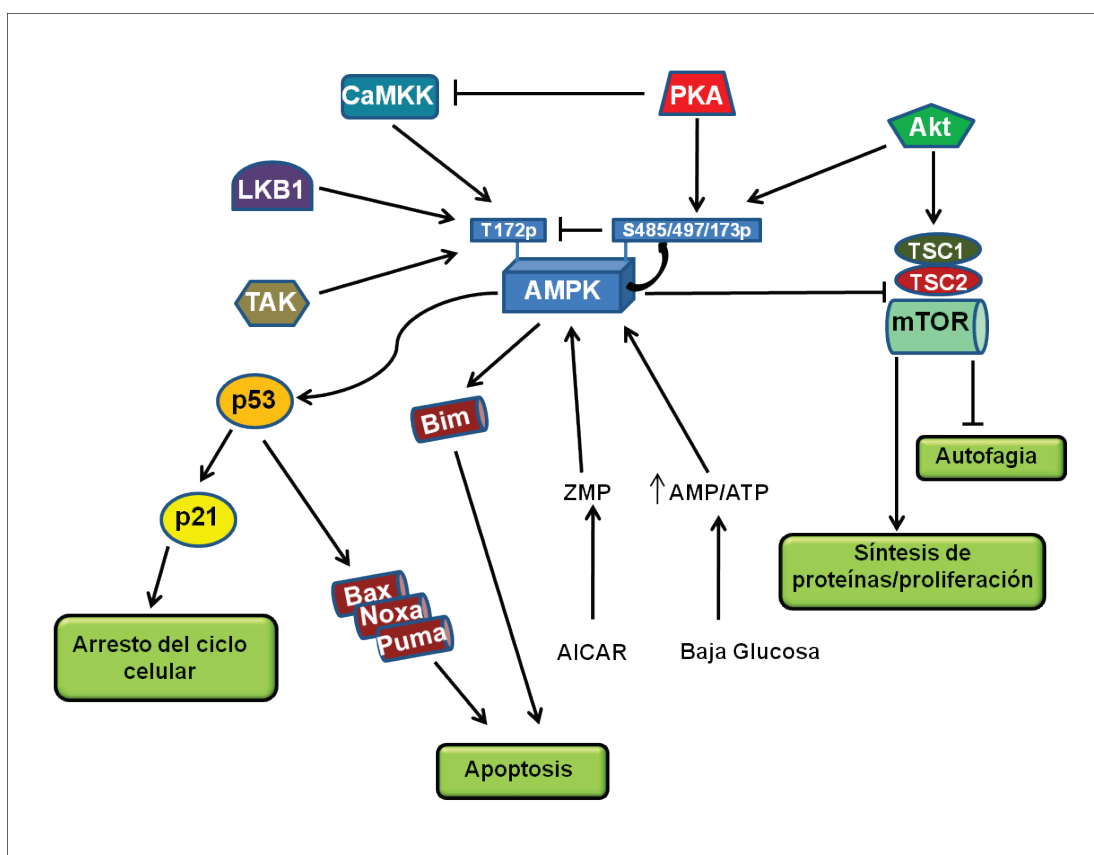
Los sistemas de señalización de AMPc-PKA regulan varias vías metabólicas de carbohidratos, lípidos, y proteínas que son también reguladas por el sistema de señalización de AMPK. Así, existen conexiones entre ambas vías de señalización en músculo, hígado y tejido adiposo. Estímulos fisiológicos, como el ejercicio y el ayuno, así como la activación hormonal vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos, podrían resultar en la activación simultánea de PKA y AMPK. En los tejidos mencionados, ambas quinasas parecen trabajar en sinergia para regular enzimas claves involucradas en el metabolismo de glucógeno, síntesis de colesterol y metabolismo de ácidos grasos (129).

Sin embargo AMPK y PKA pueden antagonizar una con otra. La actividad de AMPK disminuye en respuesta a agentes que elevan AMPc debido a la fosforilación mediada por PKA de al menos dos sitios en la subunidad  $\alpha$ ,  $\alpha$ Ser173 y  $\alpha$ 1Ser485/ $\alpha$ 2Ser491, tanto en las líneas celulares INS-1, como en células embrionarias de fibroblasto de ratón y células COS (129). Otro mecanismo de regulación de la actividad de AMPK mediada por PKA está presente en adipocitos como parte de la regulación de la lipólisis. Durante períodos de demanda energética, la tasa de lipólisis aumenta por la acción de enzimas lipolíticas estimuladas por hormonas que aumentan la señalización de la vía AMPc-PKA, que fosforila y activa a la lipasa. El paso de reesterificación de triglicéridos es un proceso altamente demandante de energía y consume grandes cantidades de ATP y genera AMP, lo cual puede provocar un estado de escasez de energía. En este contexto, se produce la activación de AMPK la cual fosforila a la lipasa e inhibe su activación por PKA. Por otro lado en la situación metabólica contraria, PKA se asocia con AMPK y fosforila a AMPK $\alpha$ 1 en la Ser173 impidiendo, de esta forma, la fosforilación en la Thr172 por LKB1 y la consiguiente activación de AMPK en respuesta a señales lipolíticas (149).

Como comentamos anteriormente la fosforilación en la Thr172 de AMPK también está sujeta a regulación por fosfatasas, entre las que se encuentran PP1, PP2A y PP2C (130,131). PKA también participaría en la regulación de la desfosforilación de este residuo, ya que PP2A es activada por fosforilación mediada por PKA (150). Sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia también de una interacción positiva entre AMPK y PKA en músculo liso vascular (VSM) de rata. Estos autores describen que AMPK es capaz de aumentar la actividad de PKA y que PKA podría

inhibir la actividad de la fosfatasa PP2C modulando así la actividad de AMPK indirectamente. Así, ambas quinasas actuarían cooperativamente para inhibir la migración de las células VSM (151).

Si bien estas evidencias prueban la modulación de la actividad quinasa de AMPK por PKA en la regulación de ciertas funciones metabólicas y fisiológicas, al momento no hay reportes acerca de los posibles efectos de esta interconexión entre ambas vías en la regulación de la supervivencia celular.



**Figura 2.5. Interconexión de vías de quinasas involucradas en la regulación de la supervivencia ante estrés nutricional.** La activación de AMPK se puede dar al aumentar los niveles de la relación AMP/ATP, como en el caso de escasez de glucosa. Así AMP se une a un sitio alostérico de AMPK, y además promueve la fosforilación por quinasas de AMPK para completar su activación. AMPK también puede activarse incubando las células con el activador de AMPK, AICAR. Algunos citoquinas, como IL-10, TGFβ, canabinoides, ó flavonoides presentes en la dieta como el resveratrol y la quercetina, ó fármacos como la metformina pueden inducir también la activación de AMPK. La activación por fosforilación de AMPK se produce en la α-Thr172. Se conocen tres quinasas que activan a AMPK fosforilando este residuo: LKB1, CaMKK y TAK1. Además, AMPK posee un residuo, αSer485/497 que es un sitio de autofosforilación y sitio blanco para quinasas como Akt y PKA, y el residuo Ser173, también fosforilable por PKA. La fosforilación en estos residuos previene estéricamente la fosforilación en la Thr172, impidiendo, de esta forma, la activación de AMPK. AMPK puede inducir la acumulación de p53, ya sea fosforilándola y estabilizándola, o bien la puede inducir a nivel transcripcional en asociación con otros factores de transcripción como CREB. A través de esta vía, puede inducir arresto del ciclo celular por inducción de p21o llevar a muerte celular apoptótica activando la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax, Puma y Noxa. AMPK directamente puede promover la activación de Bim. La activación de AMPK, además, puede suprimir mTOR inhibiendo la síntesis de proteínas e induciendo autofagia.

## 2.3. El hepatocito como modelo de estudio

### 2.3.1. El hígado: Generalidades

El hígado es un órgano de importancia fundamental para la vida, su interposición entre el tracto digestivo y el resto del organismo le confiere una ubicación que le permite procesar grandes cantidades de aminoácidos, azúcares, lípidos, vitaminas y xenobióticos que ingresan por vía oral. Así, una función de primer orden que cumple el hígado es la captación de numerosos sustratos absorbidos en el intestino y su ulterior depósito, metabolización y distribución en la sangre y en la bilis (152).

Las células preponderantes en el hígado son los hepatocitos, células epiteliales que representan aproximadamente el 90 % de la masa hepática total. Las restantes son células no parenquimatosas sinusoidales o perisinusoidales y las células epiteliales ductulares (colangiocitos). Las células sinusoidales son las células endoteliales de los capilares sinusoides, y las perisinusoidales comprenden las denominadas *pit cells* y los macrófagos hepáticos o células de Kupffer (153).

Las funciones principales del hígado se pueden clasificar en dos grandes grupos: de síntesis y de excreción. Los hepatocitos sintetizan un gran número de sustancias: proteínas, como la albúmina, las proteínas de la coagulación sanguínea, la ceruloplasmina, la siderofilina, la  $\alpha$ -antitripsina, etc.; glúcidos, principalmente glucógeno; lípidos, incluidos el colesterol y los ácidos biliares; y urea (153).

El segundo grupo de funciones son las funciones de excreción. Algunas de las sustancias que llegan al hígado, tras ser captadas por el hepatocito y sufrir una transformación metabólica, se segregan a la bilis; otras sustancias, tras su captación por el hígado y posterior transformación, se devuelven a la circulación (153).

### 2.3.2. Metabolismo energético hepático

El hígado es un intermediario entre las fuentes energéticas aportadas por la dieta y aquellos tejidos extrahepáticos que son los principales usuarios de energía. El hígado también recibe, para su provisión energética, metabolitos como ácidos grasos, glicerol, lactato, piruvato, aminoácidos y cetoácidos, procedentes de distintos tejidos. Para sus propios requerimientos energéticos los hepatocitos utilizan sobre todo ATP derivado de la oxidación de ácidos grasos. Por otra parte, el hígado exporta dos sustratos principales que pueden ser oxidados en los tejidos periféricos para la producción de energía. El

primero es la glucosa, que proviene de la hidrólisis del glucógeno almacenado y de la gluconeogénesis a partir de lactato, piruvato, glicerol, propionato, alanina y otros aminoácidos. El segundo sustrato es el acetoacetato, formado a partir de acetil-CoA proveniente de la oxidación de ácidos grasos transportados al hígado desde el tejido adiposo. El hígado también sintetiza lípidos que almacena como triglicéridos y fosfolípidos, los cuales son transportados a otros tejidos por lipoproteínas, así como carnitina y creatina, utilizadas por la maquinaria energética de otros órganos (154).

### **2.3.2.1. Rol del hepatocito en la homeostasis de la glucosa**

La mayoría de los tejidos utilizan glucosa como fuente preferencial de energía pero solamente el hígado y, en menor medida, el riñón exportan glucosa en cantidades significativas. En períodos postabsortivos, los tejidos extrahepáticos producen precursores captados por el hígado que son convertidos en glucosa en los hepatocitos (154-156). La glucosa y otras hexosas son así transportadas dentro y fuera de los hepatocitos. El principal transportador de glucosa en el hepatocito es GLUT-2, que media la difusión facilitada de glucosa. Este transportador tiene alta afinidad por glucosa y, a los niveles fisiológicos de glucosa en plasma, no presenta cinética de saturación, lo que permite que las concentraciones de glucosa en hepatocitos dependan directamente de la concentración extracelular de este carbohidrato. GLUT-1 es también expresado en el hígado, pero solamente en una proporción de 1% a 2% (155-156).

Después de una comida rica en carbohidratos, la concentración de glucosa sanguínea se eleva por encima de la concentración normal de aproximadamente 5 mM. La glucosa es captada por los hepatocitos donde entra a la vía glucolítica y/o puede ser convertida y almacenada como glucógeno (157). La insulina favorece el almacenamiento de la glucosa incrementando el nivel de la principal enzima para su fosforilación en el hepatocito, la glucoquinasa; y el proceso de síntesis de glucógeno (157). Por otro lado, esta hormona disminuye el nivel de una enzima clave para la gluconeogénesis, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Contrariamente, el glucagón, la adrenalina y los glucocorticoides promueven un incremento en el nivel de AMPc, lo que promueve la transcripción del gen PEPCK. Así, el movimiento de glucosa dentro y fuera del hepatocito es controlado por regulación hormonal de enzimas involucradas en la glucólisis, síntesis de glucógeno, y gluconeogénesis (155,156,158).

En condiciones normales, los hepatocitos usan principalmente ácidos grasos como sustratos para la oxidación, y la tasa glucolítica es baja. La glucólisis se produce principalmente a partir de la glucosa proveniente del glucógeno almacenado. Altas concentraciones de glucosa activan la glucógeno sintasa y disminuyen la activación de la glucógeno fosforilasa, favoreciendo así la glucogenogénesis sobre la glucogenólisis y resultando en menos sustrato disponible para la glucólisis. Los niveles normales de glucosa son compatibles con la glucogenólisis, resultando en la hidrólisis de glucosa-6-fosfato a glucosa libre, que es liberada a la sangre. Este aporte hepático es crítico para mantener la nutrición de los órganos (155-157).

Comenzando con la glucosa libre, la vía glucolítica tiene tres reacciones fisiológicamente irreversibles catalizadas respectivamente por las hexoquinetas (HK), la 6-fosfofructoquinasa, y la piruvato quinasa. Las distintas HK catalizan el primer paso de fosforilación de la glucosa, y difieren entre sí por su sensibilidad a la inhibición por producto, siendo la glucoquinasa ó HKIV (principal HK los hepatocitos) no inhibible por glucosa-6-fosfato en concentraciones fisiológicas (155,156,158). La oxidación de la glucosa es regulada hormonalmente: niveles incrementados de AMPc resultan en la disminución del flujo de glucosa a través de la glucólisis e incrementan las actividades de las enzimas que favorecen la gluconeogénesis. Niveles disminuidos de AMPc, a través de la modulación de enzimas apropiadas, favorecen la glucólisis y disminuyen el flujo de precursores a través de la vía gluconeogénica (155,156,158).

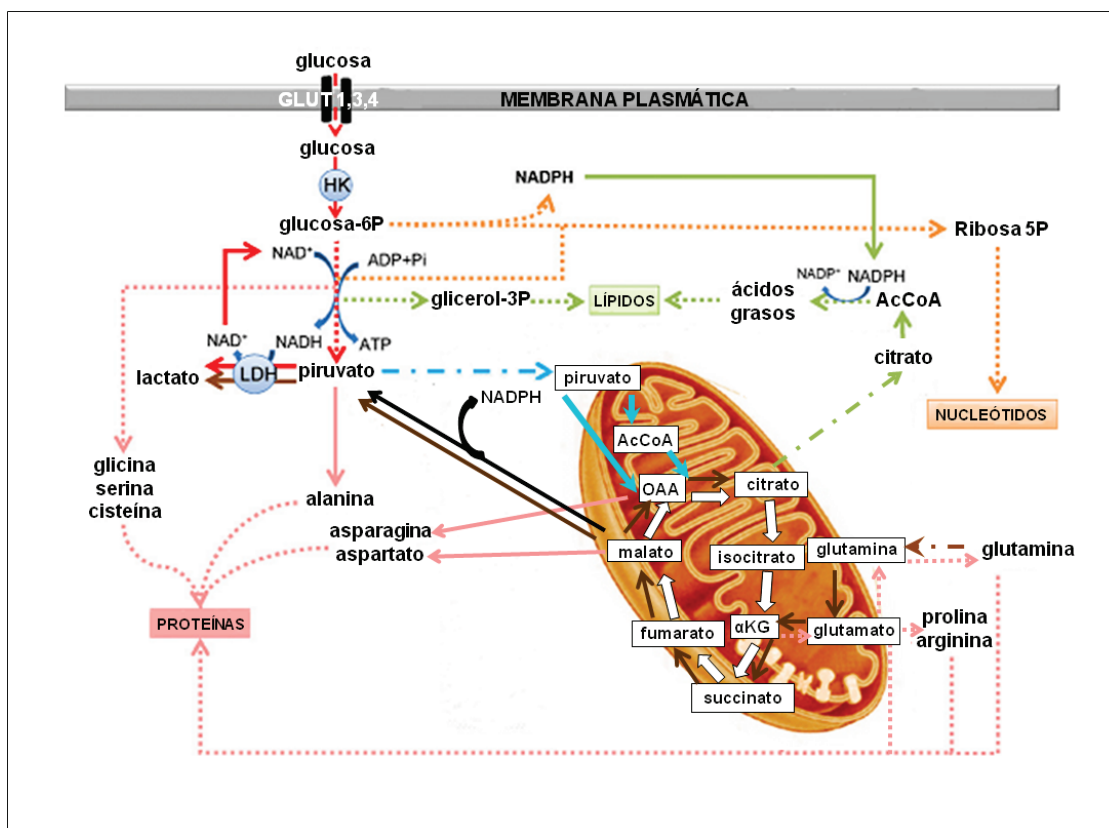
#### **2.4. Características metabólicas de las células tumorales**

En presencia de oxígeno, la mayoría de las células diferenciadas metabolizan principalmente glucosa a dióxido de carbono por oxidación de piruvato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta reacción produce NADH, el cual luego fluye hacia la fosforilación oxidativa para maximizar la producción de ATP. Solamente bajo condiciones anaeróbicas, las células diferenciadas pueden redirigir el piruvato generado en la glucólisis hacia la producción de lactato sin entrar en la fosforilación oxidativa, lo que se denomina glucólisis anaeróbica. Esta generación de lactato permite que la glucólisis continúe, pero resulta en mínima producción de ATP en comparación con la fosforilación oxidativa. Warburg observó que, por el contrario a las células normales, la mayoría de las células de cáncer presentan una alta tasa de utilización de glucosa, la cual es convertida a lactato independientemente de la disponibilidad de oxígeno y, de

esta manera, su metabolismo es a menudo referido como glucólisis aeróbica (159). Esta alta actividad glucolítica a tensiones de oxígeno normales, conocida como “efecto Warburg”, es producto de una red metabólica desregulada. Tal desregulación en células tumorales está ligada a la presencia de vías de señalización que controlan tanto la proliferación como el metabolismo, produciendo aumento de la capacidad glucolítica en paralelo al aumento en la proliferación (89,160).

En la mayoría de los tumores sólidos, pueden existir áreas extensas de hipoxia y las células en estas áreas pueden mantener su producción de energía únicamente por glucólisis anaeróbica. La glucólisis elevada genera un aumento en la producción de lactato provocando la acidificación del tejido tumoral, lo cual produce un microambiente que promueve y selecciona células con un comportamiento maligno. La respuesta celular a la hipoxia es controlada en parte por el factor HIF-1 que activa la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, captación de glucosa, glucólisis, señalización de factores de crecimiento, apoptosis, invasión y metástasis (161). La glucosa es usada no solamente para la rápida producción de energía, sino también para la provisión de precursores biosintéticos necesarios para sostener la alta tasa de división celular (162).

La mayoría de los procesos anabólicos requeridos para una tasa de crecimiento acelerada son acompañados por una glucólisis aumentada, la cual es sostenida reponiendo intermediarios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (anaplerosis) (163,164). Para generar ribosa-5-fosfato hacia la biosíntesis de nucleótidos, las células desvían carbonos desde la glucólisis hacia la vía de las pentosas fosfato (165). Consistente con la necesidad de la síntesis de lípidos, las células tumorales expresan altos niveles de enzimas lipogénicas como la ATP-citrato liasa, acetil CoA carboxilasa y ácido graso sintasa (166-169). La única fuente de acetil CoA citosólica requerida para la biosíntesis de lípidos es el citrato derivado del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por otro lado, tanto la glucosa como la glutamina, altamente utilizadas por las células tumorales, son precursores tempranos de aminoácidos no esenciales. Dos intermediarios glucolíticos, 3-fosfoglicerato y piruvato, son directamente necesarios para la biosíntesis de serina y alanina. Además, los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son usados para la síntesis de aspartato, asparagina, glutamato, prolina, arginina y glutamina (Figura 2.6) (170-174).



**Figura 2.6. Vías catabólicas y anabólicas en células tumorales.** La glucosa y la glutamina son importantes fuentes de carbono, y son metabolizadas en las células para la generación de energía y precursores anabólicos. Las vías discutidas en el texto se ilustran con un código de colores: rojo, glucólisis; blanco, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; rosa, síntesis de aminoácidos no esenciales; naranja, vía de las pentosas fosfato y síntesis de nucleótidos; verde, síntesis de lípidos y ácidos grasos; azul, oxidación de piruvato en la mitocondria; marrón, glutaminólisis; negro, reacción de la enzima málica. Flechas sólidas indican reacción de un paso; flechas de rayas y puntos indican transporte a través de membranas y flechas de puntos indican reacciones de múltiples pasos. HK, hexoquinasa; AcCoA, acetil coenzima A; OAA, oxaloacetato;  $\alpha$ KG,  $\alpha$ -cetoglutarato. *Ilustración adaptada de (174).*

Diversos mecanismos han sido atribuidos al desarrollo del efecto Warburg. Estos mecanismos incluyen defectos mitocondriales, adaptación de las células tumorales a ambientes hipóxicos, señales oncogénicas y expresión anormal de ciertas enzimas metabólicas (161). Se ha descrito incluso que el ADN mitocondrial de las células tumorales presenta altas tasas de mutaciones capaces de afectar proteínas de la mitocondria y así el normal funcionamiento de la fosforilación oxidativa (161).

Algunas alteraciones en varias enzimas metabólicas han sido asociadas al fenotipo altamente glucolítico de las células tumorales, entre ellas la hexoquinasa II, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la aldolasa, la fosfoglicerato mutasa, la enolasa, la piruvato quinasa, la enzima tipo transcetolasa y otras, se han encontrado sobreexpresadas en

diferentes tipos tumorales. Mutaciones de las enzimas fumarato hidratasa y succinato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, también han sido asociadas a ciertos tipos de tumores (161).

El mal funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial de las células tumorales hace que estas células sean más propensas a presentar altos niveles de estrés oxidativo. Se ha propuesto que las células compensan este defecto incrementando el metabolismo de glucosa. Esto les permite aumentar los niveles de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato, como describimos en secciones anteriores, para protegerse de la toxicidad inducida por  $H_2O_2$  (175).

### **2.4.1. Hepatocarcinoma**

#### **2.4.1.1. Generalidades**

A nivel mundial, el cáncer de hígado es el quinto tipo de cáncer más frecuente en hombres y, debido a su pobre pronóstico, es la segunda causa de muerte por esta enfermedad. En mujeres, es el séptimo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y la sexta causa de muerte (176).

Entre los diferentes tipos de cáncer primarios de hígado, el principal subtipo histológico es el hepatocarcinoma celular o carcinoma hepatocelular (HCC, del inglés hepatocellular carcinoma) que afecta a los hepatocitos y que representa hasta el 90 % del cáncer de hígado total a nivel mundial (177). Generalmente, el HCC se desarrolla en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas causadas por hepatitis virales (hepatitis B o C), consumo excesivo de alcohol (cirrosis etílica) o enfermedades metabólicas congénitas (por ejemplo, hemocromatosis primaria y enfermedad de Wilson) o adquiridas (por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica asociada a la diabetes o a la dislipidemia) (178). También han estado implicadas en la carcinogénesis algunas alteraciones genéticas, incluyendo pérdida de heterocigocidad y metilación aberrante. Además, las dietas poco saludables, el sedentarismo y la obesidad se han asociado con un alto riesgo de HCC (179).

Al desarrollo y progresión del HCC hacia una enfermedad crónica se lo denomina hepatocarcinogénesis. Al igual que para la mayoría de los tipos de cánceres, la hepatocarcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que involucra la acumulación de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas que, en última instancia, conllevan a la

transformación maligna del hepatocito. Este tipo de alteraciones, así como su secuencia de aparición, son muy variables (180,181).

Han sido caracterizados ciertos patrones de expresión génica del HCC. Estos tipos de tumores expresan niveles elevados de genes cuyas funciones son requeridas para la progresión del ciclo celular, y de genes que codifican proteínas ribosomales, lo cual es característico de células en crecimiento. Por el contrario, las células de estos tumores expresan bajos niveles de algunos genes expresados específicamente en hepatocitos diferenciados, como genes que codifican enzimas metabólicas específicas de hígado y proteínas plasmáticas. También son comunes las mutaciones en el gen que codifica para p53, lo que podría jugar un rol clave en la patogénesis llevando a una proliferación acelerada (180). Un gen característico altamente expresado en HCC es el que codifica para la  $\alpha$ -fetoproteína, que es una glicoproteína con un rol dual en la regulación del crecimiento en múltiples tipos celulares y que participa también en la regulación apoptótica (180,182).

En la transformación tumoral, las enzimas típicas para un órgano especializado como el hígado son reemplazadas por enzimas no específicas de tipo fetal o muscular. Las células de hepatocarcinoma difieren de los hepatocitos en algunas propiedades del metabolismo de carbohidratos. El metabolismo de glucosa está aumentado y el de fructosa disminuido. Las enzimas específicas del hígado como fructoquinasa y aldolasa B se pierden o tienen solamente bajas actividades. Las propiedades cinéticas de las HK cambian y varían algunos mecanismos de control que regulan la glucólisis en el tejido normal (183). Los niveles de hexoquinasa II, piruvato quinasa (el subtipo específico de hígado) y glucosa 6P-deshidrogenasa suelen estar elevados en HCC, mientras que la glucosa 6-fosfatasa, la fructosa 1,6-bifosfatasa y la glucoquinasa (que es específica de hígado) presentan niveles bajos (184).

#### **2.4.1.2. Características de las células HepG2**

Las células HepG2 (clon C3A, ATCC) fueron establecidas a partir de una biopsia de hepatocarcinoma humano, y, se sabe, sintetizan prácticamente todas las proteínas plasmáticas humanas. Debido a que son células de cáncer de hígado, exhiben características tanto de hepatocitos como de células tumorales. A diferencia de lo que ocurre en hepatocitos, la glucólisis junto con la glutaminólisis son las principales fuentes de energía en estas células. Por el contrario, y como ya mencionamos, en

hepatocitos normales la producción de energía es predominantemente a través de la fosforilación oxidativa acoplada a la oxidación de ácidos grasos (183,185,186). En las células HepG2 la expresión y actividad de la HK II están marcadamente elevadas en relación a los hepatocitos normales, en los cuales las HK mitocondriales son casi indetectables. Se ha comprobado que los genes que codifican para el principal transportador de glucosa en células HepG2 (Glut1) y para la HK II son sobrepresados ante falta de glucosa e hipoxia (187).

Las células HepG2, como la mayoría de las células tumorales, contienen poco o nada de glucógeno. En concordancia con esto, la glucólisis anaeróbica sin sustrato adicional es despreciable. A pesar de la baja tasa glucolítica en ausencia de cualquier sustrato, la línea celular HepG2 es significativamente más resistente a la injuria celular hipóxica que los hepatocitos. Una causa de esto podría ser que las células HepG2 tengan una demanda energética más baja que los hepatocitos bajo condiciones anaeróbicas (183).

Las células HepG2 son capaces de modular la expresión de sus genes *in vitro* en respuesta a su densidad en cultivo y presentan una fuerte inhibición por contacto. A baja densidad tienen un tiempo de duplicación de 24 horas y exhiben características de células de hígado fetal, incluyendo la alta síntesis de  $\alpha$ -fetoproteína, isoenzimas fetales de aldolasa y piruvato quinasa, y baja síntesis de albúmina (188).

## Objetivos

---

### 3. Objetivos

En base a lo expuesto, nos planteamos como **Hipótesis de estudio** que las proteínas quinasas PKA y AMPK regulan la supervivencia de las células de origen hepático durante la restricción de glucosa a través de la modulación de vías de muerte y/o de proliferación celular. Y que la repercusión de estas regulaciones es diferente en células HepG2 respecto a hepatocitos normales, lo que puede ser importante para las estrategias de control del crecimiento tumoral.

Por lo tanto el **Objetivo General** del presente trabajo de tesis es aportar a la comprensión de los mecanismos por los cuales PKA y AMPK transducen señales ligadas a la disponibilidad de glucosa en respuestas relacionadas con la supervivencia en células de origen hepático.

La ejecución del trabajo se realizó en dos etapas con sus correspondientes Objetivos Específicos:

#### Capítulo 1: Estudios en cultivo primario de hepatocitos de rata

- **Objetivo específico 1:** Analizar los cambios en la supervivencia durante la restricción de glucosa en cultivo primario de hepatocitos
- **Objetivo específico 2:** Estudiar la participación de la quinasa PKA en la señalización de la respuesta de sobrevida o muerte en esas condiciones

#### Capítulo 2: Estudios en células de hepatocarcinoma humano

- **Objetivo específico 1:** Estudiar la viabilidad de células derivadas de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A en condiciones de ausencia de glucosa
- **Objetivo específico 2:** Determinar el rol de las quinasas AMPK y PKA, y la posible interconexión entre ambas vías de señalización en la respuesta de supervivencia durante dicho estrés nutricional

# Materiales y Métodos

---

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Animales

Para la obtención de hepatocitos normales se utilizaron ratas Wistar-machos adultas (300-320 g), endocriadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Experimental (IFISE), CONICET. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, de acuerdo a las normas internacionales preestablecidas para el cuidado de animales de laboratorio (“Guide for the care and Use of Laboratory Animals” National Institutes of Health, publication n° 86-23, revised 1985).

### 4.2. Tratamiento y modelos experimentales

#### 4.2.1. Cultivo primario de hepatocitos aislados de hígado de rata

Los hepatocitos se aislaron de ratas ayunadas durante 12 horas como fuera descrito previamente (189). Brevemente, el hígado se perfundió con colagenasa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, U.S.A.) y luego de una cuidadosa disrupción mecánica, los hepatocitos se filtraron por una membrana de nylon de 40µm. Finalmente se separaron de células no parenquimatosas y restos celulares por centrifugación a baja velocidad. La viabilidad celular se evaluó con el test de exclusión de Azul de Tripán (*ver Materiales y Métodos 4.3.1*), se tomó 5 µl de la suspensión de hepatocitos y se diluyó en 50 µl de azul de tripán (4g/l) y 95 µl de solución de Hanks (NaCl 137mM; NaHCO<sub>3</sub> 26 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 mM; KCl 5,4 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; glucosa 5,6 mM), complementada con HEPES (3 g/l), MgSO<sub>4</sub> (1 mM) y CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM). Una alícuota de esta preparación se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico, determinándose el porcentaje de hepatocitos viables. Al comenzar los experimentos la viabilidad fue siempre mayor a 85 %. Después de aislados, 2.500.000 y 800.000 hepatocitos se cultivaron en placas de plástico de 6 cm y 3 cm respectivamente, recubiertas con gelatina 0,1 % según trabajos previos (190). El medio de cultivo fue DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Los hepatocitos se incubaron a 37 °C por 4 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % para lograr la adherencia de los mismos (191). Las células no adheridas fueron removidas y al resto de hepatocitos

se los reincubó con medio fresco durante 16 horas adicionales previamente a la realización de los tratamientos. Para los estudios de restricción de glucosa, las células fueron incubadas en medio DMEM sin piruvato, sin glucosa o con glucosa 10 mM durante los períodos de tiempo indicados. La participación de PKA y de su interacción con las AKAPs en las vías en estudio se analizó mediante incubaciones con o sin 10  $\mu$ M del inhibidor de PKA *N*-[2-(-*p*-bromo-cinnamilamino)etil]-5-isoquinolinosulfonamida (H89) (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA); y con o sin 10  $\mu$ M del p-tido inhibidor del anclaje de PKA, Ht31 (Promega, Madison, WI). La participación de caspasas en la muerte celular se evaluó mediante la incubación de las células en presencia del inhibidor de caspasas carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil-[*O*-metil]-fluorometilcetona, Z-VAD-FMK 50  $\mu$ M, (Promega, Madison, WI). Para obtener un control positivo de despolarización mitocondrial los hepatocitos fueron tratados con el desacoplante mitocondrial cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona, CCCP 500 nM (Sigma Chemical Co, St Louis, MO).

Para los estudios de microscopía las células fueron cultivadas en placas de plástico de 3 cm con uno o dos cubreobjetos de vidrio por placa y recubiertas con gelatina 0,1 % y fueron sometidas a los mismos tratamientos mencionados anteriormente.

#### 4.2.2. Línea celular HepG2

Las células HepG2/C3A (ATCC) se cultivaron en frascos de plástico en medio DMEM rico en glucosa (25 mM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina y aminoácidos no esenciales y una mezcla de antibióticos, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL). El medio de cultivo se cambió cada dos días y las células se tripsinizaron luego de alcanzar un 80 % de confluencia. Para los experimentos, luego de la tripsinización, se sembraron 400.000 y 1.200.000 células en placas de 3 y 6 cm respectivamente y se incubaron en medio DMEM sin piruvato durante 72 horas. Posteriormente las células fueron incubadas en medios sin glucosa o con glucosa 25 mM, con o sin dibutil AMP-cíclico (dbAMPc) 100  $\mu$ M (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), con o sin *N*-[2-(-*p*-bromo-cinnamilamino)etil]-5-isoquinolinosulfonamida dihidrocloruro (H89) 1  $\mu$ M (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) y con o sin 5-Aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleósido (AICAR) 1 mM (Cell Signalling Technology, Danvers, MA) hasta 48 horas.

### 4.3. Ensayos de viabilidad celular

#### 4.3.1. Exclusión de Azul de Tripán (EAT)

El fundamento del método se basa en que las células no viables, que han perdido la integridad de las membranas celulares, no son capaces de excluir el colorante, quedando teñidas de color azul, a diferencia de las células intactas que excluyen el colorante, observándose sin coloración y refringentes al microscopio óptico (192).

Se determinó la viabilidad de las células control y tratadas, para ello se agregaron 625 µl de azul de tripán (4 g/l) a las células cultivadas en las placas de 3 cm conteniendo 1,25 ml de medio de cultivo, y las mismas fueron observadas al microscopio óptico donde se tomaron fotos con un aumento 20 x a cuatro campos por condición con un mínimo de 100 células cada uno y se cuantificó el porcentaje de células viables.

#### 4.3.2. Liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La liberación al medio de enzimas solubles citosólicas, como LDH, constituye también una expresión del daño estructural en la membrana y puede ser considerada como una prueba sensible de viabilidad celular (193).

Para la cuantificación de la misma debe tenerse en cuenta que la enzima cataliza la siguiente reacción:



Esta reacción está desplazada hacia la producción de lactato y la velocidad de oxidación del NADH determinada a 340 nm con un espectrofotómetro (PerkinElmer Spectrometer Lambda 2S, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA 02451), es proporcional a la actividad LDH de la muestra.

Las células cultivadas en las placas de 3 cm en los tiempos y condiciones especificadas anteriormente (*4.2-Tratamiento y modelos experimentales*) fueron levantadas con espátula junto con el medio, centrifugadas 10 minutos a 1.000 x g a 4 °C, se separó el sobrenadante para determinar de manera enzimática la actividad aportada por la LDH liberada al medio extracelular. Al pellet se lo resuspendió en 100µl de una solución de lisis conteniendo: Tritón X-100 0,1 % (v/v), NaCl 0,9 % y BSA (del inglés

*bovine serum albumin*) 0,1 % (194), y se empleó para medir la actividad enzimática total del preparado.

El ensayo se realizó incubando una alícuota de la muestra (50  $\mu$ l del sobrenadante y 10  $\mu$ l del lisado) con 1 ml de medio conteniendo piruvato 1,6 mM, NADH 0,2 mM y NaCl 200 mM en una solución de buffer Tris 80 mM a pH = 7,20, en una cubeta termostatzada a 37 °C. Se leyó la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos, y se determinó el cambio de absorbancia por minuto ( $\Delta$  Abs/min).

El porcentaje de liberación de LDH al medio fue calculado como el porcentaje de LDH en el sobrenadante comparado con la actividad total de la enzima:

$$\frac{\text{[act. sobrenadante]}}{\text{[act. Sobrenadante + act. Lisado]}} \times 100$$

Un mayor porcentaje de liberación al medio es índice de disminución en la integridad de la membrana celular (195).

#### **4.3.3. Evaluación de la viabilidad celular mediante detección de actividad metabólica a través del ensayo de MTT**

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células vivas presentes en el cultivo lo cual se estima midiendo la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), un colorante amarillo soluble en agua, es captado por las células y reducido por las deshidrogenasas mitocondriales a un producto púrpura insoluble de cristales de formazán a una velocidad que es proporcional al número de células con mitocondrias funcionales. De este modo, el ensayo de MTT se utiliza para estimar el número de células viables. En combinación con ensayos que sirvan para estimar la pérdida de viabilidad, el MTT puede ser usado para evaluar el efecto de distintos tratamientos sobre la proliferación celular. Para llevar a cabo el ensayo se sembraron 5.000 células HepG2 o 50.000 hepatocitos en placas de 96 pocillos y luego de realizar los respectivos tratamientos el MTT (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) fue agregado al medio de cultivo a una concentración final de 0,5 mg/ml. Luego de 2 horas de incubación a 37° C, las células fueron lisadas y los cristales de formazán solubilizados con 200  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y se cuantificó la absorbancia a 550 nm (con filtro de referencia de 650 nm) del metabolito producido por las células viables.

#### 4.4. Estimación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ )

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial utilizamos el fluoróforo tetra-metil-rodamina-metil-ester (TMRM, Sigma Chemical Co, St Louis, MO), un fluoróforo catiónico permeable a membranas que se acumula por gradiente electroquímico en mitocondria en proporción al potencial de membrana de la organela (196). Cada grupo de hepatocitos fue incubado con *buffer* Ringer (NaCl 155 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, HEPES 10 mM y BSA 287 mg %, pH 7,4) con o sin glucosa 10 mM conteniendo TMRM 50 nM durante 20 min a 37 ° C. Seguidamente, el medio fue reemplazado por *buffer* Ringer conteniendo TMRM 5 nM y se obtuvieron imágenes *in vivo*, con 30 células cada una aproximadamente, mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axiovert 25CFL). Se utilizó como control positivo de despolarización de la membrana mitocondrial el compuesto cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP, 100 μM), el cual actúa como un potente desacoplante de la fosforilación oxidativa en mitocondrias. Finalmente se procedió a la cuantificación de la densidad de fluorescencia intracelular mediante el programa Image J.

#### 4.5. Determinación de los niveles intracelulares de ATP

Para este ensayo, los hepatocitos fueron lavados con PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM y NaCl 100 mM; pH 7,5), levantados con espátula, resuspendidos en sacarosa 0,3 M y finalmente sonicados. Las concentraciones de ATP en los lisados celulares se cuantificaron usando un kit de detección (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La quimioluminiscencia fue detectada con un lector de microplacas (Beckman Coulter LD400). La concentración de ATP fue normalizada a los miligramos de proteína presentes en los lisados y se expresó como porcentaje del control.

#### 4.6. Evaluación de apoptosis

##### 4.6.1. Determinación de actividad Caspasa 3

Previo al ensayo de actividad, las células cultivadas en las placas de 6 cm en los tiempos y condiciones especificadas anteriormente (4.2-*Tratamiento y modelos experimentales*), fueron levantadas con espátulas junto con su medio, centrifugadas a 1.000 x g por 5 minutos a 4 °C, el medio fue descartado y el pellet resuspendido e

incubado durante 10 minutos en una solución de lisis conteniendo: Tritón 0,5 %, EDTA 20 mM , fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM, leupeptin 0,1 mM y Tris 5 mM a pH = 7,4. Luego este lisado fue centrifugado a 13.000 x g por 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante alicuotado y congelado para posteriores determinaciones de actividad caspasa y cuantificación de proteínas.

La actividad Caspasa presente en los lisados fue evaluada utilizando como sustratos dos tetrapéptidos específicos para caspasas de mamíferos acoplados a un fluoróforo: Ac-YVAD (ICE-caspasa 1) y Ac-DEVD (CPP32/caspasa-3), marcados con el fluorocromo 7-amino-4-metil coumarin (AMC) proporcionados por un kit comercial (CaspACE Assay System, Fluorometric, Promega Corp., Madison, WI 53711) adaptado para ensayo multiplaca según trabajos previos (197). Los sustratos producen una fluorescencia azul que puede ser detectada por exposición a luz UV a 360 nm. AMC es liberado de estos sustratos luego del clivaje por las enzimas ICE o CPP32. AMC produce fluorescencia verde-amarilla que es registrada por un fluorómetro a 460 nm. La cantidad de fluorescencia verde-amarilla producida luego de este clivaje es proporcional a la cantidad de actividad de ICE o CPP32 presente en la muestra. Dos inhibidores reversibles de ICE y CPP32 son también proporcionados por el CaspACE Assay System debido a que en los lisados celulares, los sustratos fluorogénicos pueden ser susceptibles al clivaje por otras proteinasas relacionadas, por lo tanto, para asegurar la contribución específica de la actividad enzimática de ICE o CPP32 en los extractos celulares, el ensayo debe ser realizado en presencia y en ausencia de inhibidores selectivos de ICE y de CPP32. La diferencia entre los niveles de actividad de clivaje de sustrato en presencia y en ausencia de inhibidor refleja la contribución de la actividad enzimática, tanto de ICE como de CPP32. El ensayo para cada muestra se realizó por duplicado, y se incubó a la misma durante 60 minutos a 30 °C con cada sustrato por separado en presencia y en ausencia del inhibidor correspondiente, y se midió la fluorescencia de las reacciones a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. La actividad ICE-Caspasa 1 fue usada como control negativo, ya que esta caspasa es activada en procesos inflamatorios, no apoptóticos.

Previamente, fue realizada una curva de calibración, midiendo la fluorescencia de soluciones de distintas concentraciones de AMC. Se graficó fluorescencia versus la

masa (picomoles) de AMC y se obtuvo un gráfico lineal del cual se determinó la pendiente de la recta.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (198).

La actividad Caspasa expresada en pmol de AMC liberado por minuto a 30 °C por mg de proteína fue determinada con la siguiente fórmula:

**$(Fa-Fp)/pendiente\ de\ la\ curva\ de\ calibración/60min/mg\ prot./volumen\ de\ muestra$**

Fa = fluorescencia medida en ausencia del inhibidor

Fp = fluorescencia medida en presencia del inhibidor

#### **4.6.2. Microscopía de Fluorescencia**

Las células fueron fijadas durante 10 minutos con paraformaldehído 4 %, y procesadas para su visualización por microscopía de fluorescencia como describimos previamente (199). Brevemente, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas con 0,2 % de Tritón X-100/BSA 3 % por 10 minutos y los cubres fueron incubados con Faloidina conjugada con Alexa 560 durante una hora. Seguidamente, se lavaron con PBS y los cubres fueron incubados con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 10 µM durante 5 minutos y montados con ProLong. Las imágenes fueron visualizadas por microscopía confocal (Nikon C1SiR con microscopio invertido Nikon TE200). Se cuantificaron las células con núcleos fragmentados sobre un total de aproximadamente 300 células por condición de tratamiento.

#### **4.6.3. Ensayo de Anexina V/ Ioduro de Propidio por citometría de flujo**

Para la realización de este ensayo utilizamos el kit comercial Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) que detecta células apoptóticas y necróticas por citometría de flujo. Las anexinas son un grupo de proteínas homólogas que se unen a fosfolípidos en presencia de calcio. Anexina V-FITC es una sonda fluorescente que se une a fosfatidilserina en presencia de calcio. Los cambios celulares involucrados en el proceso apoptótico incluyen la pérdida de asimetría durante los estadios tempranos de la apoptosis. Al activarse la apoptosis, la fosfatidilserina que es normalmente encontrada sobre la cara interna de la membrana plasmática, se transloca a la porción externa de la membrana haciéndose disponible a la unión con Anexina V-FITC. El procedimiento consiste en la unión de Anexina V-FITC a la

fosfatidilserina en la membrana de las células que comienzan el proceso apoptótico y la unión de yoduro de propidio (IP) al ADN de las células que han perdido la integridad de su membrana celular. Clasificamos como **apoptosis temprana** a las células marcadas positivamente para Anexina V-FITC y negativamente para IP (Anex.+ /IP-), y son aquellas células que están comenzando un proceso apoptótico. Incluimos en **apoptosis tardía** a las células marcadas positivamente tanto para Anexina V-FITC como para IP (Anex.+ /IP+) que son aquellas células que progresaron a una muerte apoptótica. Por último las células que sufren un proceso de **necrosis** son aquellas marcadas negativamente para Anexina V-FITC y positivamente para IP (Anex.- /IP+).

Para la detección de apoptosis en hepatocitos de rata, se sembraron 500.000 células por placa. Luego de los respectivos tratamientos, los hepatocitos fueron levantados con espátula y centrifugados a 1.000 x g durante 5 minutos. El *pellet* fue lavado con PBS y se volvió a centrifugar. Partiendo de este *pellet* celular se llevó a cabo la incubación con IP y Anexina V-FITC según indicaciones del fabricante.

Para la realización del ensayo en células HepG2, se sembraron 100.000 células por placa. Luego de 72 horas de incubación para lograr la adherencia de las mismas se largaron los respectivos tratamientos. Posteriormente se recolectó el medio de cultivo, el cual fue centrifugado a 400 x g durante 5 minutos para recuperar las células que pudieran estar sueltas en el medio. Las células adheridas a la placa se tripsinizaron y la suspensión celular se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. El *pellet* fue lavado con PBS, agregado al *pellet* anterior y la suspensión fue centrifugada nuevamente. Partiendo de este *pellet* celular se llevó a cabo la incubación con IP y Anexina V-FITC según indicaciones del fabricante.

Las distintas poblaciones celulares marcadas con IP y/o Anexina V-FITC fueron evaluadas mediante citometría de flujo.

#### 4.7. Determinación de la distribución de las células en el ciclo celular

La distribución de las células en el ciclo celular se analizó determinando el contenido de ADN celular mediante la tinción con Yoduro de Propidio. Para la realización de este ensayo en células HepG2, se sembraron 400.000 células por placa. Luego de 36 horas de tratamiento, se recolectaron los medios, los cuales fueron centrifugados a 400 x g durante 5 minutos para recuperar las células que pudieran estar sueltas en los mismos. Las células adheridas a las placas se tripsinizaron y la suspensión

celular se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. Los *pellets* fueron lavados con PBS, agregados a los *pellets* anteriores y las suspensiones fueron centrifugadas nuevamente. Los últimos *pellets* fueron resuspendidos en 300 µl de PBS y dichas suspensiones celulares fueron fijadas en etanol 70 % frío. Posteriormente, las células fijadas se lavaron con PBS y se marcaron con Ioduro de Propidio (IP, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) 0,05 mg/ml en un buffer conteniendo citrato de sodio 0,1%, RNAsa 0,02 mg/ml, y NP-40 0,3%. Las células teñidas fueron finalmente sometidas a citometría de flujo, utilizando el citómetro BD Cell Sorter BD FACSAria II. Los datos crudos obtenidos de la citometría fueron posteriormente analizados con los programas WinMDi y Cylchred.

#### 4.8. Preparación de fracciones subcelulares

A partir de cultivos primarios de hepatocitos y de células HepG2 se prepararon lisados y fracciones mitocondriales, citosólicas y nucleares.

Los lisados se obtuvieron por incubación durante 30 minutos del *pellet* celular en *buffer* RIPA (Tritón X-100 1 % (v/v), deoxicolato sódico 1 % (p/v), SDS 0,1 % (p/v), Tris 20 mM, pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM) conteniendo inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, calcicolina A 1,5 nM (Sigma Chemical Co.)) e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/mL y aprotinina 1 µg/mL (Sigma Chemical Co)). Seguidamente, las suspensiones celulares fueron sonicadas con 3 pulsos de 5 segundos a una amplitud de 30 %, y almacenadas a -70 °C hasta su utilización.

Las fracciones mitocondriales y citosólicas de hepatocitos y células HepG2 fueron preparadas por centrifugación diferencial (200). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS, levantadas con espátula y centrifugadas a 1.000 x g durante 5 minutos. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en un *buffer* isotónico STE (sacarosa 0,25 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas) y sonicados. Los restos celulares y fracciones nucleares fueron removidos por centrifugación a 700 x g por 5 minutos. Las fracciones mitocondriales y citosólicas fueron preparadas mediante centrifugación a 16.100 x g durante 20 minutos. Los *pellets* mitocondriales fueron lavados con *buffer* STE para minimizar la contaminación. Luego

de una nueva centrifugación, las mitocondrias fueron resuspendidas en *buffer* hipotónico (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) conteniendo Tritón X-100 1 %.

Para determinar la localización de PKA en fracciones submitocondriales, se prepararon mitoplastos [126]. Brevemente, mitocondrias aisladas fueron resuspendidas en MS-EGTA (manitol 225 mM, sacarosa 0,75 mM, HEPES 5 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4) y se les adicionó agua (1/10 volumen) y digitonina (1 mg digitonina/5 mg proteína mitocondrial). La mezcla fue incubada en hielo durante 45 minutos. Luego del agregado de KCl (150 mM), las fracciones mitocondriales fueron incubadas 2 minutos en hielo y centrifugadas a 18.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Los *pellets* fueron lavados con MS-EGTA y resuspendidos en *buffer* hipotónico (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) conteniendo Tritón X-100 1 %.

Para medir la producción de ROS mitocondrial, las mitocondrias fueron aisladas de hígado de rata, como fue descrito previamente (201), con leves modificaciones. Brevemente, el hígado fue perfundido *ex vivo* con un *buffer* de aislamiento frío compuesto de sacarosa 0,25 M, EDTA 0,5 mM y Tris 10 mM (pH 7,4) y rápidamente removido. El tejido fue cortado y homogeneizado en el *buffer* de aislamiento con un homogenizador de tejidos Potter-Elvehjem equipado con un émbolo de teflón. Seguidamente, el homogenado fue centrifugado a 650 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. El *pellet* obtenido se resuspendió en el buffer de aislamiento suplementado con BSA 1 g/l y se lavó con el mismo *buffer*. La suspensión mitocondrial fue dejada en hielo durante 1 hora para permitir el rearrreglo de las membranas.

#### **4.9. Inmunoprecipitación de Bax**

Para la realización de la inmunoprecipitación, los hepatocitos fueron levantados con espátula, lavados y resuspendidos en un buffer de lisis (Triton X-100 1 %, EDTA 20 mM, PBS (pH 7.4)) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Luego las muestras fueron sonicadas y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos fueron utilizados en los ensayos de inmunoprecipitación. Los lisados celulares (200 µg/muestra) fueron incubados toda la noche con 1 µg de anti-Bax mAb B9 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) con agitación constante a 4 °C. Luego de la incubación con el

anticuerpo primario, se agregaron las esferas magnéticas M-280 sheep anti-mouse IgG Dynabeads (Invitrogen, Carlsbad, CA), previamente bloqueadas con BSA al 1 % en PBS durante 30 minutos. Las muestras fueron incubadas con dichas esferas durante 2 horas con agitación constante a 4 °C. Posteriormente las mismas fueron lavadas 3 veces con PBS de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Luego del último lavado, las proteínas unidas a las esferas magnéticas fueron disueltas en *buffer* de siembra, calentadas a 70 °C durante 15 minutos y sometidas a análisis de *Western blot*.

#### 4.10. Inmunoprecipitación de AMPK $\alpha$

Para la realización de la inmunoprecipitación de AMPK $\alpha$  las células HepG2 fueron levantadas de la placa con espátula junto con su medio de cultivo, bajadas por centrifugación a 1.000 x g, lavadas con PBS y resuspendidas e incubadas 30 minutos en un *buffer* de lisis (Triton X-100 1 %, glycerol 10 %, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente las muestras fueron sonicadas y se procedió con la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry (198).

Para el ensayo de inmunoprecipitación, los lisados celulares (300-400  $\mu$ g/muestra) fueron incubados toda la noche con 1  $\mu$ l de anti-AMPK $\alpha$  (Cell Signalling Technology, Danvers, MA) con agitación constante a 4 °C. Luego se agregaron 4 mg/mL de Proteína A-Sepharosa, se incubaron 2-4 horas a 4 °C con agitación y se centrifugaron 5 min a 5.000 r.p.m. Los *pellets* fueron lavados tres veces con el *buffer* de lisis, y finalmente las proteínas unidas a la Proteína A-Sepharosa fueron disueltas en *buffer* de siembra, calentadas a 90 °C durante 10 minutos y sometidas a análisis de *Western blot*.

#### 4.11. Western blot

Las proteínas de las distintas fracciones celulares fueron separadas mediante electroforesis en mini-geles de poliacrilamida-SDS (202) y transferidas a membranas de polivinil difluoruro (PVDF) (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA). La concentración proteica total en todas las preparaciones celulares se midió según Lowry y col., (1951). Las muestras se calentaron durante 10 min a 90 °C en un *buffer* de desnaturalización o *buffer* de siembra (Tris 20mM, pH 8,5, SDS 1%, ditiotreitól (DTT) 400  $\mu$ M, glicerol 10%). Posteriormente, muestras con el mismo contenido proteico

fueron sometidas a electroforesis en mini-geles conteniendo desde 12 a 18 % de poliacrilamida-SDS 10%, dependiendo del tamaño de las proteínas a analizar. Los mini-geles se prepararon y corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad). Luego, las proteínas fueron transferidas a membranas de polivinil difluoruro (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA) durante 2 horas a corriente constante de 250 mA utilizando un equipo comercial (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). Las membranas se bloquearon al menos 1 hora con leche no grasa al 5 % en *buffer* PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,5), se lavaron y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido en *buffer* PBS-Tween/BSA 3% [Bax (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); Citocromo c (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); PKA (BD Transduction Labs, San Jose, CA); Prohibitina (Abcam, Cambridge, UK);  $\beta$ Actina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO); Fosfo-(Ser/Thr) sustratos de PKA (Cell Signalling Technology, Danvers, MA); p53 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); p21 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); AMPK $\alpha$  (Cell Signalling Technology, Danvers, MA); Fosfo-AMPK $\alpha$  (Thr172) (Cell Signalling Technology, Danvers, MA)]. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con *buffer* PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente unido a peroxidasa de rabanito durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína inmovilizada fue detectada por quimioluminiscencia utilizando un equipo comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (ECL-Western Blotting, Amersham Pharmacia Biotech). Para la detección, las membranas polivinílicas se expusieron a films radiográficos (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, GE Healthcare Limited) y las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Durante la preparación de las figuras, se ajustó brillo y contraste de las imágenes para mejorar la visualización.

#### 4.12. Determinación de los niveles de ROS

La formación de ROS se cuantificó en forma directa utilizando el fluoróforo diacetato de 2',7'-diclorofloresceína (DCFH-DA, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (203). El compuesto no fluorescente DCFH-DA, agregado al medio de incubación, atraviesa libremente la membrana de las células, siendo metabolizado por esterasas no específicas y oxidado al compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF)

por las ROS intracelulares. Luego de los respectivos tratamientos las células fueron lavadas con PBS e incubadas con DCFH-DA 5  $\mu\text{M}$  en *buffer* Ringer durante 30 minutos en incubador. Seguidamente, en el caso de hepatocitos, los mismos fueron lavados con PBS, levantadas con espátula, resuspendidas en sacarosa 0,3 M y sonicadas. La formación del compuesto fluorescente oxidado fue medida en un lector de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Cuando analizamos la contribución de la respiración mitocondrial a los niveles de ROS, se agregó al medio de incubación el compuesto CCCP durante 2 horas a una concentración final de 500 nM en condiciones de presencia o ausencia de glucosa, como fue descripto previamente (204), y se cuantificaron los niveles de ROS en los tiempos en estudio.

En el caso de las células HepG2, la evaluación de los niveles de ROS realizó por estudios de inmunofluorescencia. Las células fueron sembradas en placas de 3 cm con cubres, se realizaron los respectivos tratamientos, y se incubó con la sonda DCFH-DA del mismo modo que indicamos arriba. Posteriormente las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4%, se realizó la tinción con DAPI como describimos previamente en 4.6.2. *Microscopía de Fluorescencia*, y los cubres se montaron con Prolong. Las imágenes fueron visualizadas por microscopía confocal (Nikon C1SiR con microscopio invertido Nikon TE200) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia verde por célula con el programa Image J.

#### **4.13. Determinación de la generación de ROS mitocondrial**

La tasa de producción mitocondrial de ROS fue determinada mediante la oxidación de DCFH-DA, como describimos previamente, con leves modificaciones (205). Brevemente, se incubaron mitocondrias (0,2 mg/ml) en un *buffer* de respiración (Tris HCl 10 mM, manitol 0,32 M, fosfato inorgánico 8 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, EDTA 0,08 mM, EGTA 1 mM y BSA 0,2 mg/ml, pH 7,4) que contenía DCFH-DA 1  $\mu\text{M}$  con agitación continua a 37 °C. Las mitocondrias fueron estimuladas con succinato 10 mM o malato 2 mM/ piruvato 5 mM o una mezcla de los tres sustratos. Las mitocondrias fueron además incubadas en presencia o ausencia de inhibidores de PKA (H89 1  $\mu\text{M}$  o Rp-cAMP 25  $\mu\text{M}$ ) o de un activador de PKA (dbcAMP 50  $\mu\text{M}$  + IBMX 50  $\mu\text{M}$ ). Las

medidas de fluorescencia fueron registradas cada minuto durante 30 minutos en un lector de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector). Los primeros 10 minutos de fase *lag* fueron excluidos del análisis y las tasas de generación de ROS fueron estimadas calculando las pendientes de las regresiones lineales, en todos los casos se realizaron blancos con la sonda y los compuestos agregados en los tratamientos que fueron luego descontados al expresar los valores.

#### **4.14. Determinación de niveles de AMPc intracelulares y mitocondriales**

Los hepatocitos en cultivo fueron pre tratados durante 5 minutos con el inhibidor de fosfodiesterasas 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 0,8 mM y luego incubados 30 minutos en medio con o sin glucosa. Un grupo extra fue tratado con el activador de adenilato ciclasa, Forskolina 50  $\mu$ M (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) para tener un control de la respuesta de los hepatocitos. Luego del tratamiento, una parte de las células de cada grupo fue sometida a fraccionamiento subcelular para obtener mitocondrias intactas. La extracción del AMPc se hizo mediante el tratamiento durante 20 minutos con etanol frío. Para la detección intracelular las células fueron directamente incubadas en la placa con etanol; para medir los niveles mitocondriales de AMPc, el pellet mitocondrial fue resuspendido en etanol e incubado 20 minutos, posteriormente las mitocondrias y el extracto alcohólico fueron separados por centrifugación. La detección del AMPc fue realizada en un laboratorio especializado en la misma (Dr. Davio, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). La metodología utilizada se basa en la competencia con [ $^3$ H]AMPc por PKA inmovilizada en una matriz de dextrano (206). Los resultados fueron expresados como picomoles/mg proteína.

#### **4.15. Aislamiento de ARN total**

El ARN total de hepatocitos fue purificado utilizando el reactivo de TRIzol® (Life Technologies) (197). Se agregó 200  $\mu$ l de TRIzol® por cada 2.500.000 células lo que llevó a la lisis de las mismas. Luego, las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 40  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugaron 15 minutos a 12.000 g a 4 °C. Se separó la fase superior acuosa que contiene el ARN y éste fue precipitado por el agregado de 100  $\mu$ L de alcohol isopropílico. Luego de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12.000 g a

4 °C. El pellet de ARN se lavó con 200 µl de etanol 75% (v/v) frío y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Para determinar la cantidad de ARN, se hicieron diluciones adecuadas de las muestras y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg/mL de ARN (207). Una relación de Abs260/Abs280 entre 1,7 y 2,1 indica pureza de la preparación respecto de contaminantes proteicos. La integridad del ARN purificado fue verificada por separación en un gel de agarosa desnaturalizante. El ARN obtenido fue almacenado a -70 °C hasta su utilización.

Posteriormente se realizó la transcripción reversa de 3 µg de ARN total con cebador Oligo-dT. Las muestras de ADN complementario (ADNc) se amplificaron usando los cebadores y condiciones de PCR que se muestran en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1**

Cebador	Secuencia 5' →3'
Catalasa F	GGATTATGGCCTCCGAGATCT
Catalasa R	ACCTGGATGTAAAAAGTCCAGGAT
Superóxido Dismutasa F	TGCTGAAGGGCGACGG
Superóxido Dismutasa R	GTCCTTCCAGCAGCCACAT
β Actina F	CAACCTTCTTGCAGCTCCTC
β Actina R	TTCTGACCCATAACCACCAT

Los nombres de los cebadores se refieren a su especificidad y su orientación: sentido (F, *forward*) o antisentido (R, *reverse*). Dichos cebadores fueron diseñados utilizando la información de la base de datos del *GeneBank of the National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y sintetizados por Invitrogen.

Los niveles de ARNm fueron analizados mediante PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa utilizando el kit comercial Platinum SYBRgreen PCR mix (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se inició con un único paso de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, seguida de 45 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, anillado a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 40 segundos. La PCR finalizó con un paso de elongación a 72 °C durante 7 minutos.

Como control de carga de ARN y para normalizar la expresión relativa de los otros genes analizados, se utilizó la expresión de β Actina. La relación de copias de los

ARNm de cada ADNc analizado fue determinada y cuantificada usando el método de cuantificación relativa ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (208).

#### **4.16. Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como la media aritmética  $\pm$  el error estándar. Se utilizó el test paramétrico “*t*” de Student para la comparación entre grupos. Los valores con  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados y Discusión

---

# Capítulo 1:

## Estudios en cultivo primario de hepatocitos de rata

---

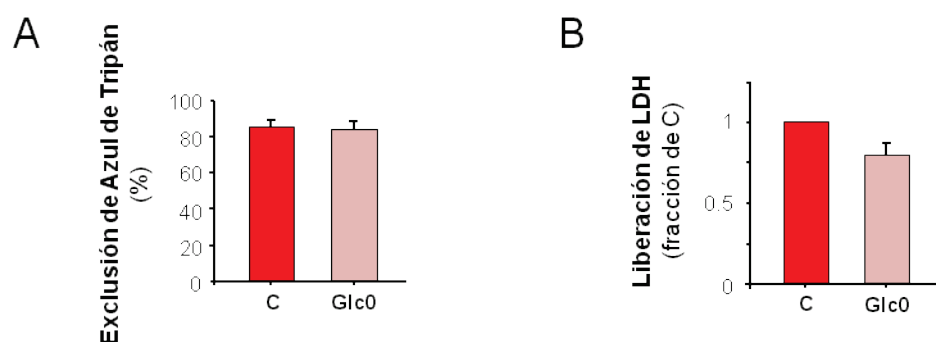
## 5. Resultados y Discusión

### Capítulo 1. Regulación de la muerte celular durante la restricción de glucosa en cultivo primario de hepatocitos de rata

#### 5.1.1. Estudios de viabilidad celular y de parámetros bioenergéticos

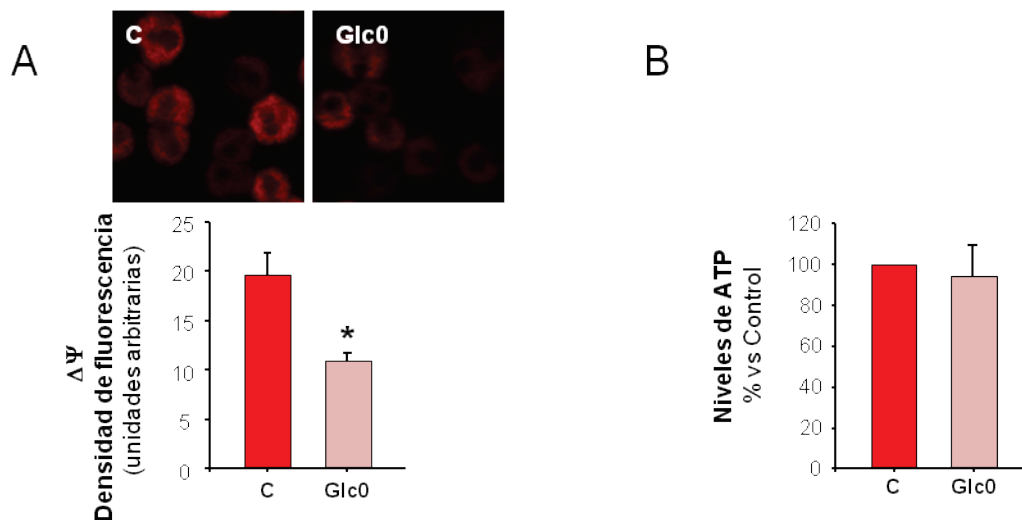
Para caracterizar la supervivencia de los hepatocitos ante la restricción de glucosa, se realizaron ensayos de viabilidad celular de los cultivos primarios de hepatocitos incubados distintos períodos de tiempo en las dos condiciones de cultivo. El objetivo de estos experimentos fue constatar si, en nuestras condiciones de trabajo, la ausencia de glucosa inducía muerte celular y cómo esto variaba con el tiempo de cultivo. Analizamos la viabilidad celular mediante los ensayos de Exclusión de Azul de Tripán (EAT) y el de Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

Los resultados del ensayo de EAT demostraron que a las 6 horas del tratamiento no hubo pérdida de la viabilidad celular (Figura 5.1.1.A). Para complementar con un ensayo más sensible de integridad celular, se cuantificó la liberación al medio de la enzima LDH. Los resultados mostraron que a las 6 horas la falta de glucosa tampoco indujo un aumento en la liberación de LDH al medio (Figura 5.1.1.B), siendo los valores del porcentaje de actividad de LDH liberada al medio en presencia y en ausencia de glucosa a las 6 horas de 53.4 % y 42.4 %, respectivamente.



**Figura 5.1.1. Integridad de membrana citoplasmática en hepatocitos privados de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM. (A) Se determinó la viabilidad celular por medio de la tinción con Azul de Tripán, el cual es excluido por las células viables. (B) Los hepatocitos fueron resuspendidos en el medio, centrifugados y se determinó la actividad LDH en las fracciones del *pellet* y del sobrenadante. La cantidad de enzima liberada es expresada como fracción del control. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Con el objeto de evaluar la integridad mitocondrial en hepatocitos sometidos a privación de glucosa, estudiamos el efecto de la ausencia de glucosa sobre el potencial de membrana mitocondrial. Para ello utilizamos el fluoróforo catiónico tetra-metil-rodamina-metil-éster (TMRM). La ausencia de glucosa produjo una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial (Figura 5.1.2.A). Cuando las células en ambas condiciones de cultivo fueron tratadas con el desacoplante CCCP, no se observaron diferencias en la fluorescencia (no mostrado), lo que indica que no hubo cambios en la captación del fluoróforo a través de la membrana plasmática entre las células control y sin glucosa, confirmando que las diferencias en la intensidad de fluorescencia observadas son debidas al efecto de la privación de glucosa sobre el potencial de membrana mitocondrial. Por otro lado, determinamos los niveles de ATP intracelular en hepatocitos controles y privados de glucosa durante 6 horas. Encontramos que la ausencia de glucosa no indujo cambios en la concentración de ATP en este período (Figura 5.1.2.B).

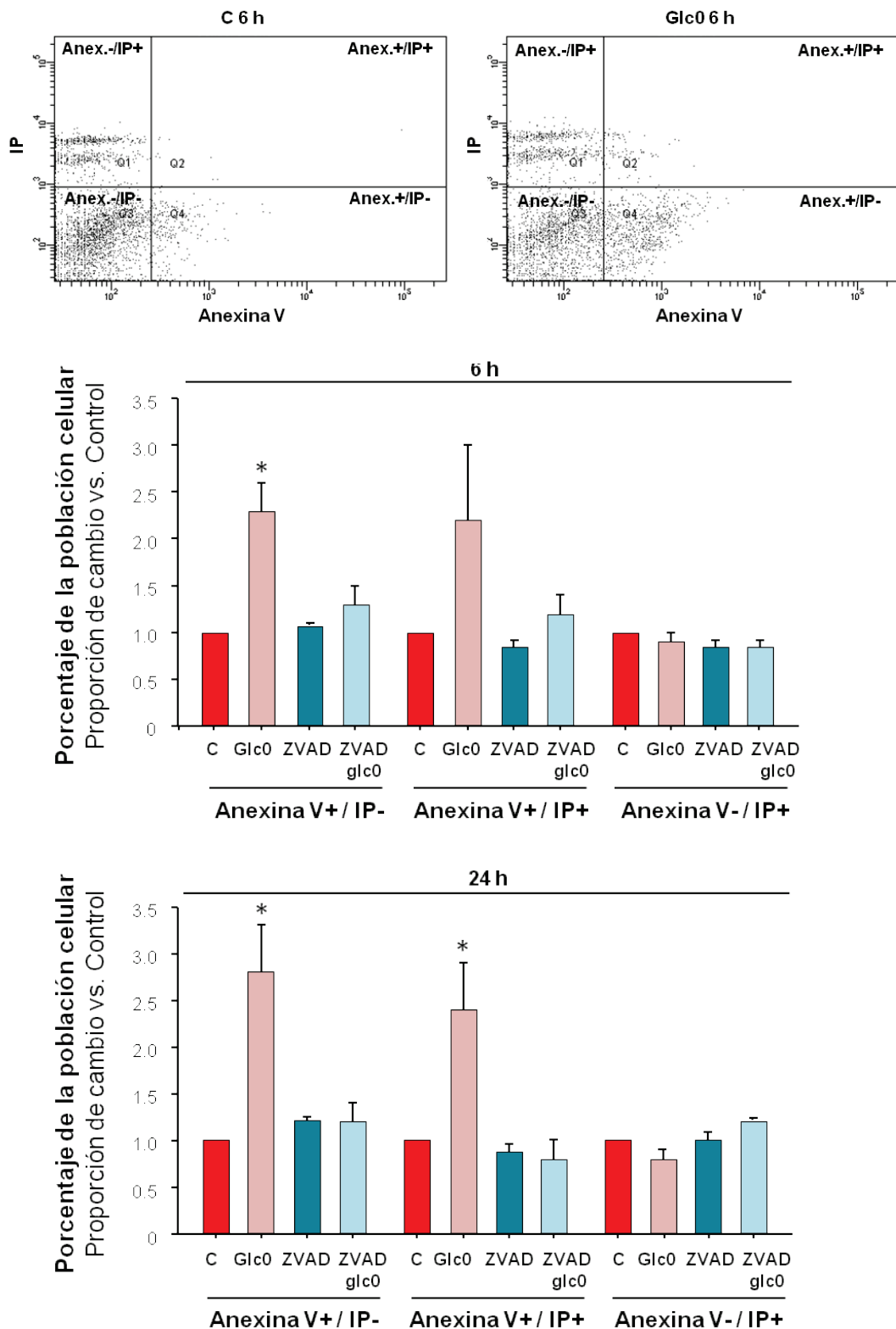


**Figura 5.1.2. Potencial de membrana mitocondrial y niveles de ATP en hepatocitos privados de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM. (A) Las células fueron incubadas 20 minutos con TMRM (50 nM). Se obtuvieron imágenes *in vivo* por microscopía de fluorescencia, y la densidad de fluorescencia intracelular se cuantificó con el programa Image J. (B) Las células fueron lavadas, sonicadas y se determinaron los niveles de ATP en los lisados celulares utilizando un kit comercial. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

### 5.1.2. Evaluación de muerte celular en hepatocitos privados de glucosa

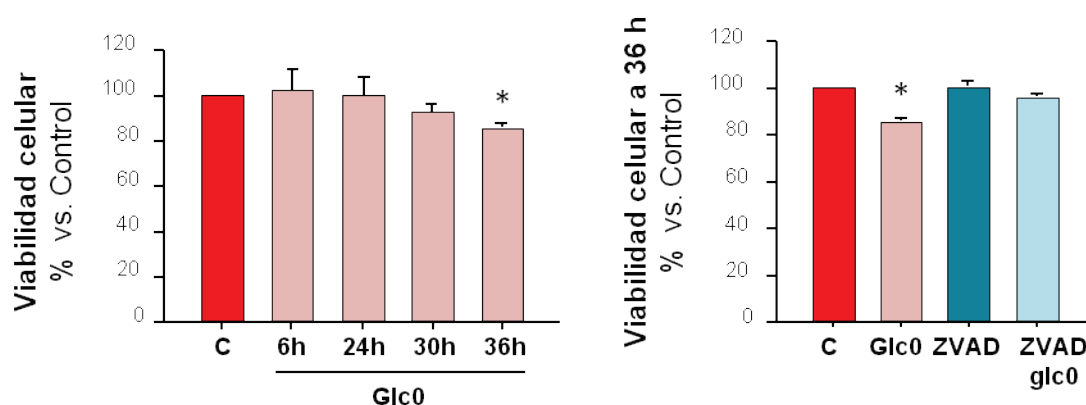
Debido a que la disipación del potencial de membrana mitocondrial es un evento temprano del proceso de apoptosis (82) y dado que los niveles de ATP, necesarios para desarrollo de este proceso, resultaron conservados, analizamos si la falta de glucosa inducía la activación de dicha vía de muerte celular. Realizamos estudios de citometría de flujo para determinar la activación apoptótica a lo largo del tiempo durante la ausencia de glucosa. El análisis de Anexina V/IP en nuestro modelo demostró que la ausencia de glucosa durante 6 horas aumentó significativamente la población de células con apoptosis temprana, alcanzando una proporción correspondiente al 16 % del total. En este período, la privación de glucosa indujo la muerte apoptótica en el 2 % de la población celular. Esta muerte aumentó significativamente luego de 24 horas de falta de glucosa (Figura 5.1.3). Estos resultados sugirieron que las células que iniciaron la activación apoptótica luego de 6 horas de ausencia de glucosa progresaron a una muerte apoptótica (necrosis secundaria) a las 24 horas. Mientras que el porcentaje de células con apoptosis temprana aumentó a un 32 % y la muerte por apoptosis alcanzó un 7 %, no hubo efecto en la muerte por necrosis primaria por falta de glucosa en este período (Figura 5.1.3).

Para corroborar que el mecanismo de muerte celular inducido por la falta de glucosa era el de apoptosis, utilizamos el inhibidor pan caspasa Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M). Demostramos que los aumentos en la apoptosis temprana y tardía fueron prevenidos por la presencia de este inhibidor de todas las caspasas, confirmando que la muerte apoptótica era mediada por la activación de estas proteasas (Figura 5.1.3). Además utilizamos el inhibidor de caspasa 3 Ac-DEVD-CHO (50  $\mu$ M), el cual también previno el aumento en células marcadas con anexina durante la ausencia de glucosa, esto nos indicó que la apoptosis procedió por la vía clásica.



**Figura 5.1.3. Inducción de apoptosis en hepatocitos durante la ausencia de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 y 24 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM, con o sin Z-VAD-FMK 50  $\mu$ M. Los hepatocitos fueron teñidos con Anexina V-FITC (Anexina) y con Ioduro de Propidio (IP) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas (Anexina+) y células muertas (IP+) mediante análisis de citometría de flujo. El panel superior muestra datos crudos de detección de fluorescencia verde (Anexina) y roja (IP) de experimentos típicos en células C y Glc0 a las 6 horas. Los gráficos de barras representan el aumento respecto a los controles en los porcentajes de células que sufren apoptosis temprana (Anexina+/IP-), de células apoptóticas muertas (Anexina+/IP+) y de células no apoptóticas muertas (Anexina-/IP+). \* $P < 0,05$  vs C.

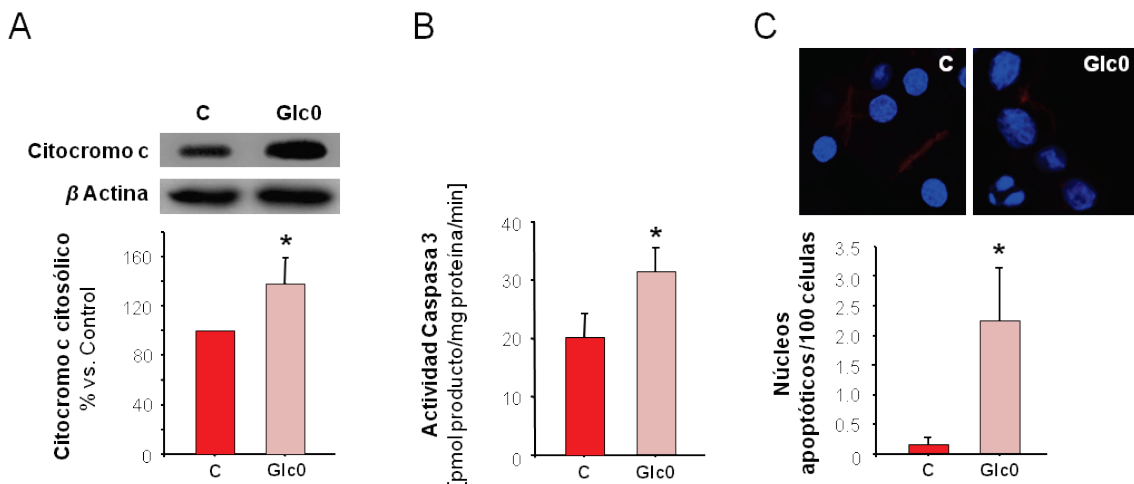
La detección de apoptosis por citometría de flujo es apropiada para células en suspensión, pero puede presentar algunas limitaciones técnicas para detectar muerte no apoptótica en células adherentes, ya que requiere procedimientos adicionales antes de la evaluación por citometría de flujo (las células deben ser levantadas con espátula y/o tripsina, lavadas con PBS, minuciosamente homogeneizadas para evitar la formación de agregados y agitadas constantemente durante el ensayo). Todo este proceso puede acarrear la pérdida de células muertas, y la consiguiente subestimación de los índices de muerte, ya sea necrótica o apoptótica, en las distintas poblaciones celulares. Por esta razón decidimos realizar el ensayo de reducción del MTT que detecta pérdida de viabilidad sin necesidad de resuspender las células previamente y requiere una manipulación mínima. Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, la cual se estima midiendo la formación de un compuesto coloreado en las células en cultivo, por medio de una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El ensayo fue realizado en hepatocitos incubados en ausencia de glucosa con o sin el inhibidor pan caspasa Z-VAD-FMK. A lo largo de los tiempos estudiados (hasta 36 horas) no hubo disminución en la viabilidad de los hepatocitos incubados en presencia de glucosa. Por otro lado, no hubo muerte celular apreciable en hepatocitos deprivados de glucosa hasta las 24 horas de cultivo, sin embargo la pérdida de viabilidad se hizo evidente después de 30 horas de ausencia de glucosa, alcanzando un 15 % a las 36 horas. Este aumento en la muerte celular fue completamente bloqueado por el inhibidor pan caspasa Z-VAD-FMK (Figura 5.1.4).



**Figura 5.1.4. Supervivencia de hepatocitos durante la ausencia de glucosa.** Los hepatocitos fueron cultivados en microplacas e incubados durante 6, 24, 30 y 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM, con o sin Z-VAD-FMK 50  $\mu$ M. Posteriormente se realizó el ensayo de MTT y se cuantificó la absorbancia a 550 nm de este metabolito producido por las células viables. Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células control. El gráfico de la izquierda ilustra el efecto de la falta de glucosa sobre la viabilidad celular en el tiempo. El gráfico de la derecha muestra el efecto de Z-VAD-FMK sobre el porcentaje de supervivencia de las células a las 36 horas de tratamiento. \* $P < 0,05$  vs C.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo y MTT demostraron entonces que la falta de glucosa en hepatocitos induce activación apoptótica dependiente de caspasas en ausencia de necrosis primaria durante los períodos de tiempo estudiados.

Dado que la restricción de glucosa durante 6 horas fue suficiente para inducir la externalización de fosfatidilserina en cultivo de hepatocitos, se analizaron también otros eventos característicos del proceso apoptótico a este tiempo de estudio, como la liberación de citocromo c a citosol, la actividad de la caspasa 3 y la fragmentación nuclear. Debido a que la disipación del  $\Delta\Psi$  es un evento temprano y común durante la apoptosis mitocondrial, analizamos si la falta de glucosa induce liberación de citocromo c a citosol que es un evento clave durante esta vía de muerte celular. Para ello analizamos la expresión de citocromo c en fracciones citosólicas de hepatocitos. Observamos un marcado aumento en la localización de citocromo c en citosol después de 6 horas de incubación en ausencia de glucosa (Figura 5.1.5.A). Por otro lado, los resultados demuestran que 6 horas de incubación en ausencia de glucosa indujeron un aumento significativo de la actividad caspasa 3 (Figura 5.1.5.B) y fragmentación nuclear (Figura 5.1.5.C) en cultivo primario de hepatocitos. En base a estos resultados podemos concluir que la ausencia de glucosa durante 6 horas induce la activación de la vía mitocondrial de apoptosis en hepatocitos en cultivo.

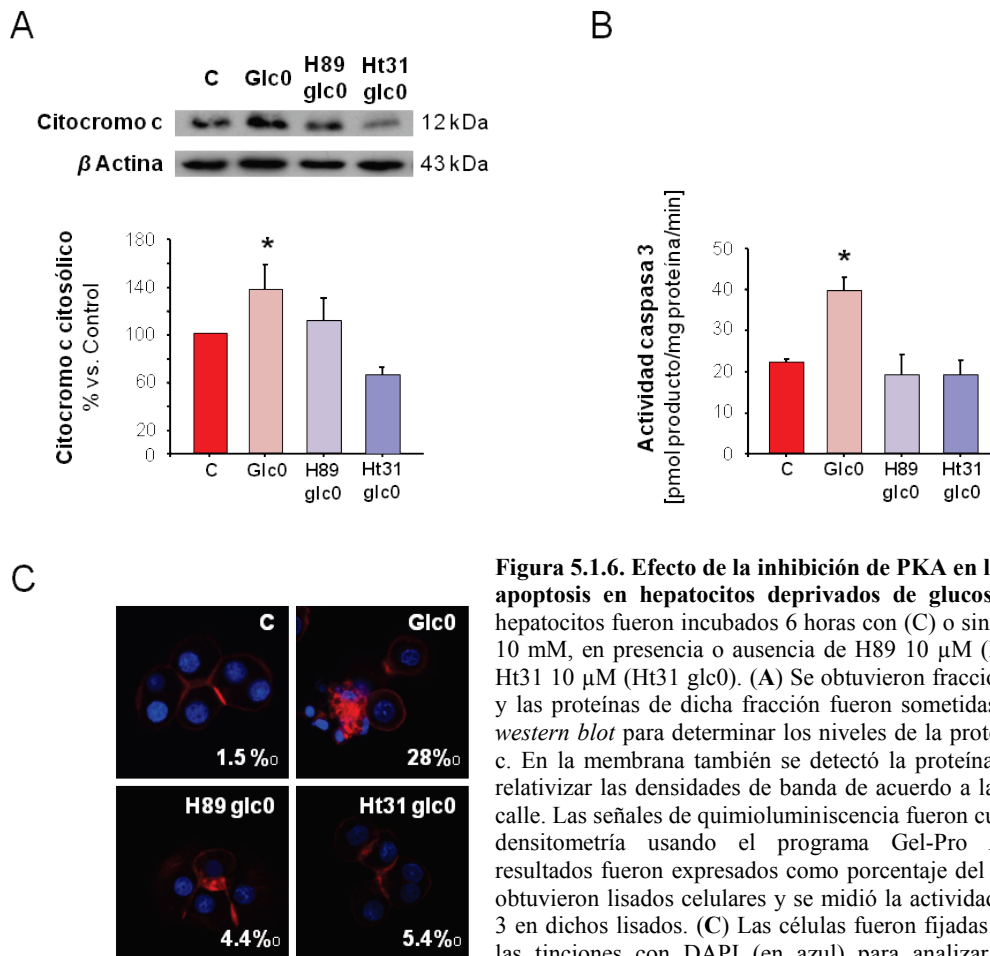


**Figura 5.1.5. Inducción de apoptosis en hepatocitos privados de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM. (A) Se obtuvieron fracciones citosólicas y las proteínas de dicha fracción fueron sometidas a análisis por *western blot* para determinar los niveles de la proteína Citocromo c. En la membrana también se detectó la proteína  $\beta$  Actina para relativizar las densidades de banda de acuerdo a la carga en cada calle. Las señales de quimioluminiscencia fueron cuantificadas por densitometría usando el programa Gel-Pro Analyzer. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control. (B) Se obtuvieron lisados celulares y se midió la actividad de la Caspasa 3 en dichos lisados. (C) Las células fueron fijadas y se realizaron las tinciones con DAPI (en azul) para analizar la morfología nuclear y con faloidina (en rojo) para visualizar el citoesqueleto de actina. Las imágenes fueron analizadas por microscopia de fluorescencia y se cuantificó el porcentaje de núcleos apoptóticos sobre un total de al menos 400 células en cada grupo. Las barras representan la media del porcentaje de células apoptóticas. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 4 (A), 3 (B) y 6 (C) experimentos. \* $P < 0,05$  vs C.

### 5.1.3. Estudio de la participación de PKA en la apoptosis inducida por falta de glucosa en hepatocitos

Numerosos estudios sugieren que PKA participa en vías de señalización involucradas en la regulación de la supervivencia celular. Específicamente en hepatocitos, Danial y colaboradores identificaron un complejo conformado por PKA, la proteína de anclaje a PKA, WAVE-1, la proteína pro-apoptótica Bad, la glucoquinasa y la fosfatasa PP1. Dicho complejo se localiza en la membrana mitocondrial y podría proporcionar una conexión entre el metabolismo de la glucosa y la maquinaria de apoptosis (100). Este estudio sugiere un papel pro-supervivencia para PKA durante la ausencia de glucosa en suspensiones de hepatocitos, en condiciones donde la viabilidad celular se encuentra marcadamente afectada (100). Nos interesó analizar entonces la participación que podía tener PKA en la inducción de apoptosis y en los procesos mitocondriales característicos de dicho proceso durante la restricción de glucosa en cultivo de hepatocitos. Para estos estudios utilizamos el inhibidor de la actividad de PKA, H89, y el péptido inhibidor del anclaje de PKA, Ht31. El Ht31 contiene los 24 aminoácidos consenso de la  $\alpha$ -hélice responsable de la interacción de las AKAPs con la subunidad reguladora de PKA, lo que le permite unirse con alta afinidad a PKA, induciendo una inhibición competitiva de la interacción de PKA con sus proteínas de anclaje (209). A partir de hepatocitos incubados durante 6 horas en presencia y ausencia de glucosa, con o sin el péptido inhibidor del anclaje de PKA, Ht31, o con o sin el inhibidor de la actividad de PKA, H89, realizamos estudios de microscopía de inmunofluorescencia para analizar la morfología nuclear y obtuvimos lisados celulares totales, y fracciones citosólicas, donde analizamos la actividad de caspasa 3 y los niveles de citocromo c, respectivamente.

Observamos que tanto la presencia de H89 como de Ht31 previnieron el aumento en los niveles de citocromo c en citosol, en la actividad de la caspasa 3 y en la fragmentación nuclear de los hepatocitos incubados 6 horas en ausencia de glucosa (Figura 5.1.6). De esta manera, los resultados obtenidos al inhibir PKA mediante dos mecanismos diferentes, indican que dicha proteína participa en la inducción de la muerte celular programada causada por restricción de glucosa.



**Figura 5.1.6. Efecto de la inhibición de PKA en la inducción de apoptosis en hepatocitos privados de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 horas con (C) o sin (Glc0) glucosa 10 mM, en presencia o ausencia de H89 10  $\mu$ M (H89 glc0) o de Ht31 10  $\mu$ M (Ht31 glc0). (A) Se obtuvieron fracciones citosólicas y las proteínas de dicha fracción fueron sometidas a análisis por *western blot* para determinar los niveles de la proteína Citocromo c. En la membrana también se detectó la proteína  $\beta$  Actina para relativizar las densidades de banda de acuerdo a la carga en cada calle. Las señales de quimioluminiscencia fueron cuantificadas por densitometría usando el programa Gel-Pro Analyzer. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control. (B) Se obtuvieron lisados celulares y se midió la actividad de la Caspasa 3 en dichos lisados. (C) Las células fueron fijadas y se realizaron las tinciones con DAPI (en azul) para analizar la morfología nuclear y con faloidina (en rojo) para visualizar el citoesqueleto de actina. Las imágenes fueron analizadas por microscopia de fluorescencia y el porcentaje de núcleos apoptóticos cuantificados sobre un total de al menos 400 células en cada grupo. Las barras representan la media del porcentaje de células apoptóticas. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 4 (A), 3 (B) y 6 (C) experimentos. \* $P < 0,05$  vs C.

Las señales de apoptosis promueven la oligomerización y translocación de la proteína Bax a mitocondrias, lo que promueve la generación de la estructura de poro que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y a la liberación de citocromo c (210). Por lo tanto, evaluamos el efecto de la ausencia de glucosa sobre la translocación de Bax a mitocondria. Los hepatocitos incubados durante 6 horas en ausencia de glucosa presentaron un aumento significativo, de aproximadamente un 90 %, en los niveles de Bax en mitocondrias. Por otro lado, la presencia del inhibidor de la actividad de PKA, H89, así como la presencia del péptido inhibidor del anclaje de PKA, Ht31, previnieron este aumento en los niveles de Bax en mitocondrias (Figura 5.1.7.A Izquierda), sin producir cambio alguno en hepatocitos cultivados en medio con glucosa

(no mostrado). No se hallaron diferencias en la expresión de Bax entre hepatocitos controles y deprivados de glucosa (Figura 5.1.7.A *Derecha*), por lo tanto podemos concluir que los cambios observados en los niveles de Bax mitocondrial en condiciones de restricción de glucosa se deben a un aumento en la translocación de Bax a mitocondrias.

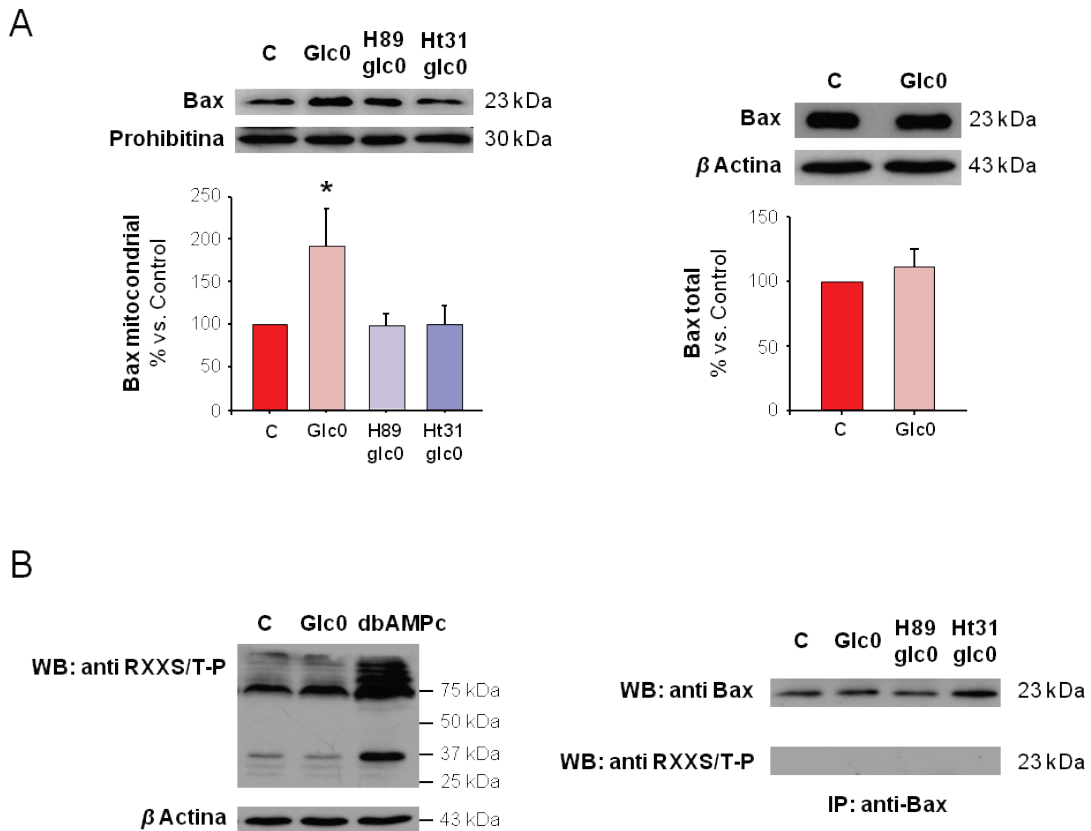
Posteriormente, analizamos si PKA podía intervenir directamente en la activación de Bax favoreciendo su translocación a mitocondria.

Se ha descrito que la fosforilación secuencial de distintos residuos de serina de Bax promueve diferentes cambios conformacionales que llevan a su activación *in vitro*. Uno de estos residuos se encuentra en una secuencia consenso conservada de fosforilación por PKA (211). Para evaluar si la prevención de la translocación de Bax a mitocondrias mediada por H89 y Ht31 durante la ausencia de glucosa fue debido a la inhibición de su posible fosforilación por PKA, analizamos la presencia de residuos fosforilados por PKA en inmunoprecipitados de Bax. A partir de lisados totales de hepatocitos incubados 6 horas en las distintas condiciones de cultivo, se prepararon inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo anti-Bax, a partir de los cuales se evaluó la presencia de Bax y de Bax fosforilado.

La detección de residuos fosforilados fue realizada utilizando un anticuerpo que reconoce las formas fosforiladas de serinas y treoninas que son sustratos de PKA (RXXS/T(P)), como describimos previamente (199). En primer lugar, a manera de control positivo y confirmación de que en nuestras condiciones de trabajo el anticuerpo detectaba sitios fosforilados por PKA, usamos este anticuerpo para analizar por *western blot* la presencia de restos fosforilados por PKA en proteínas totales de lisados provenientes de hepatocitos cultivados en condiciones controles y en presencia del activador de PKA dbAMPc (dibutilil AMP cíclico), que es un análogo del AMPc capaz de permear a través de las membranas biológicas.

La Figura 5.1.7.B *Izquierda* ilustra un ensayo de *western blot* típico, entre otros con resultados similares, en el que se observa, en los grupos indicados, el patrón de bandas correspondientes a proteínas fosforiladas por PKA detectadas con el anticuerpo ensayado (ver leyenda de figura), observándose que las bandas resultaron notoriamente más intensas en presencia del activador de PKA, en correspondencia con la mayor actividad fosforilante de esta quinasa.

Habiendo probado que es posible detectar fosforilación por PKA en nuestro sistema, usamos este anticuerpo para la detección de residuos fosforilados por PKA en los inmunoprecipitados de Bax.



**Figura 5.1.7. Efecto de la inhibición de PKA sobre la localización de Bax durante la apoptosis activada por falta de glucosa en hepatocitos.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados 6 horas con (C) o sin (Glc0) glucosa 10 mM, en presencia de dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc), de H89 10  $\mu$ M (H89 glc0) o de Ht31 10  $\mu$ M (Ht31 glc0). (A) Se obtuvieron lisados celulares y fracciones enriquecidas en mitocondrias y las proteínas de dichas fracciones fueron sometidas a análisis por *western blot* para determinar los niveles de la proteína Bax en mitocondrias (izquierda) y en lisados (derecha). En las membranas también se detectó la proteína Prohibitina o  $\beta$  Actina para relativizar las densidades de banda de acuerdo a la carga en cada calle. Las señales de quimioluminiscencia fueron cuantificadas por densitometría. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de 7 experimentos. \* $P < 0,05$  vs C. (B) *Izquierda.* Se identificaron por *western blot* las proteínas que contenían residuos fosforilados por PKA (RXXS/T-P) en los lisados de hepatocitos C, Glc0 y dbAMPc, la proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. *Derecha.* Obtuvimos lisados celulares como en (A) y posteriormente 200  $\mu$ g de proteínas fueron sometidas a inmunoprecipitación de Bax y posterior determinación de Bax y de residuos RXXS/T-P por *western blot*. El *immunoblotting* mostrado es representativo de 4 experimentos.

La Figura 5.1.7.B *Derecha* muestra, en la parte superior, un *immunoblotting* realizado con anticuerpo anti-Bax, en el que se observa una banda de 23 kDa correspondiente a la proteína inmunoprecipitada. Posteriormente la misma membrana fue reprobada con el anticuerpo que reconoce residuos fosforilados por PKA (abajo), no

detectándose banda alguna que pudiera corresponder a la proteína Bax fosforilada. Los *immunoblottings* mostrados son representativos de 4 experimentos con los mismos resultados.

Como conclusión parcial de estos estudios, podemos decir que PKA induce la translocación de Bax a mitocondrias en ausencia de glucosa, por un mecanismo que no involucra la fosforilación directa de esta proteína. Estos datos indican que la señalización mediada por PKA durante la activación de la apoptosis inducida por falta de glucosa en hepatocitos se produce cascada arriba de la translocación de Bax a mitocondrias.

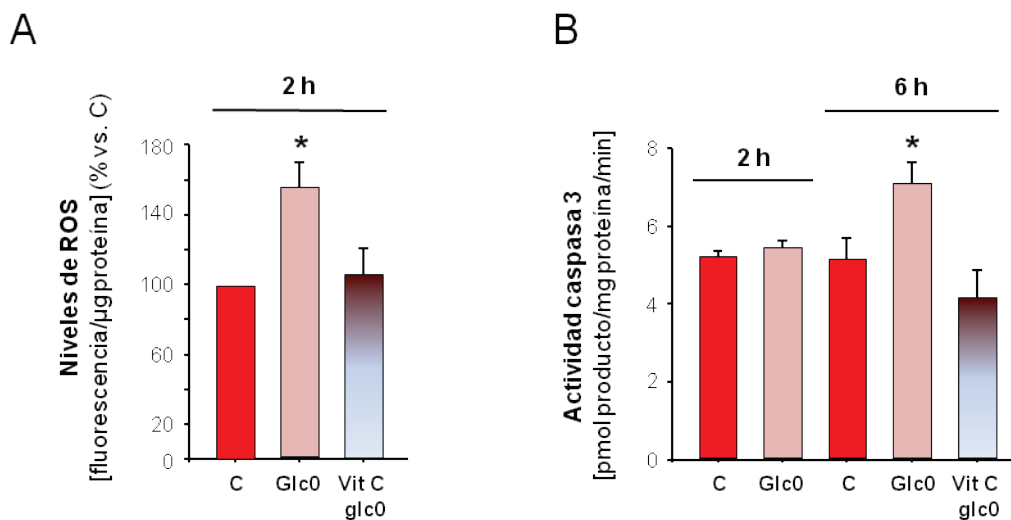
#### **5.1.4. Rol del estrés oxidativo en la inducción de apoptosis durante la restricción de glucosa**

Según la literatura, existen evidencias que demuestran que en diferentes líneas celulares la falta de glucosa induce estrés oxidativo metabólico secundario a la generación de superóxido y peróxido de hidrógeno durante la respiración mitocondrial (204,212,213). Aunque este efecto ha sido descrito en líneas celulares derivadas de hepatoma (214), a la fecha de la realización de este trabajo de tesis no se había demostrado en cultivo primario de hepatocitos. Por lo tanto analizamos si la deprivación de glucosa induce aumento de ROS en cultivo primario de hepatocitos y si este mecanismo interviene en la activación de la vía apoptótica en esas condiciones.

La formación de ROS se cuantificó en forma directa utilizando el fluoróforo DCFH-DA sensible a la oxidación por ROS intracelulares. El compuesto no fluorescente DCFH-DA, agregado al medio de incubación, atraviesa libremente la membrana de los hepatocitos, siendo metabolizado por esterasas no específicas y oxidado al compuesto fluorescente DCF por los ROS intracelulares. Cuando los hepatocitos fueron incubados en medio libre de glucosa se observó un marcado aumento en los niveles de ROS a partir de las 2 horas de tratamiento (Figura 5.1.8.A). Dicho aumento de ROS se mantuvo hasta las 6 horas de restricción de glucosa (no mostrado). Por otro lado, los niveles de acumulación de ROS no fueron significativamente diferentes entre hepatocitos incubados en presencia de glucosa en los distintos períodos de tiempo analizados (no mostrado).

Está documentado que el aumento en los niveles de ROS puede mediar la inducción de apoptosis (48). Por lo tanto analizamos si el desbalance de ROS inducido

por la falta de glucosa era causante de la apoptosis observada tras 6 horas de tratamiento. Teniendo en cuenta que el aumento en los niveles de ROS fue observado a partir de las dos horas de incubación en medio libre de glucosa, evaluamos la actividad caspasa 3 a este tiempo y luego de 6 horas de restricción de glucosa en presencia del antioxidante vitamina C. No se observó aumento en la actividad caspasa 3 luego de 2 horas de incubación en ausencia de glucosa, demostrando de esta manera que el aumento en los niveles de ROS precedió a la activación de la apoptosis. Por otro lado, la presencia de vitamina C previno este aumento temprano en los niveles de ROS (Figura 5.1.8.A) y la consiguiente inducción de caspasa 3 a las 6 horas de restricción de glucosa (Figura 5.1.8.B). La presencia de vitamina C no indujo cambios en los niveles de ROS y en la actividad caspasa 3 en hepatocitos incubados en presencia de glucosa, dichos grupos fueron omitidos en la correspondiente figura. Por lo tanto concluimos que este estrés oxidativo precozmente desarrollado en los hepatocitos deprivados de glucosa fue el desencadenante de la apoptosis observada a las 6 horas de falta de glucosa.

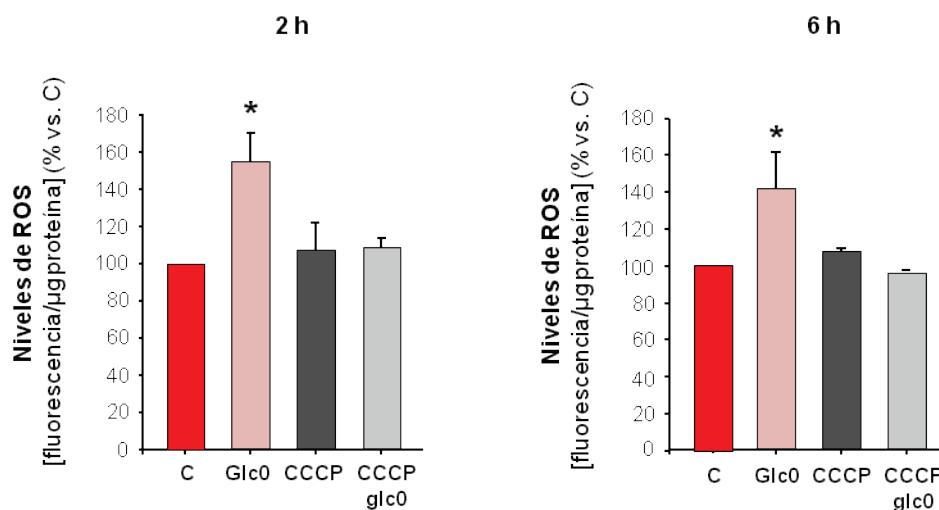


**Figura 5.1.8. Rol del estrés oxidativo en la inducción de apoptosis en hepatocitos deprivados de glucosa.** Cultivos de hepatocitos fueron incubados en presencia (C) o en ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM, con o sin vitamina C 1 mM durante los períodos de tiempo indicados. (A) Las células fueron cargadas con DCFH-DA (5  $\mu$ M) durante 30 minutos, y posteriormente fueron lavadas y resuspendidas y sonicadas. El producto oxidado fluorescente, DCF, fue inmediatamente detectado. (B) Se obtuvieron lisados celulares en los cuales se determinó la actividad caspasa 3. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 8 (A) y 3 (B) experimentos. \* $P < 0,05$  vs C en el mismo tiempo.

Debido a que la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente importante de anión superóxido (71), estudiamos si la respiración mitocondrial contribuía en este caso a la acumulación de ROS durante la falta de glucosa. Con este fin, inhibimos

parcialmente la cadena respiratoria mitocondrial usando el ionóforo cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) en concentraciones que desacoplan levemente la fosforilación oxidativa modulando el gradiente de protones de la membrana mitocondrial (204). El fundamento de este método radica en que la generación de especies reactivas del oxígeno es muy dependiente del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial, lo que explica por qué los desacoplantes inhiben la generación de estrés oxidativo (71). La formación de ROS se cuantificó en forma directa utilizando el fluoróforo DCFH-DA (203). Los hepatocitos en cultivo fueron incubados 2 y 6 horas en presencia o ausencia de glucosa, con o sin CCCP (500 nM).

Los resultados demostraron que la presencia de CCCP bloqueó significativamente la elevación de ROS tanto a las 2 como a las 6 horas de falta de glucosa (Figura 5.1.9), indicando de esta manera, que la cadena respiratoria mitocondrial contribuye al desbalance de ROS generado durante la privación de glucosa. El tratamiento con CCCP también previno la activación de apoptosis a las 6 horas de falta de glucosa, evaluada por el ensayo de Anexina V/IP (resultados no mostrados), confirmando todo esto la participación de la cadena respiratoria mitocondrial en la inducción de apoptosis.

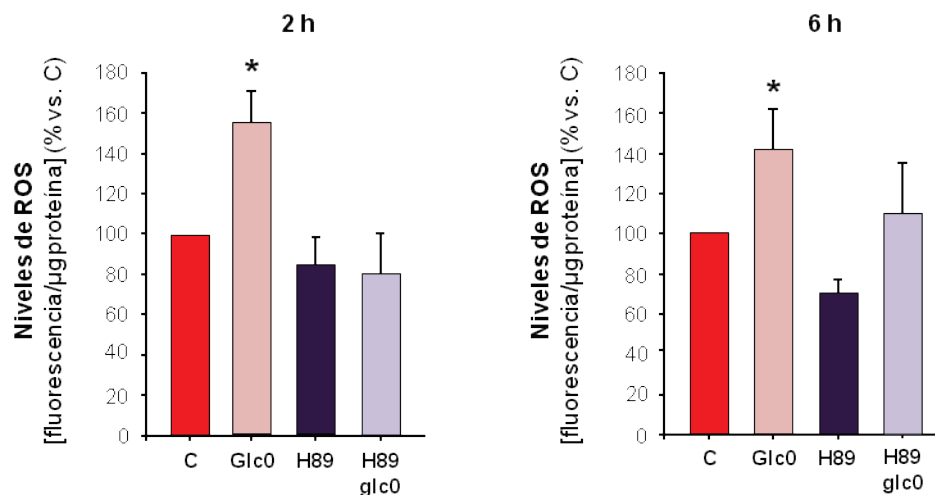


**Figura 5.1.9. Efecto del desacoplamiento mitocondrial sobre el aumento de ROS inducido por falta de glucosa.** Los hepatocitos en cultivo fueron incubados 2 (izquierda) y 6 (derecha) horas, en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM y con o sin CCCP 500 nM (CCCP). Seguidamente, las células fueron cargadas con DFCH-DA 5  $\mu$ M por 30 minutos, lavadas y sonicadas. Las barras representan los niveles del producto oxidado fluorescente DCF detectado en hepatocitos incubados por los períodos de tiempo indicados. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  error estándar. \* $P < 0,05$  vs C.

### 5.1.5. Participación de PKA en el desbalance de ROS durante la ausencia de glucosa

El estrés oxidativo es un proceso deletéreo que resulta de un desbalance entre la formación de especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes (58). Está descrito que PKA puede modular la producción de ROS regulando la actividad de la cadena respiratoria (105,106,111). Además, en levaduras, PKA también es capaz de regular la expresión de genes de enzimas antioxidantes (118). Por lo tanto, estudiamos el rol de PKA en la acumulación de ROS durante la ausencia de glucosa.

En primer lugar, nuestros resultados demostraron que PKA está involucrada en la inducción de la acumulación de ROS en hepatocitos privados de glucosa, ya que la inhibición de la misma con el inhibidor H89, previno el aumento de ROS tanto a las 2 como a las 6 horas de ausencia de glucosa (Figura 5.1.10).



**Figura 5.1.10. Efecto de la inhibición de PKA sobre el desbalance de ROS durante la privación de glucosa.** Los hepatocitos fueron incubados 2 (izquierda) o 6 (derecha) horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM, con o sin H89 10  $\mu$ M (H89). (Izquierda) Las células fueron cargadas con DFCH-DA 5  $\mu$ M por 30 minutos, lavadas y sonicadas. Las barras representan los niveles del producto oxidado fluorescente DCF detectado en hepatocitos incubados por los períodos de tiempo indicados. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  error estándar. \* $P < 0,05$  vs. C.

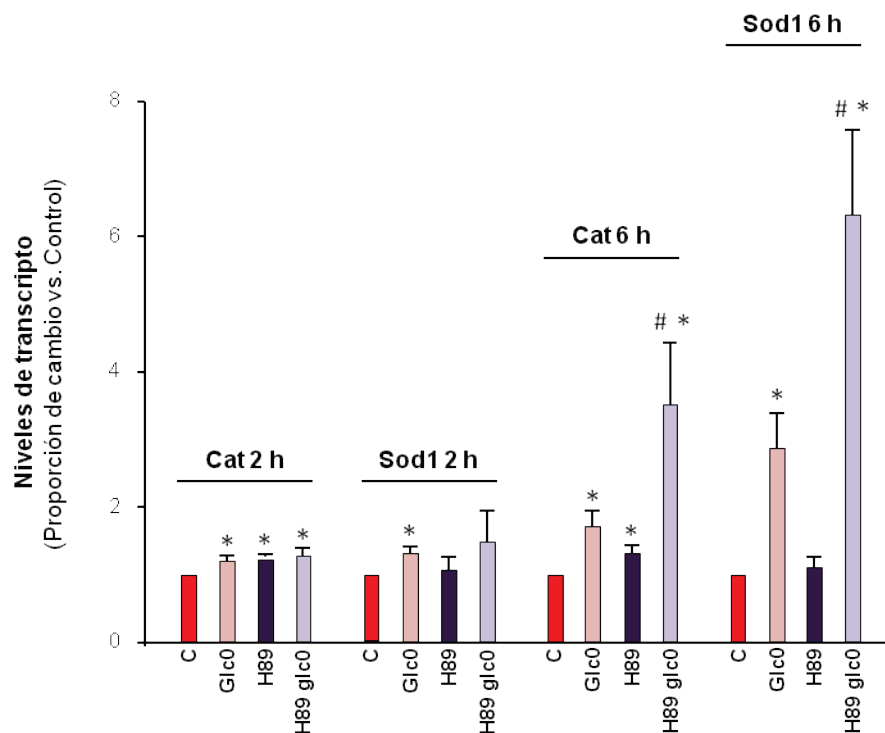
En base a estos resultados, indagamos si PKA podría estar modulando negativamente el secuestro y/o contribuyendo a la producción de ROS.

#### 5.1.5.1. Participación de PKA en el secuestro de ROS

Debido a que en eucariotas inferiores, como la levadura *S. cerevisiae*, PKA regula la expresión de genes de enzimas que secuestran ROS (118), investigamos el rol

de PKA en la regulación de genes de enzimas antioxidantes durante la ausencia de glucosa en hepatocitos normales.

El análisis de los niveles de ARNm demostró que la incubación durante 2 o 6 horas en medio sin glucosa indujo aumentos significativos en los niveles de ARNm de los genes de las enzimas Catalasa (Cat) y Superóxido Dismutasa 1 (Sod1). La inhibición de PKA no produjo cambios en los niveles de transcritos después de 2 horas de incubación en medio libre de glucosa. Sin embargo, luego de 6 horas de ausencia de glucosa, la inhibición de PKA potenció significativamente el aumento en los niveles de ARNm de ambos genes (Figura 5.1.11). Estos resultados sugirieron que PKA modula el secuestro de ROS regulando negativamente la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo.

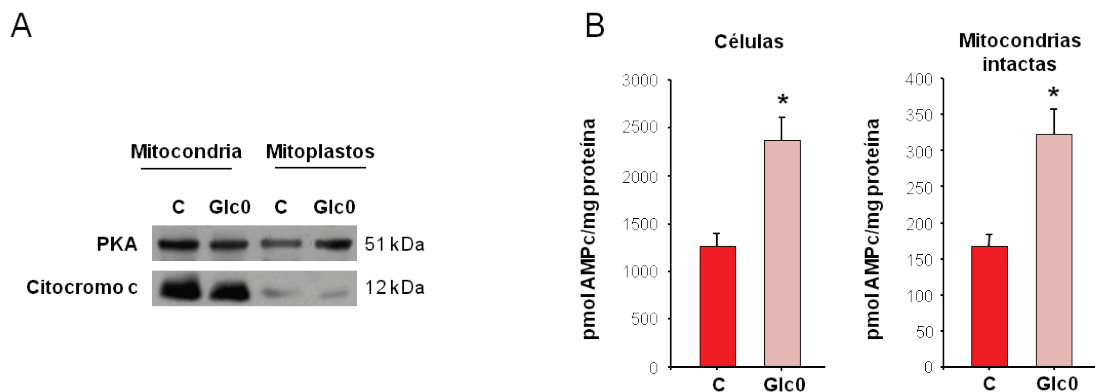


**Figura 5.1.11. Efecto de la inhibición de PKA sobre el desbalance de ROS durante la ausencia de glucosa.** Los hepatocitos fueron incubados 2 y 6 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM, con o sin H89 (H89). Se preparó ADNc a partir de ARN aislado de los diferentes grupos de hepatocitos, y los niveles de transcritos de Catalasa (Cat) y Superóxido Dismutasa (Sod1) fueron cuantificados por PCR cuantitativa. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $P < 0,05$  vs. C. # $P < 0,05$  vs. Glc0.

### 5.1.5.2. Participación de PKA en la producción de ROS mitocondrial durante la respiración

Existen evidencias de que algunas proteínas que forman parte de diferentes complejos respiratorios son sustratos de PKA, y de esta manera, la misma podría modular la producción de ROS regulando la actividad de la cadena respiratoria. En primer lugar comprobamos la presencia de PKA (la subunidad RII $\alpha$ ) tanto en mitocondrias como en subfracciones mitocondriales (mitoplastos) de hepatocitos controles y privados de glucosa, determinando que la expresión de la misma no varía durante la incubación en medio sin glucosa (Figura 5.1.12.A).

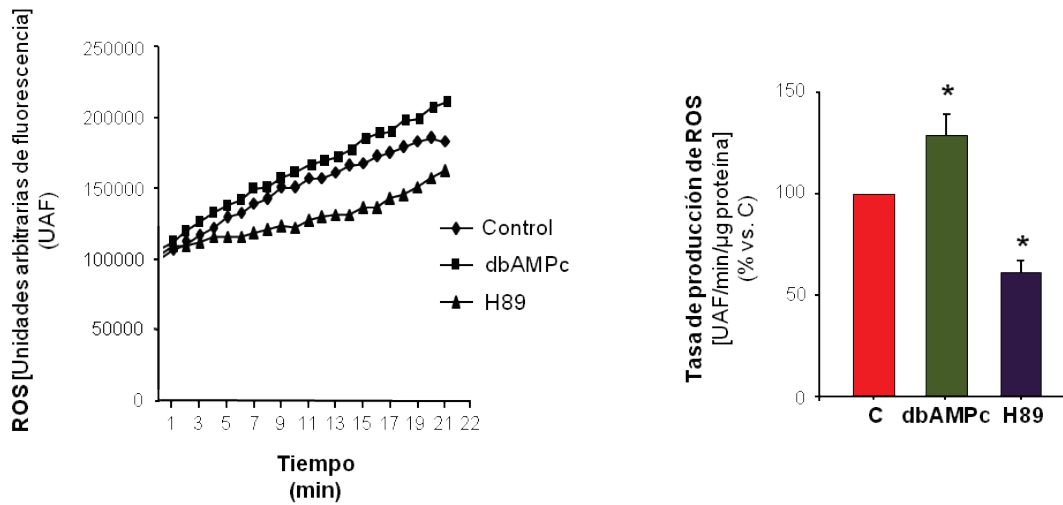
Dado que está reportada la presencia de adenilato ciclasa en mitocondrias de hígado, que produce AMPc y activa PKA en el interior de la organela (105), verificamos si esta vía podía estar estimulada durante la falta de glucosa. Para ello cuantificamos los niveles de AMPc intracelulares y en mitocondrias intactas de hepatocitos incubados 30 minutos en medio con o sin glucosa. Como control metodológico utilizamos un grupo de hepatocitos incubado con el activador de la adenilato ciclasa, Forskolina, el cual indujo un aumento de 10 veces en los niveles de AMPc (no mostrado).



**Figura 5.1.12. Efecto de la ausencia de glucosa sobre los niveles de AMPc intracelulares y mitocondriales.** (A) Se obtuvieron lisados totales y fracciones subcelulares de hepatocitos incubados 6 horas (A) o 30 minutos (B) en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 10 mM. Para analizar los niveles de AMPc (B), los hepatocitos fueron pretratados con IBMX (A) Se inmunodetectó la subunidad reguladora de PKA (RII $\alpha$ ) en mitocondrias totales y mitoplastos, mediante ensayos de *western blot* de cantidades equivalentes de proteínas de las correspondientes fracciones subcelulares. En las mismas membranas, se analizó la presencia de Citocromo c (proteína del espacio intermembrana) para comprobar la purificación de los preparados de mitoplastos. La foto representa un experimento típico entre varios similares. (B) Se determinaron los niveles de AMPc en extractos celulares totales (izquierda) y mitocondrias (derecha) de los hepatocitos sujetos a los tratamientos indicados. Los valores representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  error estándar. \* $P < 0,05$  vs. C.

Nuestros resultados indicaron que la ausencia de glucosa generó un aumento en los niveles de AMPc cercano al 100%, tanto en extractos celulares totales como mitocondriales (Figura 5.1.12.B). Considerando que las proteínas presentes en fracciones mitocondriales en nuestras preparaciones representaron menos del 30 % de las proteínas intracelulares totales (datos no mostrados), concluimos que los niveles de AMPc aumentaron en mitocondrias y en otros compartimientos intracelulares.

Posteriormente, analizamos si la producción de ROS durante la respiración podía estar modulada por la actividad de PKA mitocondrial hepática. Para ello aislamos mitocondrias intactas de hígado de rata y analizamos la producción mitocondrial de ROS utilizando la sonda DCFH-DA. Detectamos la producción mitocondrial de ROS incubando las mitocondrias en un medio de respiración no fosforilante (estado 4) conteniendo DCFH-DA, a 37 °C y con agitación continua. Las mitocondrias fueron incubadas en presencia de distintos sustratos respiratorios, con o sin inhibidores de PKA (H89, Rp-AMPc) o activadores de PKA (dbAMPc + IBMX). Las medidas de fluorescencia fueron registradas cada minuto durante 30 minutos y se estimó la tasa de producción de ROS. La presencia del activador de PKA, dbAMPc, aumentó significativamente la liberación mitocondrial de ROS durante la respiración conducida por todos los sustratos (+55 % para succinato, +29 % para malato/piruvato y +56 % para succinato + malato/piruvato), mientras que la presencia del inhibidor de PKA, H89, disminuyó marcadamente la tasa de producción de ROS mitocondrial (-30 % para succinato, -39 % para malato/piruvato y -30 % para succinato + malato/piruvato) (Figura 5.1.13). Resultados similares fueron observados en presencia del inhibidor Rp-AMPc (no mostrado). Estos resultados indicaron que PKA modula positivamente la producción mitocondrial de ROS.



**Figura 5.1.13. Rol de la señalización por PKA sobre la producción de ROS mitocondrial.** Se incubaron mitocondrias de hígado en un buffer de respiración a 37 °C en presencia de DCFH-DA 1  $\mu$ M con o sin dbAMPc 50  $\mu$ M / IBMX 50  $\mu$ M (dbAMPc), o con o sin H89 1  $\mu$ M (H89). La respiración fue estimulada adicionando la mezcla malato 2 mM / piruvato 5 mM y el producto fluorescente oxidado, DCF, fue detectado cada 1 minuto. Los primeros 10 minutos de fase *lag* fueron excluidos del análisis. El gráfico representa el curso en el tiempo de un experimento típico (izquierda). Las pendientes de las regresiones fueron calculadas para estimar las tasas de producción de ROS. Los resultados son expresados como porcentaje del control (derecha). Los valores representan la media de al menos 3 experimentos  $\pm$  el error estándar. \* $P < 0,05$  vs. C.

### 5.1.8. Discusión

El estrés nutricional regula la supervivencia en todas las células eucariotas, encontrándose muchas de las vías de señalización involucradas conservadas desde levaduras a humanos (215-217). El tejido hepático es bastante más resistente a la falta de nutrientes, en comparación a otros tejidos postmitóticos de mamíferos, tales como el tejido cardíaco y el neuronal. Específicamente, en análisis genómicos, se ha demostrado que el ayuno prolongado en ratones induce transitoriamente algunas vías catabólicas y de defensa a estrés en el hígado, sin activar genes pro-apoptóticos ni afectar la viabilidad celular (218). Estas características convierten a los hepatocitos en un modelo interesante para estudiar la regulación de la supervivencia y la tolerancia a la restricción nutricional.

En distintos tipos celulares, la ausencia de glucosa y de factores de crecimiento lleva a muerte por apoptosis. Las quinasas PI3-K y Akt han sido implicadas en la inducción de dicho proceso (33,163). Varios estudios también involucran a PKA en la regulación de la supervivencia y apoptosis a diferentes niveles, revelando roles de esta quinasa tanto pro- como anti- supervivencia (102,104,219).

En esta etapa del trabajo de tesis, nos propusimos, en una primera instancia, caracterizar la supervivencia durante la falta de glucosa de hepatocitos normales en cultivo. Demostramos que la ausencia de glucosa en cultivo primario de hepatocitos indujo una activación temprana de la vía mitocondrial de apoptosis. En segundo lugar, analizamos el posible rol regulatorio de PKA en ese proceso. Usando dos estrategias farmacológicas diferentes, hallamos que la inhibición de la señalización por PKA previno completamente la activación de apoptosis en ausencia de glucosa, demostrando que PKA participa en dicho proceso de muerte. Además, encontramos que el mecanismo que liga la falta de glucosa al proceso apoptótico involucra el aumento de la producción mitocondrial de ROS, y que este aumento está regulado por PKA.

Nuestros resultados demostraron que la falta de glucosa indujo la translocación de Bax a mitocondria, y que este evento, así como otros eventos de la apoptosis, fueron prevenidos al inhibir la actividad de PKA o la interacción de la misma con sus proteínas de anclaje. Estudios previos en la línea celular derivada de hepatoma, HepG2, han demostrado que la fosforilación de Bax induce un cambio conformacional que facilita la interacción de Bax con la membrana mitocondrial (200). Estudios más recientes

demonstraron que durante la isquemia/reperfusión en cardiomiocitos de rata, PKA fosforila a Bax induciendo su translocación a mitocondria lo cual lleva a un aumento en la producción mitocondrial de ROS y a la activación apoptótica (220). Así, considerando que varios miembros de la familia Bcl-2 son sustratos directos de PKA (100,102,104,211), analizamos si la prevención de la translocación de Bax al inhibir PKA durante la ausencia de glucosa estaba relacionada con su fosforilación por PKA. Nuestros resultados indicaron que la ausencia de glucosa por 6 horas en hepatocitos normales no indujo cambios en los niveles de Bax ni en la fracción de Bax fosforilada por PKA, sugiriendo, de esta manera, que la activación de apoptosis mediada por PKA ocurre antes que la translocación de Bax a mitocondria.

Numerosos trabajos describen el efecto de los niveles altos de glucosa sobre el daño oxidativo y la inducción de muerte celular programada en diversos tipos celulares (221-223). Asimismo, la condición opuesta, es decir la restricción de glucosa, provoca estrés oxidativo y/o apoptosis en distintas células eucariotas, desde levaduras (197,224) a células immortalizadas en cultivo (204,212,213). Esto también ha sido sugerido para células hepáticas transformadas: en condiciones de restricción de glucosa, las células HepG2 sufren un aumento en los niveles de ROS acompañados con una concomitante inducción de la enzima citoprotectiva hemo oxigenasa-1, como una respuesta de supervivencia (214,225). Sin embargo, no habían sido previamente documentados los niveles de especies oxidativas en hepatocitos normales sujetos a restricción de glucosa. Durante el desarrollo de esta tesis, evaluamos la oxidación de DCFH-DA en hepatocitos controles y deprivados de glucosa y encontramos que luego de 2 horas de tratamiento en medio libre de glucosa se indujo un aumento significativo en los niveles de ROS, el cual se mantuvo hasta las 6 horas de cultivo. Además demostramos que la inhibición de PKA fue suficiente para prevenir este aumento de ROS. En el mismo sentido que nuestros resultados, fue demostrado recientemente en células PC12 que la inhibición de PKA tiene un rol protector contra el estrés oxidativo generado por la exposición de estas células a  $H_2O_2$  (226). Por otro lado, observamos que el antioxidante vitamina C previno la inducción ulterior de la caspasa 3, lo que indica que el estrés oxidativo está implicado en la activación de la vía apoptótica. Con respecto a la relación entre el desbalance de ROS y la apoptosis en hepatocitos *in vivo*, la evidencia acumulada en la literatura indica que el estrés oxidativo puede causar o no la activación de apoptosis dependiendo de las

condiciones (227-229). En general, es aun materia de discusión en cualquier sistema celular cómo un desbalance de ROS puede llevar a la activación apoptótica, siendo lo más probable que se deba a su propia interacción, en tiempo y espacio muy precisos, con diversas moléculas pro-apoptóticas que serían así más activas. Un ejemplo de esto es la sensibilización oxidativa del citocromo c observada en neuronas. Se ha demostrado que un aumento en los niveles de ROS que siguen a un insulto apoptótico, como la privación de glucosa, puede llevar a la oxidación y activación del citocromo c y así al desenlace de la apoptosis (230). El metabolismo de glucosa promueve la supervivencia neuronal al mantener elevados los niveles de GSH generados indirectamente como resultado de la vía de las pentosas fosfato, y los altos niveles de GSH contribuyen a mantener reducido e inactivo al citocromo c y, de este modo, a la prevención de apoptosis en estas células (230). Otro posible mecanismo de la activación apoptótica inducida por ROS es vía la proteína supresora de tumor p53. En efecto, en muchas células tumorales el aumento de ROS puede inducir la activación de p53 (35,231-233), que, a través de sus diversos roles a nivel transcripcional y en citoplasma, puede activar proteínas pro-apoptóticas e inducir apoptosis (20,35-37). De esta manera, las diferencias en los destinos celulares parecen depender no solamente de las causas y mecanismos de estrés, sino también de la señalización y compartimentalización específica. En relación con esto se ha demostrado que en condiciones en que se induce autofagia en hepatocitos (restricción completa de nutrientes y factores de crecimiento sumado al tratamiento con glucagon), se produce mitofagia, en ausencia de muerte celular, siendo postulado este mecanismo como una estrategia celular para prevenir la generación de ROS por las mitocondrias dañadas (234,235).

Los complejos respiratorios son importantes fuentes de ROS y la tasa de producción está asociada a la fuerza protón-motriz de la mitocondria, es decir, la diferencia transmembrana en el potencial eléctrico y el pH (45). De hecho, condiciones moderadas de desacoplamiento, que afectan estos gradientes, inhiben la producción de superóxido por la mitocondria (45,235). Nos preguntamos entonces si la falta de glucosa llevaba a un aumento en la generación mitocondrial de ROS. Nuestros resultados demostraron que el desacoplamiento leve de la respiración previno completamente el incremento de ROS. Concomitantemente, la activación de apoptosis inducida por falta de glucosa también fue prevenida en esta condición. Estos resultados

indicaron que el desbalance de ROS que lleva a la activación de apoptosis en ausencia de glucosa tiene un origen respiratorio.

Algunos trabajos demuestran la participación de PKA en vías que regulan tanto la tasa de respiración (105) como la acumulación de ROS (106) en diferentes tipos celulares. Como la matriz mitocondrial contiene adenilato ciclasa (105), PKA y sus proteínas de anclaje (236), CREB (237) y diversos sustratos moleculares, es probable que todos estos componentes constituyan una red que opere localmente en respuesta a diferentes situaciones. Para analizar esta posibilidad de señalización en hepatocitos deprivados de glucosa, en primer lugar confirmamos la expresión de PKA en fracciones mitocondriales de hepatocitos controles y ayunados. Considerando que la activación endógena de PKA requiere un aumento en los niveles de AMPc, analizamos los niveles de AMPc en fracciones mitocondriales de hepatocitos controles y deprivados de glucosa. Nuestros resultados demostraron que la falta de glucosa indujo un marcado aumento en los niveles de AMPc indicando la activación local en esta condición. PKA tiene sustratos en casi todos los complejos respiratorios (109,110,112), y de esta manera puede regular diferencialmente, y aun en direcciones opuestas, la actividad de la cadena de transporte de electrones. Específicamente, las fosforilaciones por PKA de las subunidades I y IV del complejo IV pueden afectar tanto negativamente (106,111) como positivamente (105) la actividad de la citocromo c oxidasa y la producción de ROS. El complejo I también es fosforilado por PKA (112). Además se ha reportado que diversos genes mitocondriales, incluyendo los del complejo III, son inducidos a través de la vía PKA-CREB (237). Al respecto, tanto en cultivos de células de mamíferos como en células de origen humano, se ha demostrado que PKA activa el complejo I y previene la acumulación de ROS inducida por deprivación de suero (238). En el mismo sentido, recientemente se ha reportado en células de ratón transformadas, deficientes en la vía Ras, que la activación de PKA protege a estas células de la apoptosis inducida por la deprivación de glucosa a través la estimulación del complejo I y la disminución de los niveles de ROS (114). Esta activación del complejo I mediada por PKA también fue observada en células de cáncer de mama MDA-MB-231. De hecho, se ha demostrado que la activación de la señalización por PKA puede mejorar los parámetros mitocondriales y llevar a la reversión del efecto Warburg en determinadas líneas celulares (115). Recientemente se ha estudiado en mayor profundidad la regulación del

complejo I por AMPc/PKA. Esta vía regula, además de la actividad de dicho complejo, su biogénesis y ensamblaje. Así el control mediado por PKA de la actividad funcional del complejo I y del nivel de producción de ROS ha alcanzado implicancias en la fisiopatología humana, ya que varias enfermedades humanas tienen relación con la disfunción de este complejo (239). Por otro lado, PKA no solamente puede regular la respiración mitocondrial fosforilando complejos respiratorios, sino que también es capaz de fosforilar el canal aniónico dependiente de voltaje VDAC. La fosforilación de VDAC por PKA es dependiente de tubulina libre (que es un signo de proliferación característico de células tumorales) y lleva al cierre de VDAC suprimiendo la función mitocondrial (240).

Los complejos respiratorios I y III son los principales generadores mitocondriales de anión superóxido (45). Por lo tanto analizamos si PKA mitocondrial podía modular la generación de ROS durante la respiración en células hepáticas. Comparamos la tasa de producción de ROS en mitocondrias de hígado respirando en condiciones inhibitorias y activadoras de PKA. Mientras que la inhibición de PKA indujo una disminución, la activación de PKA llevó a un aumento en la tasa de producción mitocondrial de ROS. De acuerdo a estos hallazgos es probable que el mecanismo por el cual PKA modula la producción mitocondrial de ROS en nuestro sistema, no involucre, o lo haga muy marginalmente, la regulación del complejo I, que es estimulatoria y previene la producción de ROS. En concordancia con nuestros resultados, también se ha observado la asociación entre la activación de PKA y la producción mitocondrial de ROS durante isquemia en miocardiocitos, los cuales presentan niveles elevados de ROS como consecuencia de la activación de PKA. En esta vía de señalización, PKA fosforila las subunidades I, IViI y Vb del complejo respiratorio IV o citocromo c oxidasa y dicho evento lleva a la inhibición de la actividad de este complejo (106).

Resumiendo, de nuestros hallazgos hasta aquí surgen cuatro puntos claves: 1. La falta de glucosa induce una rápida acumulación de especies reactivas del oxígeno, que involucra la actividad de PKA, y provoca la activación de apoptosis en cultivo de hepatocitos. 2. El desbalance temprano de ROS tiene origen mitocondrial. 3. La ausencia de glucosa induce un aumento en la señalización por PKA mitocondrial. 4. PKA induce aumento en la producción mitocondrial de ROS. Estos resultados apoyan la

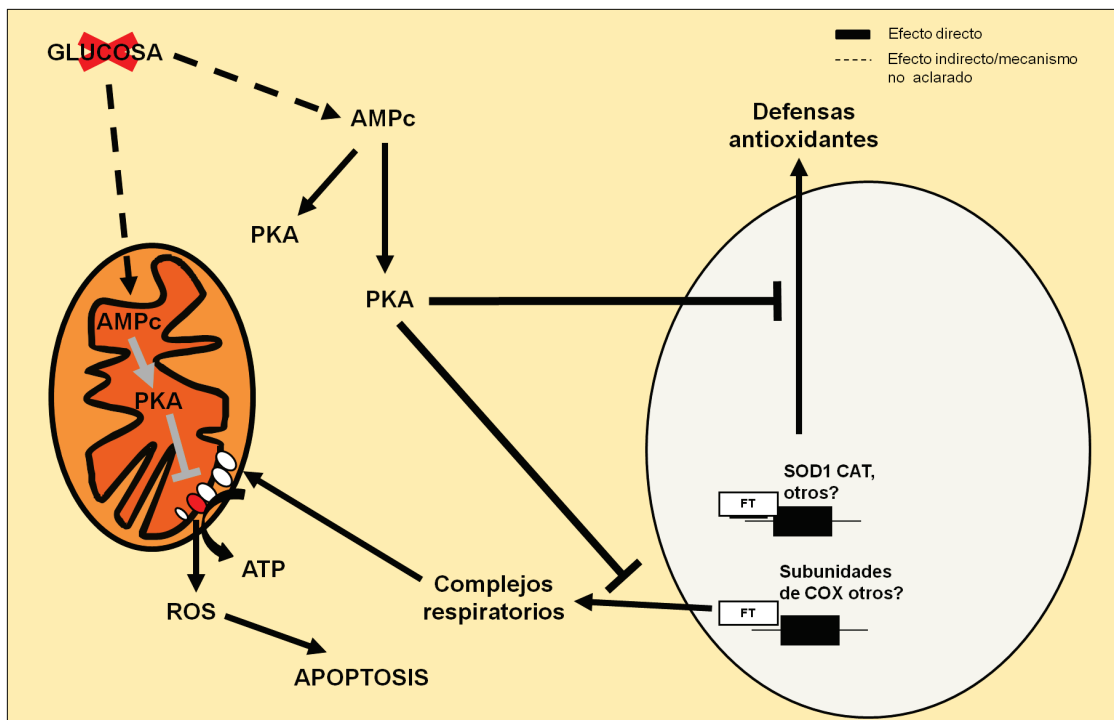
hipótesis que sostiene que, *durante la falta de glucosa, PKA señala el aumento en la producción de ROS a través de la cadena respiratoria. De esta manera, tanto la prevención del estrés oxidativo como de la apoptosis en presencia de inhibidores de PKA, en hepatocitos deprivados de glucosa, se debe a una disminución en la generación mitocondrial de ROS.*

Teniendo en cuenta que los niveles de ROS dependen del balance entre la producción y degradación de estas especies, analizamos si el desbalance de ROS modulado por PKA durante la ausencia de glucosa, estaba también relacionado a cambios en el secuestro de ROS. Con esta finalidad, investigamos la regulación en la expresión de enzimas antioxidantes durante la ausencia de glucosa. Nuestros resultados indicaron que la transcripción de la catalasa y la superóxido dismutasa citosólica es inducida en ausencia de glucosa en hepatocitos. Por otro lado observamos que la inhibición de PKA, además de disminuir la producción de ROS, potenció significativamente la inducción de enzimas antioxidantes después de 6 horas de ausencia de glucosa. Nuestras determinaciones de los niveles de AMPc durante la ausencia de glucosa sugieren que esta condición en hepatocitos lleva a la activación tanto de PKA mitocondrial como de PKA no mitocondrial, lo cual permite explicar los efectos extramitocondriales de la señalización por PKA. De esta manera, el aumento en los niveles de ROS dependiente de PKA parece tener dos componentes: un aumento en su producción respiratoria, y, una atenuación en la expresión de enzimas que secuestran ROS. En concordancia con esto, se ha descrito recientemente que la mitocondria de levadura es sensible a la señalización AMPc/PKA, la cual puede regular la cadena respiratoria durante la limitación de glucosa, promoviendo así la disfunción mitocondrial, producción de ROS y muerte apoptótica (107). Estos hallazgos también indicaron la existencia de dos niveles de regulación vía AMPc/PKA en células de levaduras luego de la restricción de glucosa tanto en la producción como en el secuestro de ROS: disminución en la expresión de subunidades de la citocromo c oxidasa y disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (107).

Los factores de transcripción FoxO en mamíferos son los homólogos funcionales a Msn2/4 de levaduras, los cuales regulan la transcripción de diversas enzimas antioxidantes y son exportados del núcleo en respuesta a la fosforilación por PKA

(118). La regulación por PKA de la transcripción de Sod1 y Cat vía FoxO-3a y/o otros factores de transcripción constituye un mecanismo interesante para estudiar en hepatocitos. En la Figura 5.1.14 se ilustran los mecanismos propuestos que conducirían a la muerte por apoptosis durante la restricción de glucosa en hepatocitos primarios en cultivo.

En suma, demostramos que la ausencia de glucosa genera estrés oxidativo e induce apoptosis en hepatocitos normales y comenzamos a elucidar los mecanismos involucrados. La señalización por PKA en el interior de la mitocondria, la cual ha sido previamente postulada como una reguladora de la tasa de respiración, emerge como un punto sensible para controlar negativamente la supervivencia celular. Estos resultados son compatibles con un modelo en el cual la restricción de glucosa en hepatocitos lleva a fluctuaciones en los niveles de AMPc en la mitocondria que permite reajustes en la respiración a través de la señalización mediada por PKA. Esta señalización favorece la generación de ROS, y, eventualmente, induce muerte celular programada. De esta manera, parece operar un eje mitocondrial mediado por AMPc/PKA que lleva al suicidio celular en respuesta a estrés nutricional, y que se encontraría conservado desde eucariotas inferiores a células de mamíferos. Por otra parte, la modulación de la actividad de PKA mitocondrial es revelada como una estrategia putativa para evadir el estrés oxidativo y la apoptosis.



**Figura 5.1.14. Señalización mediada por PKA en la inducción de apoptosis inducida por restricción de glucosa en hepatocitos.** La ausencia de glucosa induce activación de PKA mitocondrial y citosólica a través del aumento en los niveles de AMPc en ambos compartimentos. PKA en mitocondria contribuye a la producción de ROS regulando la actividad de la cadena respiratoria. PKA citosólica, a través de la regulación de algún factor de transcripción desconocido (FT), previene la transcripción de los genes de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y Superóxido Dismutasa 1 (SOD1). Se puede considerar también que, como indica la literatura, que PKA puede mediar la represión de genes que codifican proteínas de los complejos respiratorios. Estos eventos resultan en el aumento en los niveles de ROS y en la consiguiente activación apoptótica.

## Capítulo 2:

### Estudios en células de hepatocarcinoma humano

---

## **Capítulo 2. Regulación de la supervivencia en células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A ante restricción de glucosa**

### **5.2.1. Estudios de viabilidad celular y proliferación durante la falta de glucosa**

Las células HepG2/C3A, como todas las células tumorales, realizan glucólisis anaeróbica a alta tasa (89,160), a diferencia de los hepatocitos normales en donde la producción de energía es predominantemente a través de la fosforilación oxidativa (185). Esta elevada tasa de glucólisis aeróbica, conocida como efecto Warburg (89,159), les confiere a las células tumorales la capacidad de producir una gran cantidad de intermediarios biosintéticos para satisfacer su alta tasa de división celular, y les otorga ventajas adaptativas para sobrevivir en microambientes hipóxicos característicos de las masas tumorales (159,162-164).

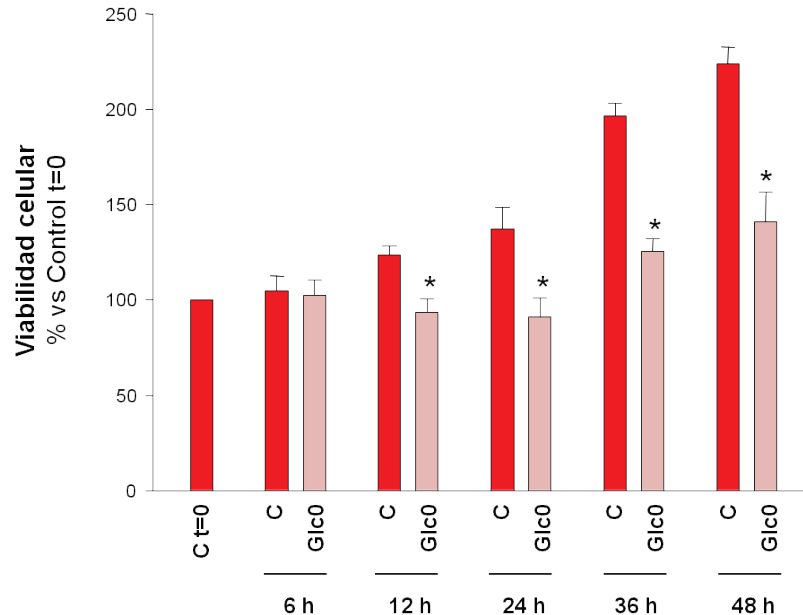
Debido a esta alta dependencia de la vía glucolítica, es de esperar que las células tumorales HepG2/C3A sean muy sensibles a la falta de glucosa. En la literatura existen reportes que demuestran la sensibilidad de las células HepG2 a la falta de glucosa. Estos estudios describen que las células HepG2 cultivadas en ausencia de glucosa sufren necrosis (241) ó apoptosis (214,225,242) luego de 48 horas, no siendo totalmente claros su desarrollo en el tiempo y su regulación.

Sin embargo, en experimentos previos de nuestro grupo, realizados en células HepG2 (no mostrados), comprobamos que la ausencia de glucosa durante 6 horas no inducía muerte celular, siendo este tiempo suficiente para provocar muerte por apoptosis en hepatocitos primarios. Por consiguiente, analizamos los posibles cambios en la viabilidad celular durante la restricción de glucosa a tiempos de cultivo más prolongados.

En primer lugar analizamos la viabilidad celular realizando el ensayo de MTT. Debemos tener en cuenta que al realizar un estudio en el tiempo de células proliferantes como las HepG2, el número de células viables aumenta, siendo la resultante de la proliferación y la muerte celular. En consecuencia, hablaremos de viabilidad al interpretar los valores de MTT teniendo en cuenta que involucra a ambas variables: proliferación y muerte celular.

El ensayo demostró que las células incubadas en presencia de glucosa aumentan su número en forma progresiva y a las 36 horas prácticamente duplican la cantidad original (C:  $196,7 \pm 6,5$  %). Por su parte, la restricción de glucosa provoca una

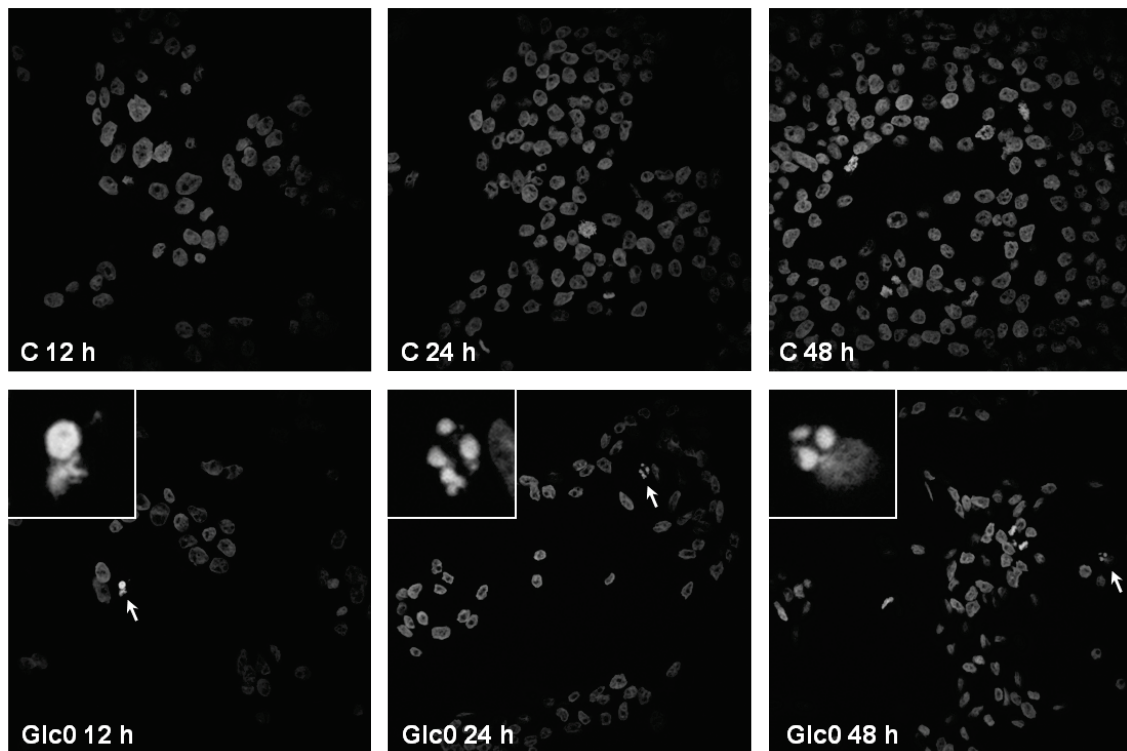
disminución significativa en el número de células viables, en comparación con las células control al mismo tiempo, a partir de las 12 horas de tratamiento (Figura 5.2.1).



**Figura 5.2.1. Viabilidad de células HepG2 durante la ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron cultivadas en microplacas e incubadas durante 6, 12, 24, 36 y 48 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM y posteriormente se realizó el ensayo de MTT, cuantificando la absorbancia a 550 nm del metabolito producido por las células viables. Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células control a t=0. \* $P < 0,05$  vs C a su mismo tiempo de tratamiento.

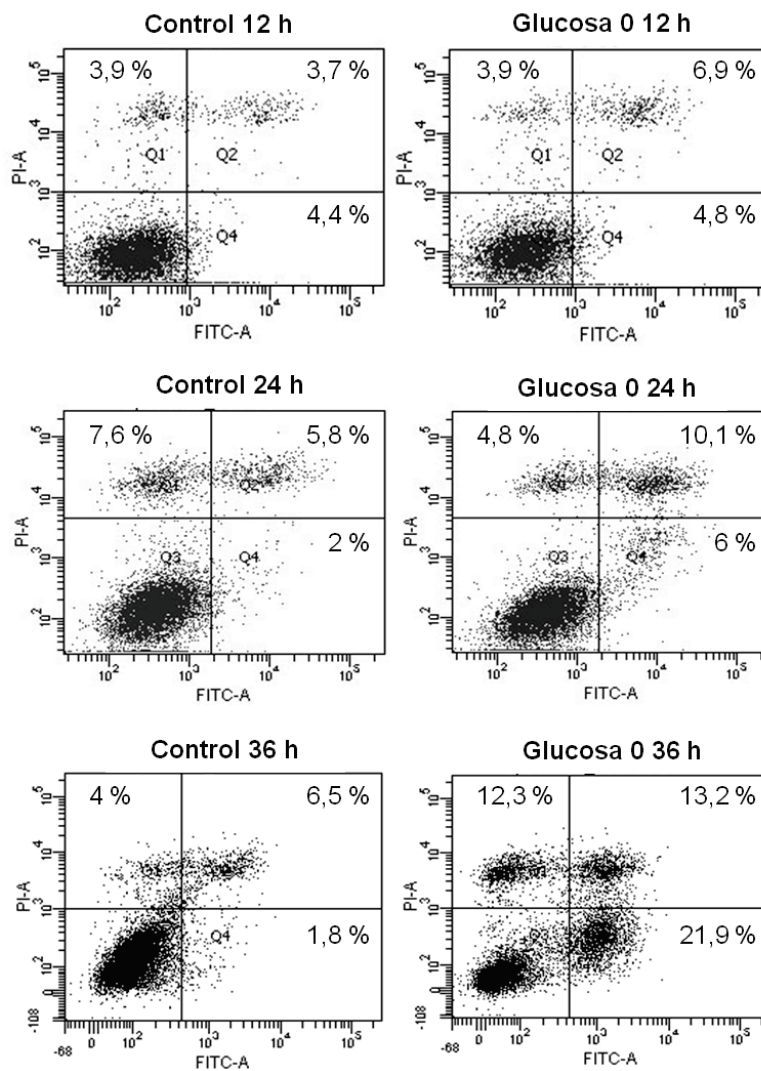
Esta disminución en la viabilidad durante la incubación en medio libre de glucosa puede deberse a procesos de muerte celular o a que las células proliferen más lentamente.

En paralelo con estos estudios, realizamos tinción nuclear con DAPI de las células incubadas 12, 24 y 48 horas con y sin glucosa y las analizamos por microscopía de fluorescencia confocal. Observamos que las células controles aumentaron en cantidad al prolongar el tiempo de cultivo, mientras que en condiciones de privación de glucosa ese aumento progresivo del número de células fue considerablemente menor. Por otra parte, en las células incubadas en medio libre de glucosa se detectaron morfologías nucleares asociables a fenotipos apoptóticos, como núcleos condensados o fragmentados (Figura 5.2.2).



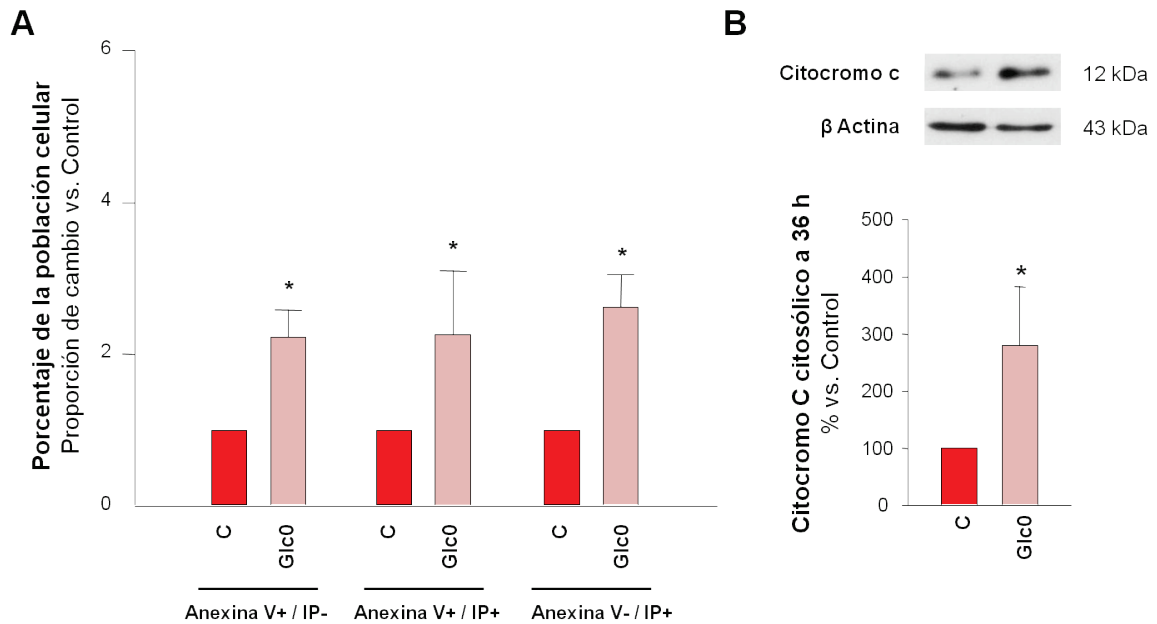
**Figura 5.2.2. Supervivencia de células HepG2 incubadas en ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 12, 24 y 48 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM. Las células fueron lavadas, fijadas con PFA 4 %, teñidas con DAPI y analizadas por microscopía de fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas de un experimento típico entre varios similares.

Posteriormente analizamos la inducción de muerte celular a lo largo del tiempo mediante la tinción con Anexina/IP. Nuestros resultados demostraron que la muerte por apoptosis se hace evidente en esta línea celular a partir de las 12 horas de restricción de glucosa, incrementándose en forma significativa al prolongar el tiempo de tratamiento (Figura 5.2.3). También analizamos la liberación de citocromo c a citosol, como estimador de la activación de la vía apoptótica.



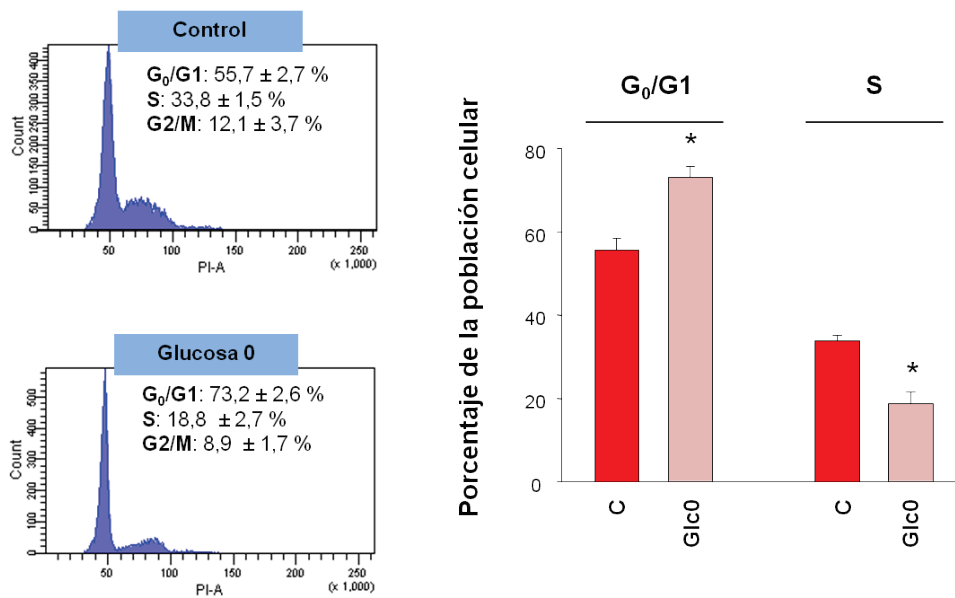
**Figura 5.2.3. Inducción de apoptosis en células HepG2 durante la ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 12, 24 y 36 horas en presencia (Control) y ausencia (Glucosa 0) de glucosa 25 mM. Las células fueron teñidas con Anexina V-FITC (Anexina) y con Ioduro de Propidio (IP) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas (Anexina+) y células muertas (IP+) mediante análisis de citometría de flujo. La figura muestra datos crudos de detección de fluorescencia verde (Anexina) y roja (IP) de experimentos típicos en células Control y Glucosa 0 a los distintos tiempos de estudio. Los cuadrantes representan: porcentajes de células que sufren apoptosis temprana (Anexina+/IP-), cuadrante inferior derecho; de células apoptóticas muertas o apoptóticas tardías (Anexina+/IP+), cuadrante superior derecho; y de células no apoptóticas muertas o necróticas (Anexina-/IP+), cuadrante superior izquierdo.

A las 36 horas de tratamiento, además de la inducción de muerte por apoptosis determinada por la tinción positiva con Anexina (Anexina+/IP- y Anexina+/IP+) y por el aumento en los niveles proteicos de citocromo c en citosol, la falta de glucosa provoca muerte por necrosis primaria (Anexina-/IP+) (Figura 5.2.4).



**Figura 5.2.4. Inducción de muerte celular a las 36 horas de ausencia de glucosa en HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM. **(A)** Las células fueron teñidas con Anexina V-FITC (Anexina) y con Ioduro de Propidio (IP) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas y células muertas mediante análisis de citometría de flujo. Los gráficos de barra representan el aumento respecto a los controles en los porcentajes de células que sufren apoptosis temprana (Anexina+/IP-), de células apoptóticas muertas (Anexina+/IP+) y de células no apoptóticas muertas (Anexina-/IP+). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos. **(B)** Se obtuvieron fracciones citosólicas y se analizaron los niveles de la proteína Citocromo c por *western blot*. La proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

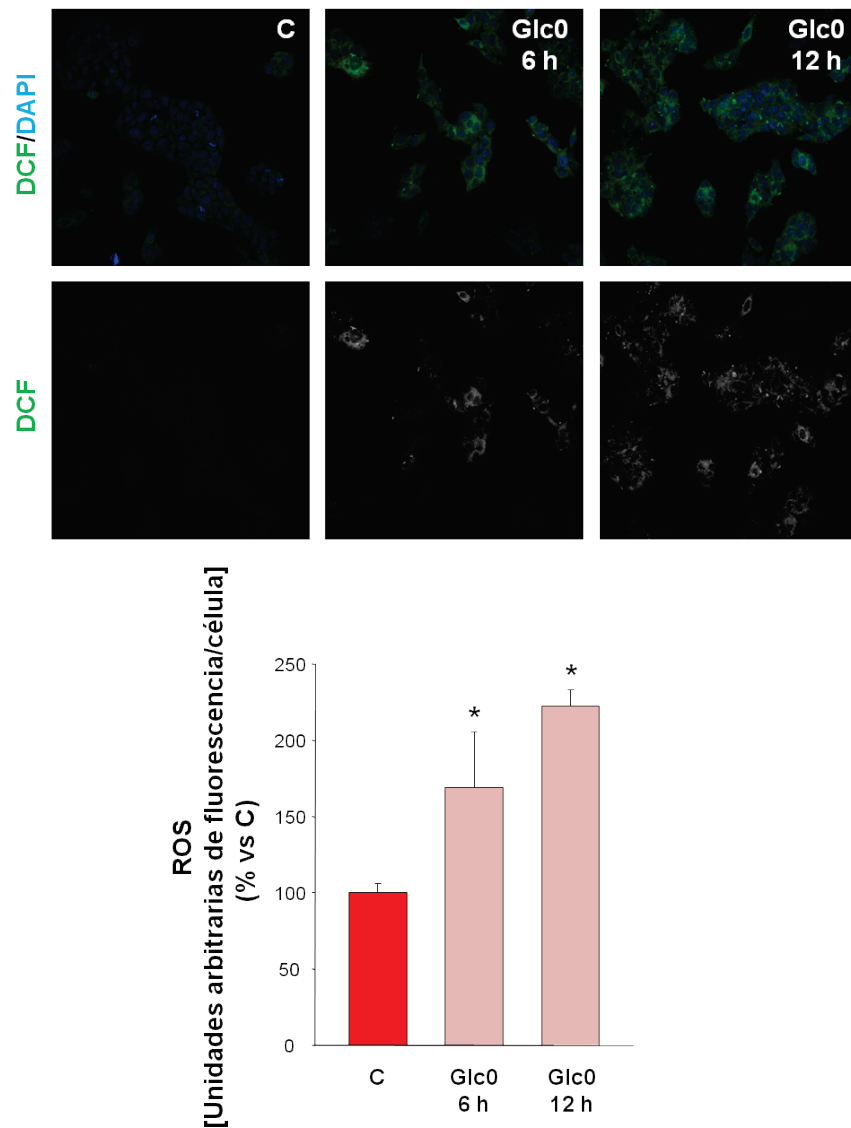
En segundo lugar analizamos la distribución de las células HepG2 en el ciclo celular luego de 36 horas de tratamiento en medio libre de glucosa, determinando el contenido de ADN por citometría de flujo. Las células incubadas en ausencia de glucosa presentaron un aumento significativo de eventos en la fase  $G_0/G_1$  acompañado de una correspondiente disminución de eventos en fase S, mientras que no se observaron cambios en la fase  $G_2/M$  (Figura 5.2.5)



**Figura 5.2.5. Efecto de la restricción de glucosa sobre la distribución de las células HepG2 en el ciclo celular.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM. Las células se fijaron con etanol 70 % en frío, se lavaron con PBS, se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) y se sometieron a análisis por citometría de flujo. *Izquierda*, se muestran las distribuciones obtenidas de un experimento típico. Los resultados se analizaron con los programas WinMDi y Cylchred para obtener los respectivos porcentajes. *Derecha*, se muestran los resultados como gráficos de barras, las cuales representan la media del porcentaje de la población celular en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y S ± el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Estos resultados nos permitieron concluir que, en células HepG2, la falta de glucosa induce disminución en la viabilidad celular a partir de las 12 horas de tratamiento, y que dicha disminución en el número de células viables se debe al arresto de la división celular, acompañado de la inducción de muerte apoptótica y necrótica.

En la literatura está descrito que la falta de glucosa induce aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en diferentes líneas celulares. Esto también fue demostrado en células de hepatocarcinoma HepG2, en donde se verificó que la falta de glucosa induce un aumento en los niveles de ROS (214). Con el objeto de corroborar este proceso en nuestro modelo, incubamos las células durante 6 y 12 horas en presencia y ausencia de glucosa, hipotetizando que este evento debería ser previo a la activación apoptótica. La formación de ROS se cuantificó en forma directa a través de microscopía de fluorescencia confocal utilizando el fluoróforo DCFH-DA. Observamos que, en forma similar a lo demostrado en hepatocitos durante la primera etapa de la tesis, la privación de glucosa indujo tempranamente un desbalance en las especies reactivas del oxígeno, evidente desde las 6 horas de tratamiento (Figura 5.2.6).



**Figura 5.2.6. Inducción de estrés oxidativo en células HepG2 incubadas en ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 6 y 12 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM. Las células fueron cargadas con DCFH-DA (5  $\mu$ M) durante 30 minutos, y posteriormente fueron lavadas, fijadas con PFA 4 %, y teñidas con DAPI. Se obtuvieron imágenes por microscopía de fluorescencia y las mismas fueron analizadas con el programa *Image J*, con el cual se cuantificó la densidad de fluorescencia verde intracelular (correspondiente al producto oxidado fluorescente, DCF). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs C en el mismo tiempo.

El desarrollo de este estrés oxidativo podría ser un factor desencadenante de la apoptosis observada en ausencia de glucosa, de la misma forma en que se produce en hepatocitos de rata. Sin embargo, en este modelo de células tumorales, el escenario es más complejo por los efectos que provoca la falta de glucosa sobre el ciclo celular.

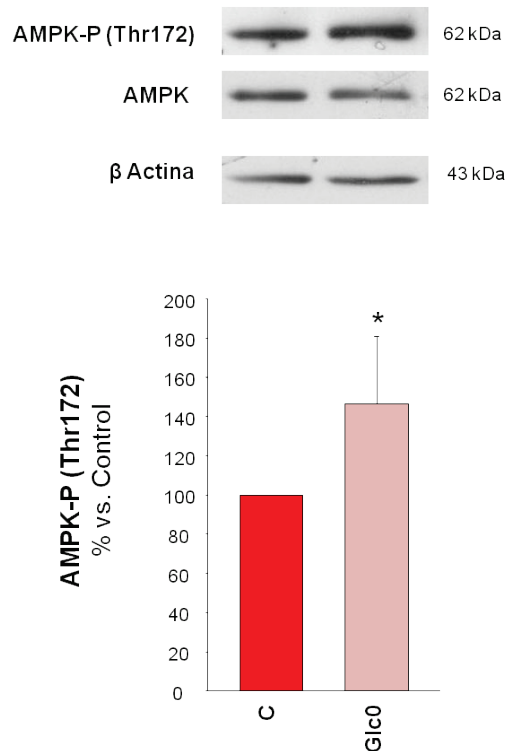
### 5.2.2. Participación de las quinasas AMPK y PKA en la regulación de la supervivencia en células HepG2

La restricción de glucosa desata vías regulatorias de la supervivencia celular, constituyéndose una compleja red de regulación de la viabilidad en respuesta a la disponibilidad energética de la célula (87). Entre las proteínas quinasas involucradas en estas vías, la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) intervienen en la regulación de la supervivencia celular y la apoptosis en respuesta a distintas señales metabólicas y de crecimiento. Dependiendo de la situación y del tipo celular, ambas proteínas pueden tener roles duales.

La quinasa AMPK es clave en la adaptación celular al estrés energético, y la misma puede tener roles opuestos en la proliferación y la muerte celular: en algunos contextos promueve apoptosis y/o arresto de la proliferación, y en otros favorece la supervivencia. Se reportó que AMPK se activa en células HepG2 ante restricción de glucosa (243,244), pero no se conoce la contribución de esta activación en la regulación de la supervivencia. Por otro lado, PKA puede regular metabolismo y ciclo celular (245) y muchas de estas vías metabólicas también son reguladas por el sistema de señalización de AMPK. Sin embargo, no se ha estudiado la regulación por PKA de la supervivencia en células tumorales durante la falta de glucosa.

En primer lugar, evaluamos los niveles de activación de ambas quinasas durante la restricción de glucosa.

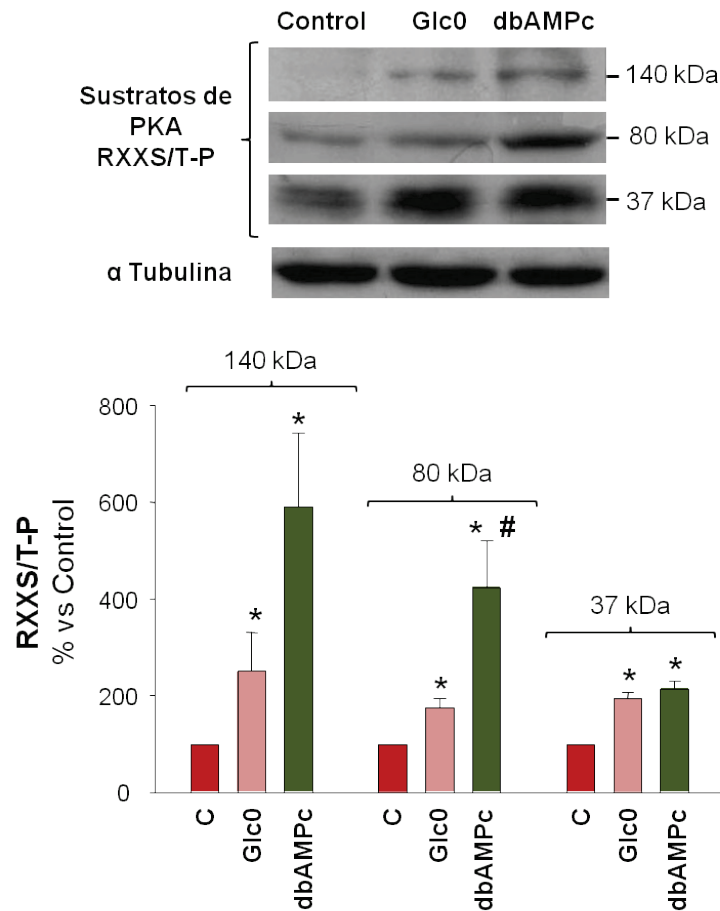
Analizamos la activación de AMPK cuantificando los niveles de AMPK fosforilada en la Thr172. En concordancia con lo descrito en la literatura, observamos que AMPK se encuentra más activa durante la ausencia de glucosa (Figura 5.2.7).



**Figura 5.2.7. Activación de AMPK durante la restricción de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM. Se obtuvieron lisados celulares y se analizaron los niveles de AMPK fosforilada en Thr172 y AMPK total por *western blot*. La proteína β Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media ± el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Posteriormente evaluamos la activación de PKA durante la restricción de glucosa. Evaluamos la activación de PKA luego de 24 horas de tratamiento, a través de la utilización del anticuerpo que reconoce las formas fosforiladas de serinas y treoninas que son sustratos de PKA (RXXS/T(P)). Para obtener un control positivo de la activación de PKA, tratamos a las células con el activador de PKA dbAMPC.

Observamos que tanto la ausencia de glucosa como el tratamiento con dbAMPC indujeron aumentos significativos en las fosforilaciones de proteínas de pesos moleculares aproximados a 140, 80 y 37 kDa (Figura 5.2.8). Al igual que lo observado en hepatocitos, estos resultados nos indicaron que PKA se encuentra más activa en condiciones de restricción de glucosa.



**Figura 5.2.8. Activación de PKA durante la ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 24 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM y en presencia de glucosa 25 mM con dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc). Se obtuvieron lisados celulares y se cuantificaron mediante *western blot* los residuos fosforilados por PKA (RXXS/T-P). La proteína  $\alpha$  Tubulina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Seguidamente, con el objeto de monitorear los cambios en el número de células viables debidos a la falta de glucosa, y a la presencia de activadores e inhibidores de las vías de señalización de PKA y AMPK, realizamos ensayos de MTT a lo largo del tiempo.

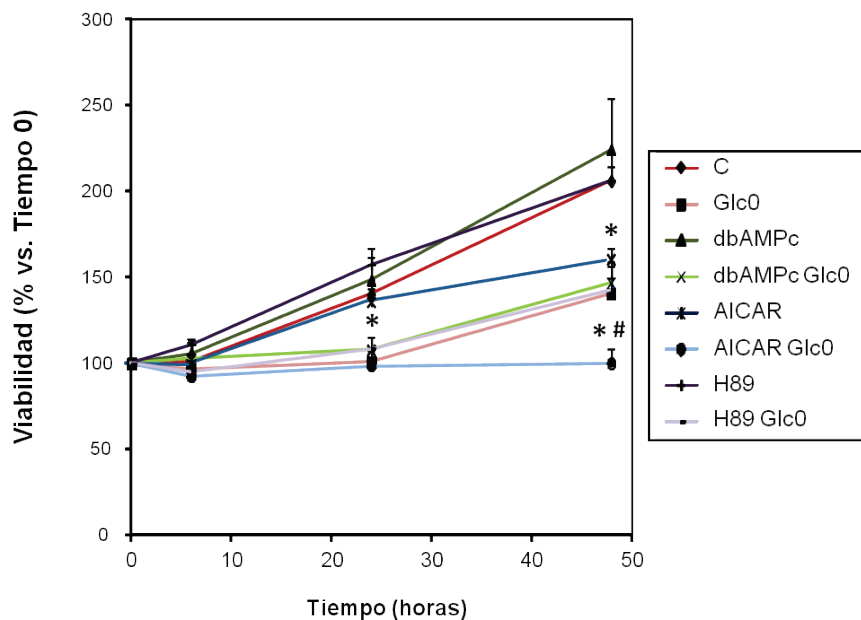
Para estos ensayos las células HepG2 fueron cultivadas en distintas condiciones:

- DMEM con glucosa 25 mM
- DMEM sin glucosa
- DMEM con glucosa 25 mM + dbAMPc 100  $\mu$ M
- DMEM sin glucosa + dbAMPc 100  $\mu$ M
- DMEM con glucosa 25 mM + AICAR 1 mM

- DMEM sin glucosa + AICAR 1 mM
- DMEM con glucosa 25 mM + H89 1  $\mu$ M
- DMEM sin glucosa + H89 1  $\mu$ M

El compuesto AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranósido), al entrar a la célula es convertido a su forma trifosforilada ZMP, por una adenosina quinasa, y actúa como un análogo de AMP activando a AMPK y a su quinasa activadora LKB1 sin afectar la relación ATP:AMP en el interior de la célula.

Se realizó un estudio en el tiempo de la viabilidad de las células expuestas a los distintos tratamientos, determinando la proporción de células viables a las 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas.



**Figura 5.2.9. Supervivencia de células HepG2.** Las células HepG2 fueron cultivadas en microplacas e incubadas durante 0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc), con o sin H89 1  $\mu$ M (H89) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Luego de estos periodos se realizó el ensayo de MTT, cuantificando la absorbancia a 550 nm del metabolito producido por las células viables. Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células a t=0. \* $P < 0,05$  vs C. # $P < 0,05$  vs Glc0.

Del análisis de las curvas de viabilidad (Figura 5.2.9) podemos observar que las células controles se duplican en aproximadamente 36 horas (C:  $194,0 \pm 5,3$  %), mientras que en el caso de las células deprivadas de glucosa, como demostramos anteriormente, observamos una considerable disminución en la viabilidad con respecto al control, haciéndose dicha disminución significativa a partir de las 12 horas de tratamiento y no modificándose con la activación/inhibición de las quinasa estudiadas (Glc0:  $104,5 \pm$

5,8 %\*, dbAMPc Glc0:  $98,0 \pm 8,1$  %\*, H89 Glc0:  $114,2 \pm 2,5$  %\*, AICAR Glc0:  $102,8 \pm 6,4$  %\* vs. C:  $136,0 \pm 5,0$  %). Las células incubadas con el activador de PKA, dbAMPc, o con el inhibidor de PKA, H89, en presencia o ausencia de glucosa, presentaron un patrón de viabilidad similar a las células controles y al de las células deprivadas de glucosa, respectivamente, indicando que la activación o inhibición de PKA no tuvo ningún efecto sobre el número total de células HepG2 viables durante los tratamientos. Por otro lado, el tratamiento con AICAR indujo una disminución significativa de la viabilidad a partir de las 36 horas de tratamiento (AICAR:  $167,9 \pm 8,0$  %\* vs. C:  $194,0 \pm 5,3$  %). A su vez, el tratamiento con AICAR potenció significativamente la disminución de la viabilidad durante la ausencia de glucosa a partir de las 36 horas (AICAR Glc0:  $109,7 \pm 9,2$  %\* vs. Glc0:  $137,2 \pm 7,2$  %), indicando que los efectos de la falta de glucosa y activación de AMPK sobre la viabilidad celular fueron aditivos.

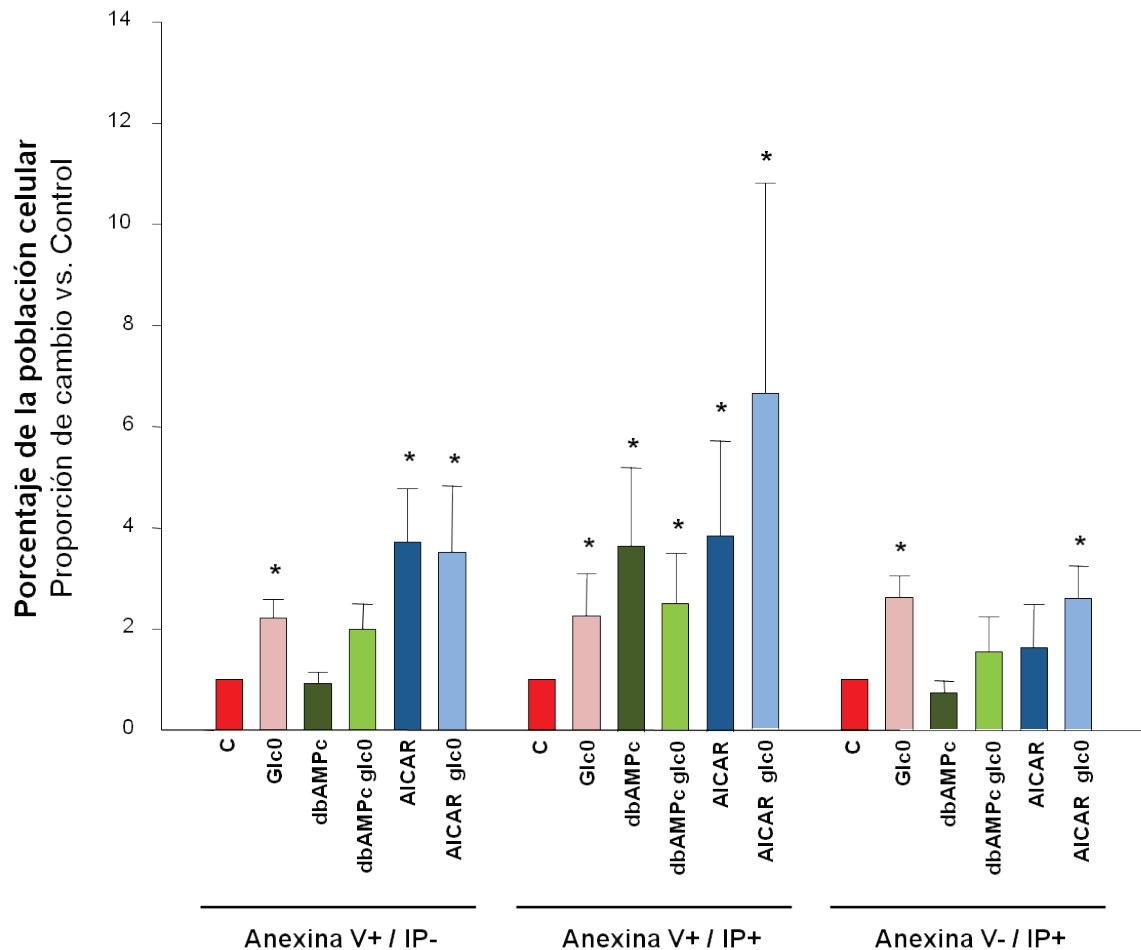
Por lo tanto, podemos concluir que la activación de AMPK en células HepG2, induce una disminución de la viabilidad celular, es decir aumento de la muerte y/o disminución de la proliferación. Por otro lado, la activación ó inhibición de PKA no tiene efectos sobre la viabilidad global, es decir la resultante entre proliferación y muerte no se encuentra modificada. Y por último, concluimos que el efecto combinado de la falta de glucosa y la activación de AMPK sobre la viabilidad celular es significativamente mayor que los efectos de cada tratamiento por separado, permaneciendo en este grupo el número total de células viables prácticamente invariable a lo largo de todo el período de estudio.

#### **5.2.2.1. Determinación de apoptosis y necrosis en células HepG2 ayunadas y no ayunadas ante activación de AMPK ó PKA**

En células HepG2, se ha demostrado que la activación de AMPK lleva a un arresto de la proliferación sin detectarse muerte celular (133). Por otro lado, no se encuentra esclarecido el rol de PKA en la regulación de la supervivencia en estas células.

En primer lugar, analizamos si los cambios en la viabilidad entre los distintos tratamientos, se relacionaban con aumentos en la muerte celular. Para ello incubamos a las células con los distintos tratamientos durante 36 horas y realizamos estudios citométricos para distinguir las poblaciones de células muertas por apoptosis ó necrosis.

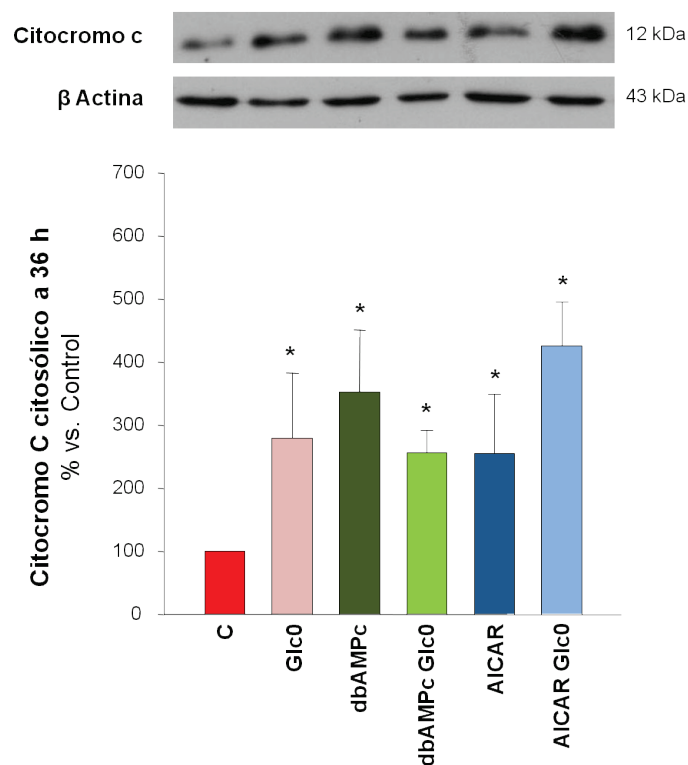
Elegimos 36 horas debido a que a este tiempo tanto el tratamiento con AICAR como la ausencia de glucosa afectaron la viabilidad.



**Figura 5.2.10. Inducción de apoptosis en HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Las células fueron teñidas con Anexina V-FITC (Anexina) y con Ioduro de Propidio (IP) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas (Anexina+) y células muertas (IP+) mediante análisis de citometría de flujo. Los gráficos de barra representan el aumento respecto a los controles en los porcentajes de células que sufren apoptosis (Anexina+/IP-), de células apoptóticas muertas (Anexina+/IP+) y de células no apoptóticas muertas (Anexina-/IP+). Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs C.

Los resultados de estos experimentos (Figura 5.2.10) mostraron que tanto la activación de AMPK con AICAR, como de PKA con dbAMPc provocaron muerte por apoptosis en ausencia de necrosis primaria. La inducción de apoptosis en presencia de dbAMPc no se reflejó en un cambio en viabilidad total (Figura 5.2.9), lo cual puede deberse a la baja sensibilidad del ensayo de MTT.

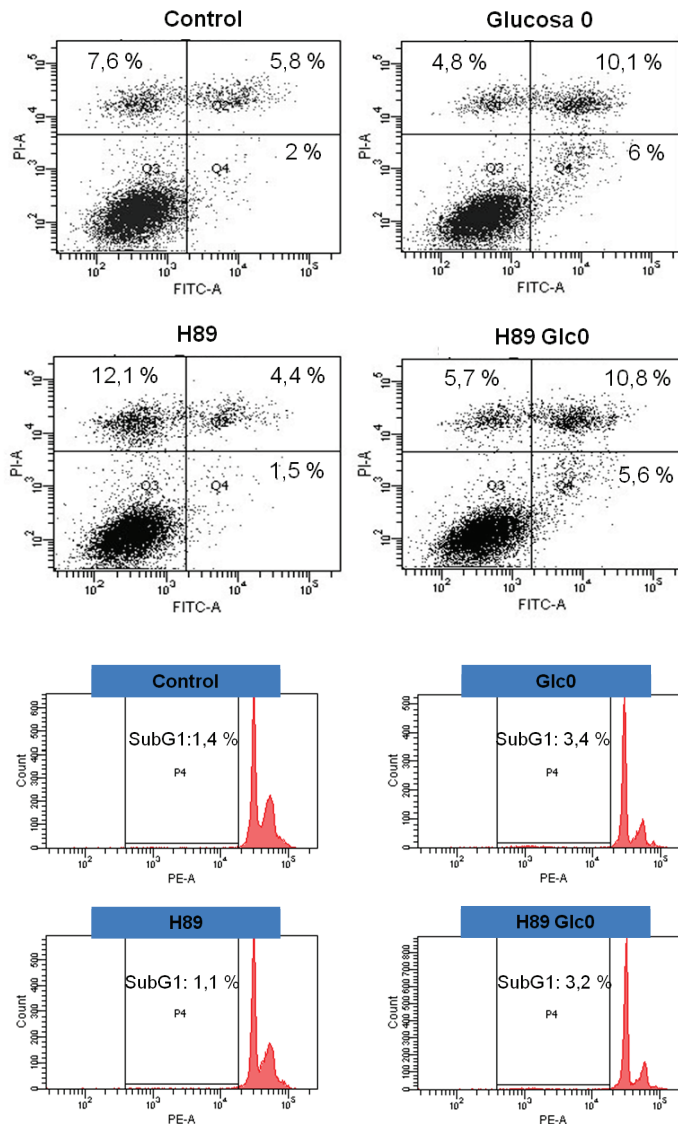
Complementamos este estudio con la cuantificación de los niveles proteicos de citocromo c en citosol como marcador de apoptosis (Figura 5.2.11). En concordancia con lo observado en los estudios de citometría, tanto la ausencia de glucosa como la presencia de ambos activadores indujeron un aumento significativo de la cantidad de citocromo c en citosol.



**Figura 5.2.11. Inducción de apoptosis mitocondrial en células HepG2.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Se obtuvieron fracciones citosólicas y se analizaron los niveles de la proteína Citocromo c por *western blot*. La proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Tanto la falta de glucosa como la activación de AMPK con AICAR indujeron activación de apoptosis. A pesar de que se observó una tendencia de aumento de la apoptosis en el grupo con el tratamiento combinado (grupo experimental AICAR Glc0) respecto a cada tratamiento por separado, no se verificó un efecto aditivo estadísticamente significativo.

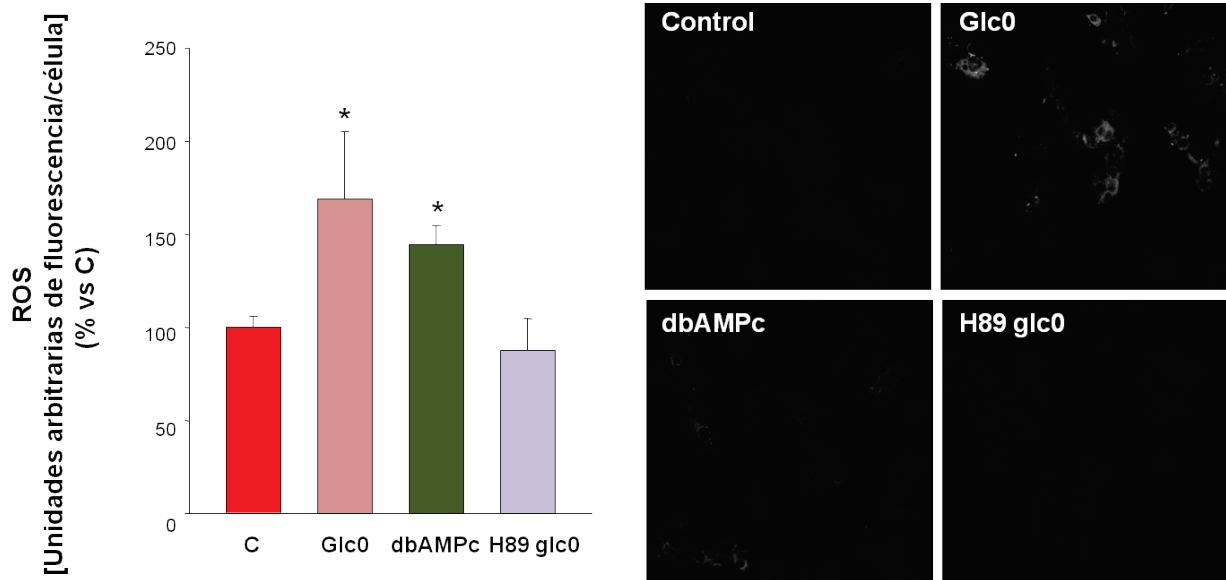
Por otro lado, analizamos el efecto de la inhibición de PKA sobre la muerte celular en presencia o ausencia de glucosa. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de PKA con H89 no indujo muerte por apoptosis, ni tampoco previno la activación de la misma durante la ausencia de glucosa (Figura 5.2.12).



**Figura 5.2.12. Inducción de apoptosis en células HepG2 durante la ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas en presencia (Control) y ausencia (Glucosa 0) de glucosa 25 mM, con o sin H89 1  $\mu$ M (H89). (Arriba) Las células fueron teñidas con Anexina V-FITC (Anexina) y con Ioduro de Propidio (IP) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas (Anexina+) y células muertas (IP+) mediante análisis de citometría de flujo. La figura muestra los datos crudos de detección de fluorescencia verde (Anexina) y roja (IP) de experimentos típicos en células Control y Glucosa 0 a los distintos tiempos de estudio. Los cuadrantes representan: porcentajes de células que sufren apoptosis temprana (Anexina+/IP-), cuadrante inferior derecho; de células apoptóticas muertas o apoptóticas tardías (Anexina+/IP+), cuadrante superior derecho; y de células no apoptóticas muertas o necróticas (Anexina-/IP+), cuadrante superior izquierdo. (Abajo) las células se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) y se sometieron a análisis por citometría de flujo para determinar la población de células en subG1. Se muestran las distribuciones obtenidas de un experimento típico.

En la primera etapa de la tesis demostramos que la inducción de apoptosis en ausencia de glucosa en hepatocitos es mediada por la activación de PKA, la cual contribuye a la producción mitocondrial de ROS, siendo este evento el desencadenante de dicha apoptosis. En esta etapa, analizamos si PKA contribuía a la producción de ROS en células HepG2. En concordancia con los estudios en hepatocitos, la activación

de PKA con dbAMPc en células HepG2 indujo un aumento significativo en los niveles de ROS, y la inhibición de esta quinasa con H89 previno el aumento en dichas especies inducido por la ausencia de glucosa (Figura 5.2.13). Esto nos permitió inferir, que al igual que como ocurre en hepatocitos primarios, PKA contribuye a la producción de ROS durante la ausencia de glucosa. Sin embargo, esta prevención en el aumento de los niveles de ROS con H89 no fue suficiente para prevenir la apoptosis inducida por la restricción de glucosa. Esto indica que PKA no es la única quinasa que determina el destino celular durante la restricción de glucosa en estas células, sino que es parte de otros eventos que conforman un escenario más complejo que en las células no proliferantes.



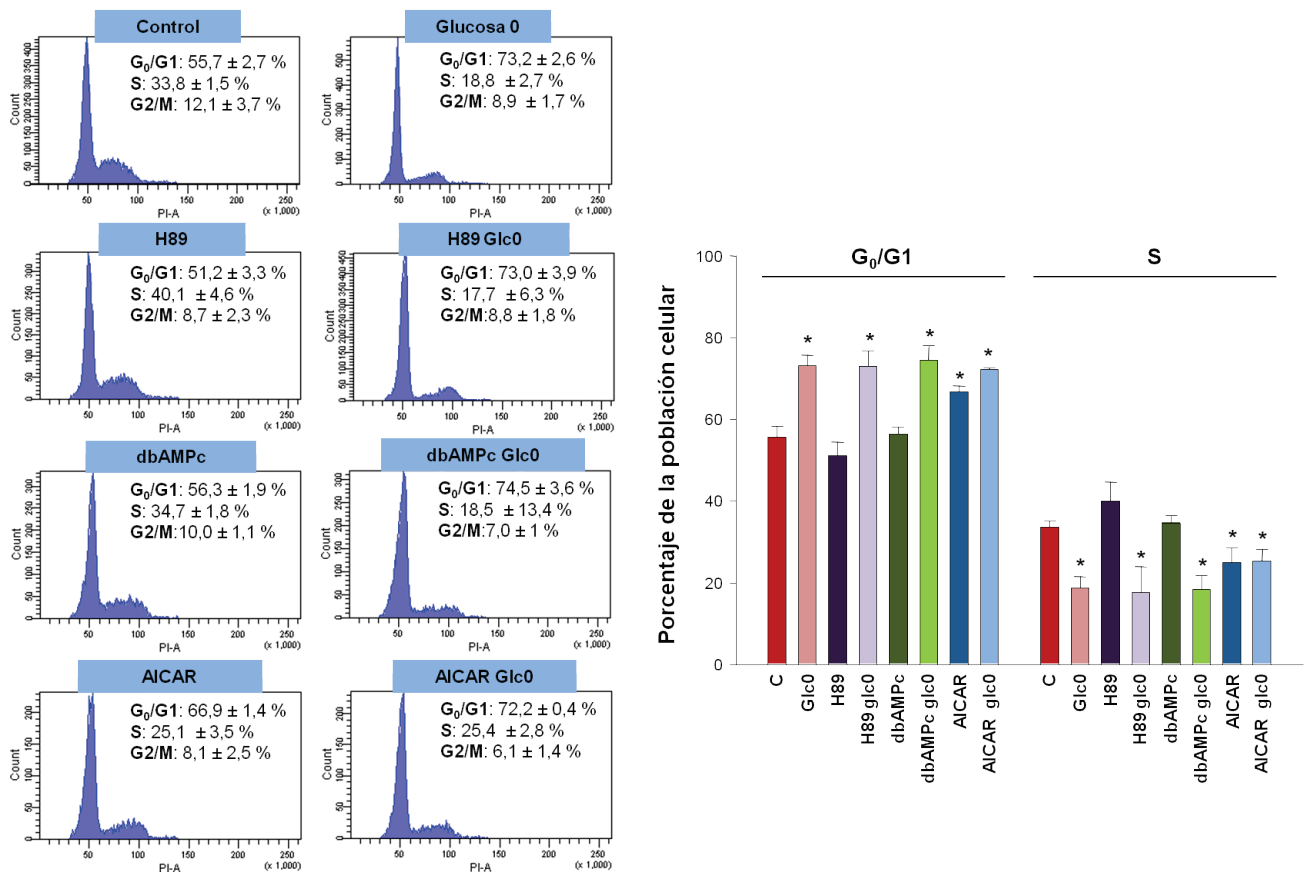
**Figura 5.2.13. Inducción de estrés oxidativo en células HepG2 incubadas en ausencia de glucosa.** Las células HepG2 fueron incubadas 6 horas en presencia (C) y ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin H89 1  $\mu$ M. Las células fueron cargadas con DCFH-DA (5  $\mu$ M) durante 30 minutos, y posteriormente fueron lavadas, fijadas con PFA 4 %, y teñidas con DAPI. Se obtuvieron imágenes por microscopía de fluorescencia y las mismas fueron analizadas con el programa *Image J*, con el cual se cuantificó la densidad de fluorescencia verde intracelular (correspondiente al producto oxidado fluorescente, DCF). Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs C.

#### 5.2.2.2. Efecto de la activación de AMPK y PKA sobre la progresión del ciclo celular en células HepG2 privadas de glucosa

La restricción de glucosa conduce a la activación de AMPK (243,244), hecho que corroboramos en nuestro modelo (ver arriba). Dado que la activación de AMPK puede inducir arresto de la proliferación (132-134), evaluamos el estado del ciclo

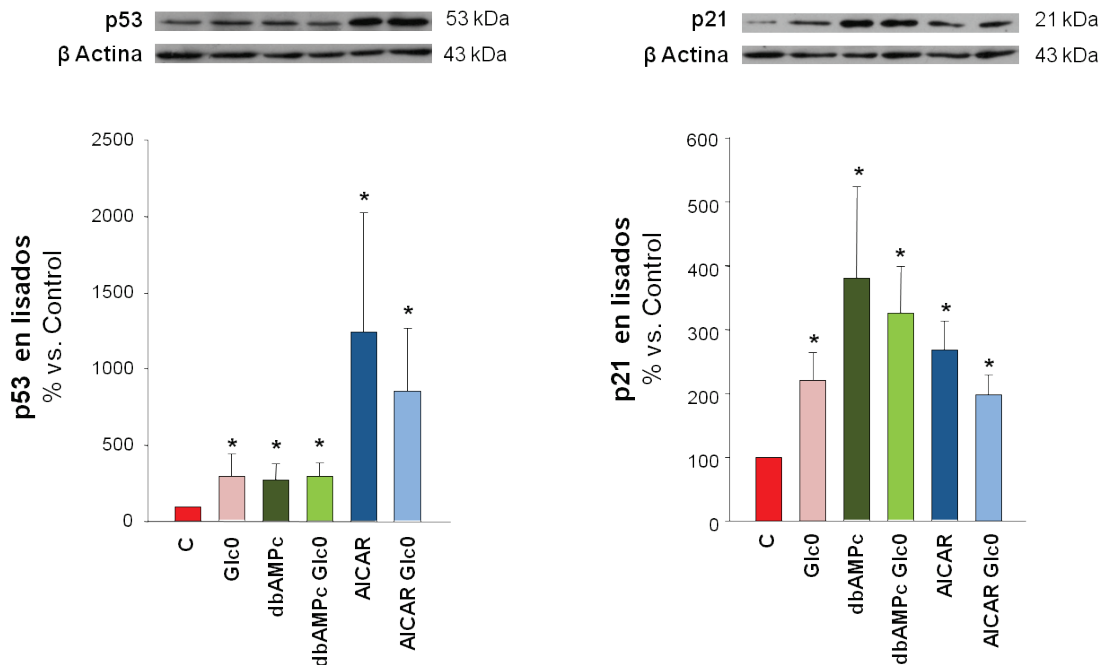
celular en las células HepG2 en los distintos grupos experimentales. Para ello analizamos la distribución de las células en el ciclo celular luego de 36 horas de los respectivos tratamientos.

Observamos que, al igual que la restricción de glucosa, la activación de AMPK llevó a un arresto en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, y a una disminución significativa en el número de eventos en fase S. Sin embargo, no vimos un efecto aditivo en el arresto de la proliferación al combinar AICAR con restricción de glucosa. Por otro lado, tanto la activación como la inhibición de PKA no indujeron ningún efecto en la progresión del ciclo celular (Figura 5.2.14).



**Figura 5.2.14. Efecto de los tratamientos sobre la distribución de las células HepG2 en el ciclo celular.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100 μM (dbAMPc), con o sin H89 1 μM (H89) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Las células se fijaron con etanol 70 % en frío, se lavaron con PBS y se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) y se sometieron a análisis por citometría de flujo. *Izquierda*, se muestran las distribuciones obtenidas de un experimento típico. Los resultados se analizaron con los programas WinMDi y Cylchred para obtener los respectivos porcentajes. *Derecha*, se muestran los resultados como gráficos de barras, las cuales representan la media del porcentaje de la población celular en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y S ± el error estándar de al menos 3 experimentos. \*P < 0,05 vs. C.

Se ha sido descrito que, en células HepG2, AMPK señala el arresto del ciclo celular vía inducción de p53 y p21 (133), por lo tanto analizamos la expresión de dichas proteínas luego de 36 horas de incubación en las distintas condiciones.



**Figura 5.2.15. Inducción de inhibidores del ciclo celular.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 h en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Se obtuvieron lisados celulares y se analizaron los niveles de las proteínas p53 y p21 por Western blotting. La proteína  $\beta$  actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \*P < 0,05 vs. C.

Nuestros resultados demostraron que tanto la ausencia de glucosa como la activación de PKA y de AMPK indujeron la expresión de p53 y p21 (Figura 5.2.15). Por el contrario, la presencia de H89 no indujo cambios en la expresión de estas proteínas (no mostrado). Por lo tanto, tomando en conjunto estos resultados y el análisis de la distribución de las células en el ciclo celular, podemos concluir que tanto la ausencia de glucosa como la activación de AMPK inducen arresto del ciclo celular asociado a un aumento en los niveles proteicos del inhibidor p21. La disminución en el número de células viables durante dichos tratamientos se debe, entonces, tanto a la activación apoptótica como al arresto de la proliferación.

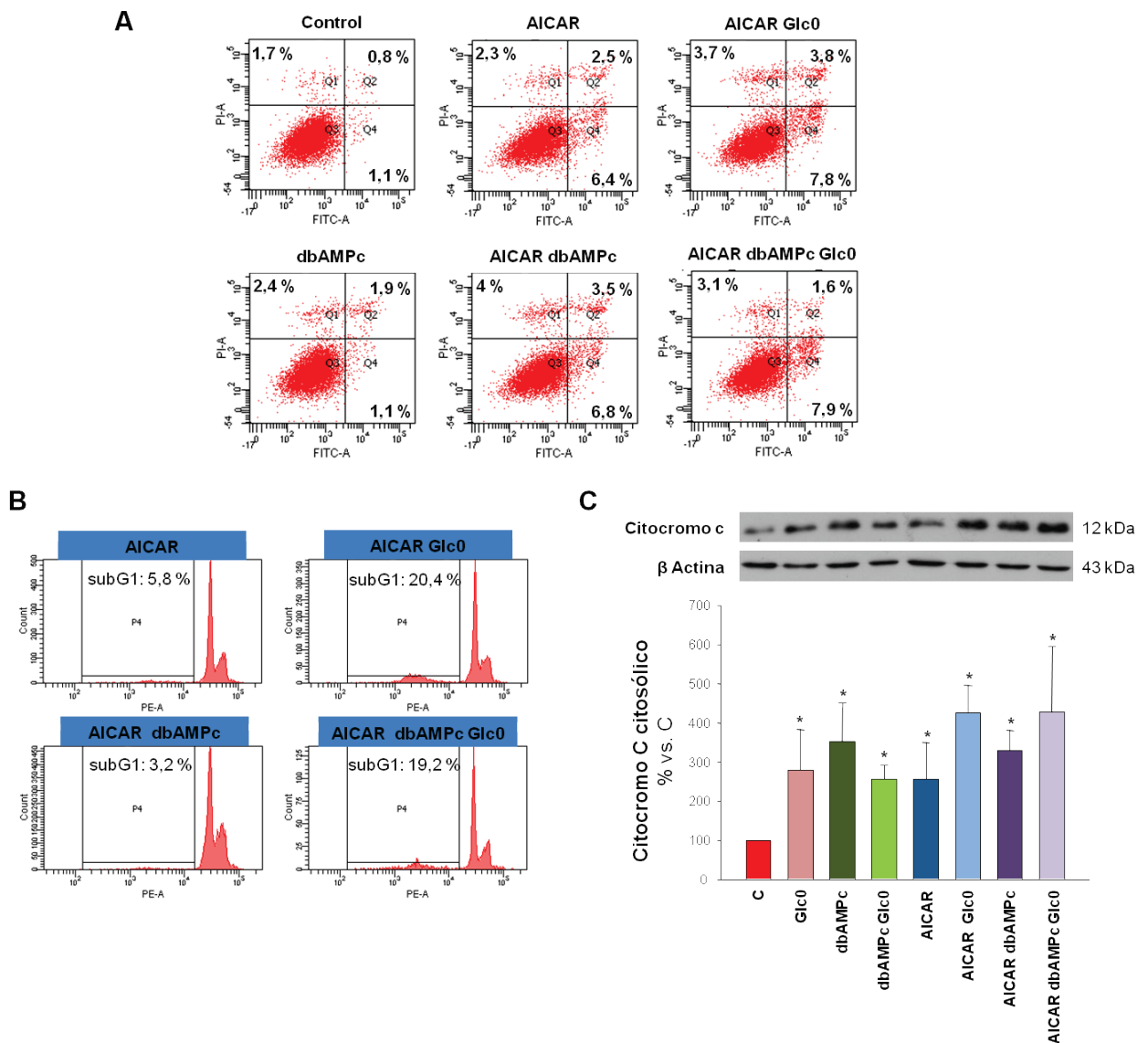
Por otro lado, el aumento de p21 inducido por dbAMPc podría explicarse por su activación transcripcional mediada indirectamente por el factor CREB (del inglés *cAMP-responsive element-binding protein*), el cual es fosforilado y activado por PKA (246,247). Sin embargo, esta elevación en los niveles de p21 en presencia de dbAMPc

no se acompaña de un arresto en la proliferación, que se postula depende de su localización nuclear (248). Es probable que la localización y/o contexto de p21 en esta condición de modulación por AMPc-PKA no propicie/n sus efectos nucleares como inhibidor de la duplicación del ADN y del ciclo celular.

### **5.2.3. Interacción entre las vías de señalización de PKA y AMPK en la regulación de la supervivencia ante la restricción de glucosa**

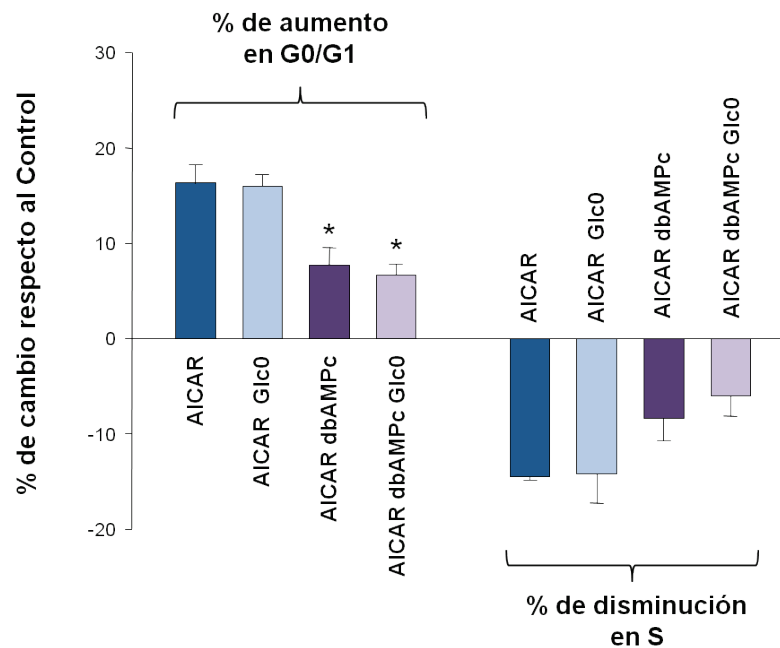
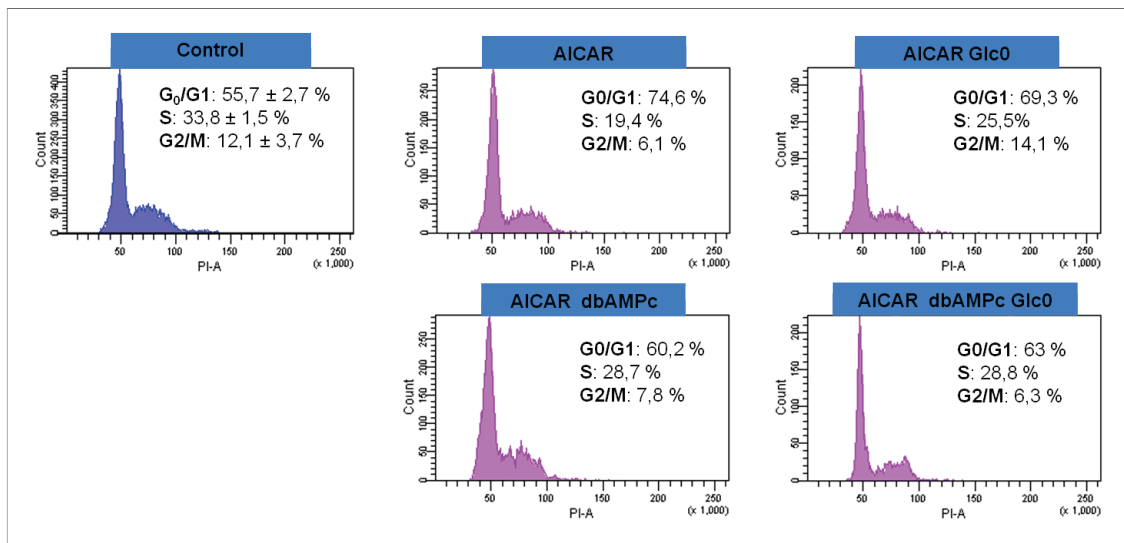
Aun cuando se conoce que los sistemas de señalización de AMPc/PKA modulan muchas de las rutas metabólicas que también son reguladas por el sistema de AMPK, nada se sabe hasta ahora del rol que este cruce entre vías de señalización puede tener sobre la regulación de la supervivencia y proliferación celular. Por lo tanto, como siguiente etapa de estudio, nos propusimos estudiar la posible interacción entre ambas vías de señalización en la regulación de la supervivencia y proliferación ante estrés nutricional en células HepG2.

Primeramente evaluamos el efecto de la coactivación de PKA y AMPK sobre la muerte celular. Para ello se agregaron al medio de cultivo ambos activadores (dbAMPc + AICAR) en presencia y ausencia de glucosa y se evaluó la activación de apoptosis a las 36 horas mediante la tinción con Anexina/IP, la estimación de la población subG1 por tinción con IP y la liberación de citocromo c a citosol (Figura 5.2.16). A partir de los resultados obtenidos se pudo observar que la combinación de ambos activadores no tuvo ningún efecto apreciable sobre la inducción de apoptosis (Figura 5.2.16), siendo el porcentaje de apoptosis alcanzado al combinar ambos activadores similar a la condición que provocaba mayor muerte apoptótica, lograda con el tratamiento con AICAR.



**Figura 5.2.16. Efecto de la activación simultánea de PKA y AMPK sobre la muerte apoptótica.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). (A), las células fueron teñidas con Anexina V-FITC (FITC) y con Ioduro de Propidio (PI) y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas (FITC+) y células muertas (PI+) mediante análisis de citometría de flujo. La figura muestra datos crudos de detección de fluorescencia verde (FITC) y roja (PI) para los distintos grupos en un experimento típico. (B) Las células se fijaron con etanol 70 % en frío, se lavaron con PBS, se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) y se sometieron a análisis por citometría de flujo para determinar la población de células en subG1. Se muestran las distribuciones obtenidas de un experimento típico. (C) Se obtuvieron fracciones citosólicas y se analizaron los niveles de la proteína Citocromo c por *western blot*. La proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0.05$  vs. C.

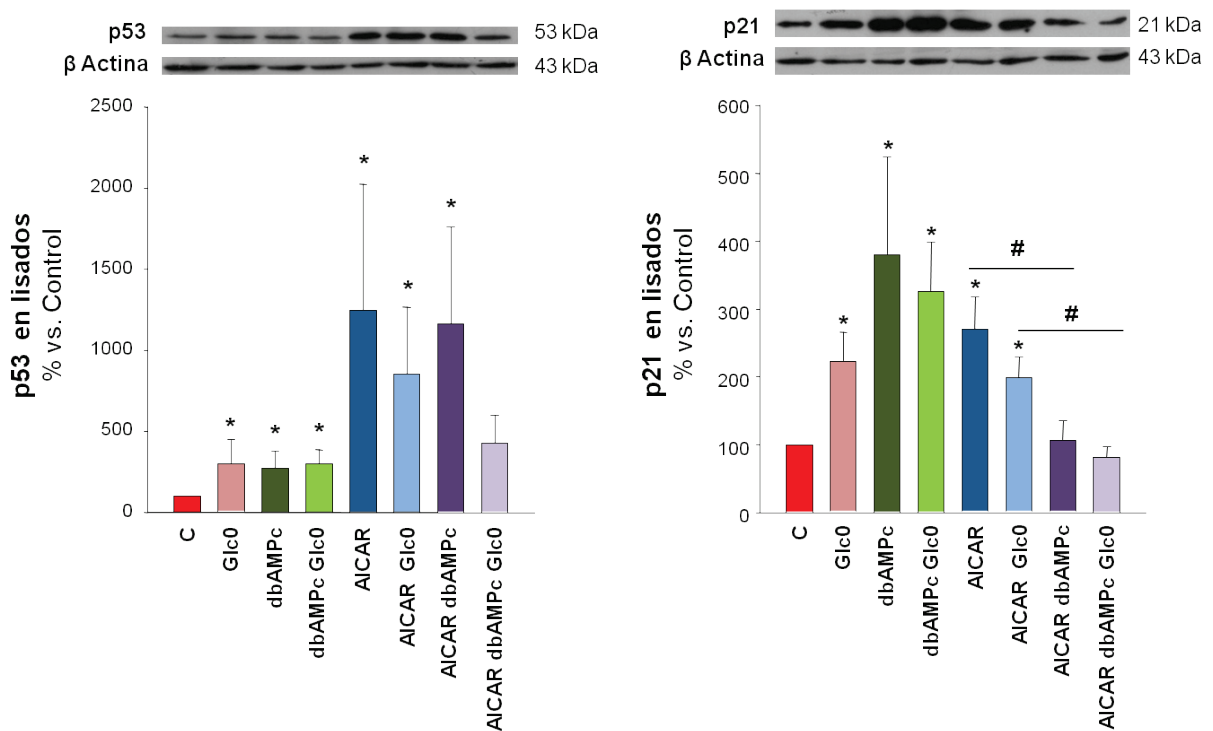
Seguidamente evaluamos el efecto de la coactivación de PKA y AMPK sobre la distribución del ciclo celular luego de 36 horas de tratamiento.



**Figura 5.2.17. Efecto de los tratamientos sobre la distribución de las células HepG2 en el ciclo celular.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Las células se fijaron con etanol 70 % en frío, se lavaron con PBS y se marcaron con Ioduro de Propidio (IP) y se sometieron a análisis por citometría de flujo. (*Arriba*) Se muestran las distribuciones obtenidas de un experimento típico. Los resultados se analizaron con los programas WinMDi y Cylchred para obtener los respectivos porcentajes de la población celular en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S Y G<sub>2</sub>/M. (*Abajo*) Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos del porcentaje de cambio respecto a células controles. \* $P < 0,05$  vs AICAR y AICAR Glc0.

La presencia de dbAMPc previno aproximadamente en un 50 % el arresto en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> inducido por AICAR y paralelamente aumentó parcialmente el número de eventos en fase S (Figura 5.2.17).

También evaluamos el efecto del tratamiento con dbAMPc sobre la inducción de p53 y p21 por AICAR (Figura 5.2.18). En concordancia con lo observado en la distribución de las células en el ciclo celular, observamos que la presencia de dbAMPc previno el aumento en la expresión de p21 inducida por AICAR, tanto en presencia como en ausencia de glucosa (AICAR:  $267,7 \pm 46,3$  %\*, dbAMPc AICAR:  $104,6 \pm 28,1$  %<sup>#</sup>, AICAR Glc0:  $197,5 \pm 30,1$  %\*, dbAMPc AICAR Glc0:  $82,2 \pm 15,1$  %<sup>#</sup>, Control: 100 %, \*p < 0,05 vs Control, <sup>#</sup>p < 0,05 vs AICAR y AICAR Glc0). En otras palabras, observamos que el tratamiento con ambos activadores combinados previno los aumentos en los niveles proteicos de p21 que era capaz de inducir cada activador por sí solo. Esto puede deberse no sólo al efecto directo de PKA sobre AMPK, sino también a la superposición de ambas quinasas en la modulación de CREB. En efecto, en células HepG2 ha sido descrito que AMPK regula negativamente la actividad de CREB (249,250). Así, en la resultante de estas diferentes vías de regulación preponderaría la supresión del aumento en los niveles proteicos de p21.



**Figura 5.2.18. Inducción de inhibidores del ciclo celular.** Células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Se obtuvieron lisados celulares y se analizaron los niveles de las proteínas p53 y p21 por *western blot*. La proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \*P < 0,05 vs. C. #P < 0,05 vs AICAR y AICAR Glc0.

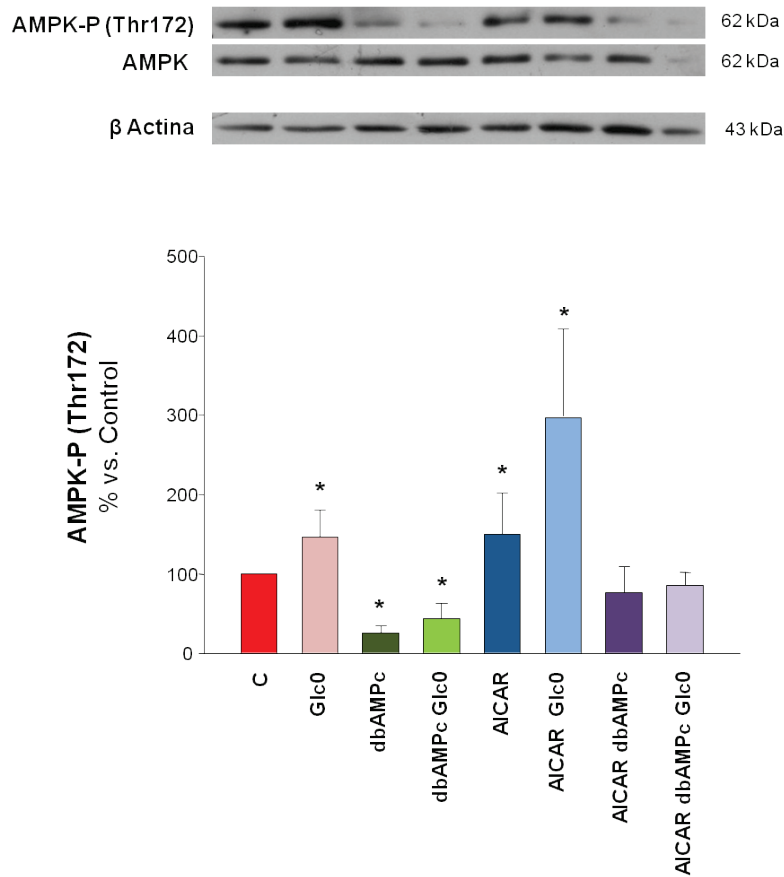
En el caso de p53, observamos un comportamiento de prevención por dbAMPc similar pero no tan marcado como al obtenido para p21, y solamente manifiesto en condiciones de privación de glucosa (AICAR Glc0:  $852,4 \pm 412,4$  %\*, dbAMPc AICAR Glc0:  $423,4 \pm 176,6$  % vs Control: 100 %).

En conjunto, nuestros hallazgos sugirieron la existencia de una interacción entre las vías de señalización de PKA y AMPK en la regulación de la supervivencia celular. Específicamente, la activación de PKA bloqueó el aumento de la expresión de proteínas supresoras del ciclo celular reguladas por AMPK, lo que se correlacionó con una prevención parcial del efecto de arresto del ciclo celular en G0/G1 inducido por AMPK.

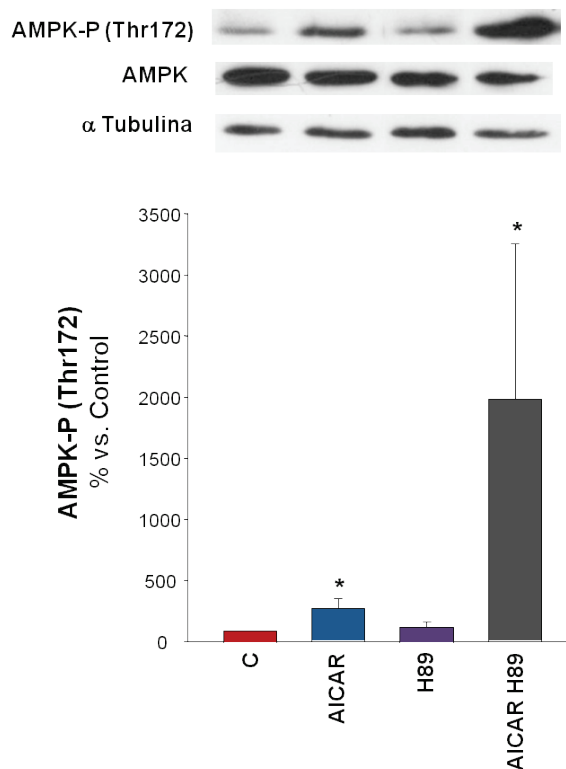
### **5.2.3.1. Regulación de AMPK por PKA**

Como comentamos antes, la activación de AMPK es controlada a través del sitio principal de fosforilación, Thr172, localizado en la subunidad  $\alpha$ . La fosforilación de este sitio es esencial para su actividad y puede ser catalizada por varias Thr172-AMPK quinasas (128). Han sido identificados otros sitios de fosforilación regulatorios de la actividad de AMPK. En algunos casos la fosforilación en estos residuos regula la fosforilación en la Thr172, modulando, de esta forma, la activación de AMPK. PKA es una de estas quinasas capaces de fosforilar y regular tanto negativamente (129) como positivamente (149) la actividad de AMPK.

Evaluamos el efecto de la activación/inhibición de PKA en las distintas condiciones, sobre los niveles de la subunidad AMPK $\alpha$  fosforilada en la treonina 172 (Figura 5.2.19-20). Los resultados mostraron que la presencia de dbAMPc disminuyó la fosforilación de AMPK, apagando completamente la activación de la misma inducida por AICAR en presencia y en ausencia de glucosa (Figura 5.2.19). Cabe aclarar que no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles proteicos de AMPK durante los tratamientos. Por otro lado observamos el efecto contrario al incubar simultáneamente a las células con AICAR y el inhibidor de PKA, H89 (Figura 5.2.20). La inhibición de PKA potenció el efecto de AICAR en la activación de AMPK.



**Figura 5.2.19. Activación de AMPK.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin AICAR 1 mM (AICAR). Se obtuvieron lisados celulares y se analizaron los niveles de AMPK fosforilada en Thr172 y AMPK total por *western blot*. La proteína  $\beta$  Actina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.



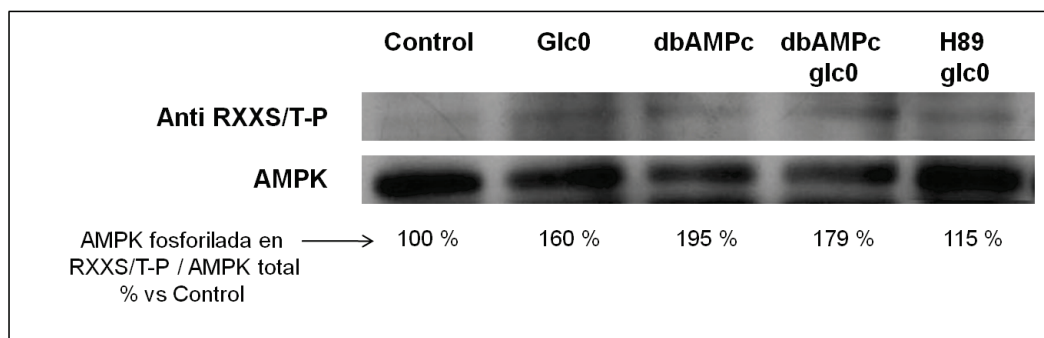
**Figura 5.2.20. Efecto de la inhibición de PKA sobre la activación de AMPK.** Las células HepG2 fueron incubadas 36 horas en presencia de glucosa 25 mM (C) con o sin AICAR 1 mM (AICAR) y con o sin H89 1  $\mu$ M (H89). Se obtuvieron lisados celulares y se analizaron los niveles de AMPK fosforilada en Thr172 y AMPK total por Western blotting. La proteína  $\alpha$  Tubulina fue utilizada como control de carga. Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos. \* $P < 0,05$  vs. C.

Por lo tanto podemos concluir que PKA regula negativamente la activación de AMPK en células HepG2 deprivadas de glucosa.

PKA puede regular en forma negativa los niveles de fosforilación en la Thr172 de AMPK por distintos mecanismos: inhibición alostérica de la fosforilación en Thr172, o activación de la defosforilación de ese residuo. Al respecto, existen al menos tres sitios en la subunidad  $\alpha$ ,  $\alpha$ 1Ser485 (129,251),  $\alpha$ 1Ser497 (129) y  $\alpha$ 1Ser173 (149), que pueden ser fosforilados por PKA. Por otro lado, la fosforilación en la Thr172 también está sujeta a regulación por PP2A, la cual es activada por fosforilación por PKA (150). El siguiente paso fue entonces evaluar la fosforilación directa de AMPK por PKA.

Para detectar la fosforilación directa de AMPK por PKA, inmunoprecipitamos AMPK a partir de lisados totales de células incubadas 24 horas en condiciones activadoras e inhibitorias de PKA. Utilizamos este tiempo de tratamiento porque consideramos que la fosforilación de AMPK debería ser un evento previo a los efectos sobre la supervivencia y proliferación anteriormente demostrados. A partir de estos inmunoprecipitados se evaluó la presencia de AMPK y de AMPK fosforilado por PKA mediante *western blot*.

La detección de residuos fosforilados fue realizada utilizando el anticuerpo ya descrito en otras partes de esta tesis que reconoce las formas fosforiladas de serinas y treoninas que son sustratos de PKA (RXXS/T(P)) (199).



**Figura 5.2.21. Fosforilación directa de AMPK por PKA.** Las células HepG2 fueron incubadas 24 horas en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa 25 mM, con o sin dbAMPc 100  $\mu$ M (dbAMPc) y con o sin H89 1  $\mu$ M (H89). Obtuvimos lisados celulares e inmunoprecipitamos AMPK a partir de cantidades equivalentes de proteínas. Se determinaron los niveles de de AMPK y de residuos RXXS/T-P en los distintos inmunoprecipitados por *western blot*. La figura muestra un experimento típico representativo de 3 experimentos.

De estos resultados podemos asegurar que en nuestras condiciones de trabajo se detecta AMPK fosforilada por PKA en las células HepG2. Además, durante la

incubación en medio libre de glucosa AMPK presentó mayores niveles de fosforilación. La activación de PKA con dbAMPc también indujo mayores niveles de fosforilación de AMPK, confirmando que en estas células AMPK es blanco de fosforilación de PKA. Por el contrario, la incubación con H89 previno parcialmente el aumento en los niveles de fosforilación de AMPK durante la ausencia de glucosa (Figura 5.2.21).

Por lo tanto podemos concluir que, en células HepG2, PKA regula negativamente la activación de AMPK por la fosforilación directa de residuos específicos en la subunidad  $\alpha$  de AMPK. Estos resultados son consistentes con los hallados en otros tipos celulares y contextos metabólicos (129,149,251).

### 5.2.6. Discusión

En células sometidas a un estrés nutricional, una red de quinasas tales como AMPK/Snf1, mTOR, PKA y Akt controlan la actividad de proteínas de defensa a estrés, reguladores del ciclo celular, proteínas pro y anti apoptóticas, complejos respiratorios, etc. (87). Esta compleja red de señalización regula diferencialmente la viabilidad en respuesta a la disponibilidad energética de la célula dependiendo del tipo celular (88).

Las células normales con una función mitocondrial intacta pueden usar en forma efectiva glucosa y otros intermediarios metabólicos para generar ATP a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Sin embargo, la habilidad de las células tumorales para usar la maquinaria respiratoria mitocondrial se encuentra comprometida. Estudios bioquímicos y moleculares sugieren distintos mecanismos por los cuales esta alteración metabólica podría evolucionar durante el desarrollo del cáncer. Estos mecanismos incluyen defectos y mal funcionamiento mitocondrial, adaptación a microambientes hipóxicos, señalización oncogénica, y expresión anormal de enzimas metabólicas. Esto fuerza a las células de cáncer a aumentar su actividad glucolítica para mantener suficiente generación de ATP. Como consecuencia, las células tumorales exhiben una alta tasa de glucólisis aun en presencia de oxígeno. Este fenómeno es considerado como una de las alteraciones metabólicas más importantes durante la transformación maligna. Se postula que esta adaptación metabólica eventualmente vuelve a las células tumorales altamente adictivas y dependientes de la vía glucolítica, y las convierte en vulnerables a la inhibición de esta vía. Esta elevada dependencia de las células de cáncer a la vía glucolítica para la generación de ATP proporciona una base bioquímica para el diseño de estrategias terapéuticas para matar preferencialmente células tumorales por inhibición farmacológica de la glucólisis (88,161). Es también interesante que estas diferencias fundamentales entre células normales y transformadas en el metabolismo de glucosa son usadas clínicamente para obtener imágenes de tejidos cancerosos (175). Recientemente se ha propuesto un nuevo método no invasivo para evaluar la captación de glucosa *in vivo*, que se basa en la obtención de imágenes por resonancia magnética y permite la captación de glucosa no marcada. Esta técnica puede distinguir tipos de tumores con diferentes características metabólicas y fisiopatológicas (252).

La glucosa junto con algunos aminoácidos son también utilizados para producir ácidos nucleicos a través de la vía de las pentosas fosfatos. Los intermediarios glucolíticos y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos son utilizados para producir ácidos grasos y aminoácidos no esenciales. Así, la glucólisis aeróbica permite a las células tumorales satisfacer sus requerimientos biosintéticos y promueve la proliferación celular (253).

En esta segunda parte de la tesis nos propusimos caracterizar algunos aspectos de la regulación de la supervivencia de células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A ante la falta de glucosa, y analizar el posible rol regulatorio de AMPK y PKA en este proceso.

En primer lugar, mostramos que las células HepG2 resultan muy sensibles a la falta de glucosa: desde las 12 horas de tratamiento el número de células viables disminuye en un 30 %, y a las 36 horas esta pérdida de células viables llega a un 71 %. Seguidamente, describimos que la ausencia de glucosa en células HepG2 induce activación apoptótica a partir de las 12 horas de tratamiento, que a las 36 horas es simultánea a una muerte por necrosis primaria. Al respecto, otros autores han descrito que la falta de glucosa en células HepG2 es capaz de inducir necrosis mediada por la activación de caspasa 8 en forma independiente de receptor de muerte (241). Por otro lado, otro grupo ha observado que la falta de glucosa durante 48 horas produce en estas células pérdida de viabilidad asociada a activación apoptótica (214). En general, en distintas células tumorales se ha constatado muerte apoptótica inducida por deprivación de glucosa (254-256). En nuestras manos, detectamos que ambos tipos de muerte parecen ocurrir en paralelo en estas células.

Dado que en las células tumorales tanto la supervivencia como la proliferación están altamente reguladas por la presencia de glucosa, analizamos también la progresión del ciclo celular durante la restricción de esta fuente de carbono. Nuestros resultados indicaron que la ausencia de glucosa provoca el arresto de la proliferación en fase G<sub>0</sub>/G1 del ciclo celular con la consiguiente disminución del número de células en fase S.

Por otro lado, al igual que en hepatocitos primarios, demostramos que la ausencia de glucosa induce un aumento precoz en los niveles de especies reactivas del oxígeno, a partir de las 6 horas de tratamiento. En concordancia con nuestros resultados,

Lee y colaboradores demostraron que la falta de glucosa en células HepG2 induce la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y un concomitante aumento en la expresión de la enzima antioxidante hemo oxigenasa-1(HO-1) representando una importante respuesta adaptativa de supervivencia al estrés oxidativo (214). En diferentes líneas celulares tumorales se ha demostrado que la restricción de glucosa, además de reducir la proliferación e inducir muerte celular, fuerza a las células a cambiar de un metabolismo glucolítico a un metabolismo respiratorio. La inhibición del complejo I de respiración, asociado con una estimulación de la respiración inducida por la restricción de glucosa, induce muerte celular por necrosis. De esta manera, la estimulación de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, en medio libre de glucosa, vuelve a las células de cáncer más sensibles a inhibidores de la fosforilación oxidativa (115). Estos autores proponen que la estimulación de la actividad mitocondrial durante la restricción de glucosa exacerba el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno en las células tumorales, como consecuencia de la disfuncionalidad de su sistema respiratorio (115). Por otro lado, debido a la señalización oncogénica, a la elevada actividad metabólica y al mal funcionamiento mitocondrial, las células de cáncer presentan una condición crónica de estrés oxidativo, constituyendo este fenotipo otra característica bioquímica de las células tumorales (257). Por lo tanto sería de esperar que, en comparación con las células normales, estas células tengan menos protección contra las ROS durante la deprivación de glucosa, lo que resultaría en una citotoxicidad selectiva y en una sensibilización de las células de cáncer a agentes que inducen estrés (175). Recientemente se ha demostrado que hay tirosina quinasas capaces de promover glucólisis aeróbica en células tumorales. En células de sarcoma y melanoma, que dependen altamente de glucosa para su supervivencia, la ausencia de este carbohidrato induce el aumento en la señalización por tirosina quinasa y generación de ROS; y ambos procesos sinergizan para amplificar los niveles de ROS, lo que finalmente resulta en muerte celular mediada por ROS (258).

La activación de AMPK en ausencia de glucosa ha sido observada en tipos de células muy diversos como timocitos y células derivadas de osteosarcoma, U2OS (135,143), células madres neuronales (NSCs) (136), células de carcinoma de colon, HCT116 (142), e incluso en células HepG2 (243,244), entre otras. En concordancia con

esto, nuestros resultados demostraron que AMPK también se encuentra más activa en ausencia de glucosa en nuestras condiciones de trabajo.

La activación de AMPK induce la acumulación y estabilización de p53, lo que lleva al aumento de los niveles del inhibidor p21 y al consiguiente arresto del ciclo celular y, a la vez, puede estimular la expresión de genes pro-apoptóticos y conducir a apoptosis (88). Consistente con la activación de AMPK en ausencia de glucosa, observamos un aumento en los niveles proteicos de su blanco p53 y en los niveles de p21. Esto sugiere que el arresto de la proliferación durante la ausencia de glucosa en células HepG2 es mediado por el aumento en los niveles proteicos del inhibidor del ciclo celular, p21. Por su parte, la activación de apoptosis posiblemente esté también asociada a la activación de p53 y a la inducción de sus genes blanco pro-apoptóticos (Bax, Puma, Noxa, etc). Recientemente, también se ha asociado a p53 con la inducción de necrosis en condiciones de estrés oxidativo en células de fibroblastos embrionarias de ratón y en líneas celulares colorectales y de cáncer de mama humanas (259). Sería interesante discriminar la contribución de p53 a la muerte celular observada en células HepG2, así como la evaluación de otras proteínas pro-apotóticas cascada abajo. En este sentido es importante mencionar que existen otras vías de activación de p53 en ausencia de glucosa independientes de AMPK. En diferentes líneas celulares y células de origen primario se demostró que durante la ausencia de glucosa la enzima malato deshidrogenasa nucleocitoplasmática (una enzima metabólica del ciclo de los ácidos tricarbónicos) se une y activa a p53, regulando así el arresto del ciclo celular y la apoptosis dependiente de p53 durante la restricción de glucosa (260). Por otro lado, el aumento en los niveles de ROS inducido por la falta de glucosa puede llevar también a la activación de p53 independientemente de AMPK (231-233). Existe también una regulación inversa p53-ROS, descrita en células de músculo liso humanas, en donde la sobreexpresión de p53 induce apoptosis por una vía dependiente de la producción de ROS (86).

En células madres neuronales (NSCs), por ejemplo, la ausencia de glucosa induce la activación de AMPK provocando arresto del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y supresión de la proliferación, sin inducir muerte por apoptosis ni necrosis (136). Por el contrario, la ausencia de glucosa en timocitos y en células derivadas de osteosarcoma U2OS induce activación de AMPK y apoptosis dependiente de p53 (143). Resulta, pues,

muy interesante el hecho de que ambos mecanismos, es decir apoptosis y arresto de la proliferación, se activen simultáneamente ante la falta de glucosa en las células que estudiamos, HepG2, haciéndolas particularmente sensibles a este estrés energético.

Por otro lado, estudiamos el efecto de la activación exógena de AMPK en la regulación de la supervivencia en células HepG2. Observamos que la activación de AMPK mediante el tratamiento con su activador AICAR, provocó una pérdida significativa de la viabilidad a partir de las 36 horas de tratamiento, la cual estuvo asociada a la inducción de apoptosis y a un arresto del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, ambos eventos se asociaron al aumento en los niveles proteicos de p53 y p21, de manera similar a lo observado durante la ausencia de glucosa. Otros autores, también demostraron que el tratamiento de células HepG2 con AICAR durante 72 horas suprime casi completamente el crecimiento celular disminuyendo notablemente la población celular en fase S, sin embargo ellos no registraron procesos de muerte celular (133). Si bien es posible que esto sea producto de variaciones en los clones celulares o aun en las condiciones experimentales, la divergencia puede también atribuirse a la sensibilidad de la metodología para detectar muerte celular, ya que estos autores descartan la existencia de ésta sólo basándose en la detección mediante el ensayo de exclusión con Azul de Tripán. En concordancia con nuestros hallazgos, la activación prolongada de AMPK con el activador AICAR en células de hepatocarcinoma de rata FTO2B y la transducción adenoviral de hepatocitos normales con una forma constitutivamente activa de AMPK induce apoptosis en dichas células (144). También ha sido descrito recientemente que, tanto en células HepG2 como en células HuH-7, la activación de AMPK con canabinoides, via la quinasa CaMKK2, reduce la viabilidad sobre todo por inducción de autofagia, comprobándose también dicho efecto en los tumores desarrollados al implantar células de hepatocarcinoma en ratones (261).

En esta parte de nuestro estudio aportamos evidencia que indica que, en células HepG2, la activación de AMPK con AICAR en ausencia de glucosa produce una disminución en el número total de células viables significativamente mayor que la inducida por cada tratamiento por separado. Esta adición en el efecto antitumoral no parece deberse a un aumento del arresto celular. Sí encontramos una tendencia apreciable de aumento de la apoptosis con la combinación AICAR y restricción de glucosa, que no fue estadísticamente significativa. Es probable que la muerte apoptótica,

y aun la necrótica, hayan sido subestimadas debido a las limitaciones en la detección citométrica, como ya discutimos en la primera parte.

Algunos estudios también involucran a PKA en la regulación de la supervivencia y apoptosis a diferentes niveles, teniendo roles tanto pro- como anti- supervivencia (102,104,219). También se han descrito efectos de PKA en la progresión del ciclo celular (245). Nos propusimos entonces caracterizar el posible rol de PKA en la regulación de la supervivencia y del ciclo celular durante el estrés energético en células HepG2. En primer lugar, demostramos que, al igual que lo observado en cultivo de hepatocitos normales, la restricción de glucosa indujo activación de PKA. Nuestros resultados también indican que la activación de PKA provoca un aumento en los niveles de ROS en células HepG2, y, en el mismo sentido que lo demostrado en hepatocitos, la inhibición de PKA previene completamente el estrés oxidativo inducido por la falta de glucosa. Esto indica que PKA contribuye a la producción de ROS en ausencia de glucosa en células HepG2. Al igual que lo demostrado en hepatocitos, y debido a los numerosos blancos de PKA presentes en la cadena respiratoria mitocondrial, es posible que PKA active la producción de ROS, y que lo haga modulando la actividad de algún complejo respiratorio. Se requerirán estudios adicionales para determinar si esto es así en HepG2 como en hepatocitos normales. En cualquier caso, a diferencia de lo observado en hepatocitos, la prevención del aumento de ROS al inhibir PKA en células HepG2, no fue suficiente para suprimir la apoptosis inducida por la falta de glucosa. Esto refleja la existencia de una superposición de efectos y la configuración de una red de regulación de la supervivencia más compleja en células HepG2 durante la ausencia de glucosa.

Demostramos, además, que la activación de PKA induce apoptosis, y un aumento simultáneo de los niveles proteicos de p53. Con lo cual el mecanismo ROS-p53, ya discutido anteriormente, puede contribuir, al menos en parte, a la activación apoptótica. Estudios con inhibidores de la producción de ROS (e.g. TEMPOL), por un lado, como con inhibidores de p53 (e.g. pifithrin- $\alpha$ ), por el otro, podrían ser útiles para comprobar una posible relación causa efecto entre estos eventos en la activación apoptótica. Al respecto, recientemente se ha demostrado que el aumento en la señalización AMPc/PKA por catecolaminas en fibroblastos embrionarios de ratón y en

células de carcinoma de pulmón LK-2, induce apoptosis dependiente de p53 vía la regulación de la transcripción de las BH3-only Puma y Noxa (262).

Por otro lado, al activar PKA no observamos efectos sobre la progresión del ciclo celular, aun cuando en estas condiciones se produce un marcado aumento en los niveles proteicos del inhibidor del ciclo celular p21. Este aumento de p21 inducido por dbAMPc podría explicarse por efectos atribuidos a CREB (del inglés *cAMP-responsive element-binding protein*) fosforilado por PKA. La actividad transcripcional de p53 es afectada por la proteína coactivadora CBP (del inglés *CREB-binding protein*). Al ser fosforilado por PKA, CREB induce la asociación de p53 con CBP y el reclutamiento de las mismas a promotores dependientes de p53. Dicho complejo proteico aumenta enormemente la actividad transcripcional de p53 con el consiguiente aumento de p21 y otros genes blancos (246,247). Sin embargo, en nuestros hallazgos esta elevación en los niveles de p21 en presencia de dbAMPc no se asocia a un arresto del ciclo celular, lo cual podría deberse a que el rol como inhibidor del ciclo celular de p21 depende de su localización nuclear (248). En su localización citoplasmática p21 puede tener roles duales. Comúnmente se reconoce su rol anti-apoptótico por inhibir caspasas, sin embargo p21 también puede promover apoptosis por mecanismos menos aclarados. Dependiendo del contexto, p21 puede inducir efectores pro-apoptóticos como Bax o miembros de la familia TNF, como así también a p53 (21). En hepatocitos normales, justamente, ha sido reportado un efecto pro-apoptótico de p21 provocado por los ácidos biliares a través del aumento de los niveles proteicos de p53 (263). Además se ha demostrado que en ciertos tipos celulares la sobreexpresión prolongada de p21 induce muerte apoptótica acompañada por un aumento de ROS (264). En nuestro escenario, dbAMPc induce apoptosis, a la vez que se hallan aumentados los niveles de p53-p21, por lo que es factible que esta muerte celular sea en parte atribuible a esto. Resta esclarecer la localización subcelular de p21 en esta condición y el rol que la misma podría tener en la inducción de apoptosis mediada por la activación de PKA en estas células.

Hasta aquí, concluimos que la restricción de glucosa en células HepG2 provoca un aumento en la señalización de las proteínas quinasas PKA y AMPK, y ambas proteínas actúan sinérgicamente en la inducción de muerte celular. Además, la ausencia de glucosa disminuye la proliferación celular a través de la inducción de p53-p21.

Resulta muy interesante el hecho de que la activación farmacológica de AMPK en ausencia de glucosa reduce enormemente la viabilidad celular. Esto puede ser útil para el diseño de estrategias terapéuticas que combinen la restricción de hidratos de carbono con el suministro de activadores de AMPK. Actualmente AICAR se encuentra en fase de ensayo clínico I/II, siendo utilizado en pacientes con leucemia linfocítica crónica. Debe destacarse que en las células de estos pacientes, AICAR induce apoptosis por un mecanismo independiente de AMPK y p53, en el que involucra la inducción de la expresión de Bim y Noxa. Esto es muy importante ya que muchas formas de este tipo de cáncer presentan mutaciones en el gen P53, y constituyen los cánceres con peores pronósticos (265). Entre otros potenciales agentes antitumorales capaces de activar AMPK podemos mencionar a la metformina, una droga ampliamente usada con acción antidiabética, la fangquinolina y los cannabinoides  $\Delta^9$ -THC y JWH-015, entre otros (140, 141,261,266).

Existen conexiones entre las vías de señalización de PKA y AMPK en músculo, hígado y tejido adiposo, ya que dichas proteínas regulan, en muchos casos, las mismas vías metabólicas de carbohidratos, lípidos, y metabolismo de proteínas. Además, en algunos de estos tejidos, se comprobó la regulación de AMPK por fosforilación directa por PKA. Específicamente, en adipocitos, PKA se asocia con AMPK y fosforila a AMPK $\alpha$ 1 en la Ser173 impidiendo, de esta forma, la fosforilación en la Thr172 por LKB1 y la consiguiente activación de AMPK en respuesta a señales lipolíticas. De esta forma la regulación de la actividad de AMPK por PKA cumple un rol importante en la regulación de la lipólisis (149). Contrariamente, existen trabajos que demuestran en estas mismas células, que los estímulos que elevan los niveles intracelulares de AMPc inducen un aumento en la actividad/fosforilación de AMPK (267). Otros trabajos han descrito que en las líneas celulares INS-1, en células embrionarias de fibroblasto de ratón y en células COS, la actividad de AMPK disminuye en respuesta a agentes que elevan AMPc debido a la fosforilación mediada por PKA de al menos dos sitios en la subunidad  $\alpha$ ,  $\alpha$ 1Ser485 y  $\alpha$ 2Ser491, lo que impide la fosforilación activadora en la Thr172 (129). Otros autores describen, en células de origen pancreático MIN6, la fosforilación por PKA de los residuos  $\alpha$ 1Ser485/ $\alpha$ 1Ser497 de AMPK, pero la misma no afecta la fosforilación de la Thr172. Estas fosforilaciones por PKA y la fosforilación de Thr172 responden en forma inversa a la presencia de glucosa (251). Es importante

mencionar que la activación de AMPK también puede ser regulada por fosfatasa que desfosforilan la Thr172 llevando a su inactivación (130,131). Una de estas fosfatasa, la PP2A, es fosforilada y activada por PKA, lo cual establece una posible regulación indirecta de AMPK por PKA (150). A pesar de estas evidencias de interconexión entre PKA y AMPK, hasta el momento no existen trabajos que hayan estudiado la interacción entre ambas en la regulación de la supervivencia celular.

De acuerdo a nuestros resultados, existe una interacción entre las vías de señalización de AMPK y PKA en la regulación de la progresión del ciclo celular en células HepG2. Observamos que la activación de PKA previene parcialmente el arresto de la proliferación inducido por la estimulación de AMPK, y dicho efecto se asocia a una marcada disminución en los niveles proteicos de p21. Evaluamos los niveles de AMPK activada y demostramos que PKA modula la activación de la misma, regulando negativamente la fosforilación del residuo Thr172. Demostramos además, la existencia de fosforilación directa de AMPK por PKA y que dicho sitio responde a la presencia de moduladores de la actividad de PKA en las células HepG2. No podemos descartar además la posible existencia de una regulación indirecta por PKA de la desfosforilación en la Thr172, mediada a través de la fosfatasa PP2A. Por lo tanto concluimos que PKA modula negativamente la activación de AMPK en HepG2 a través de la fosforilación directa en alguno/s de los sitios/s putativos, y que dicha fosforilación previene la fosforilación activadora en la Thr172. De esta manera, la interregulación de ambas vías condiciona cascada abajo la expresión de proteínas claves para el arresto del ciclo celular como p53 y p21. La inhibición de AMPK por PKA impacta, en este caso, sólo en el ciclo y no en la muerte celular. Esto no implica que en situación de coactivación de ambas quinasas no tenga lugar una regulación negativa de la apoptosis, que pueda no ser evidente porque PKA *per se* también induce esta vía de muerte celular.

Nuestros resultados mostraron que el dbAMPc induce un drástico aumento en la expresión de p21, la cual podría atribuirse a la activación del factor de transcripción CREB. La combinación de los activadores de AMPK y PKA previene completamente el aumento en los niveles proteicos de p21. Se ha descrito que AMPK también puede regular la actividad de CREB. Por un lado, puede fosforilar a CREB en el mismo sitio que PKA (Ser133), promoviendo, en este contexto, la actividad transcripcional de CREB (249). Además, en células HepG2, se demostró que AMPK promueve

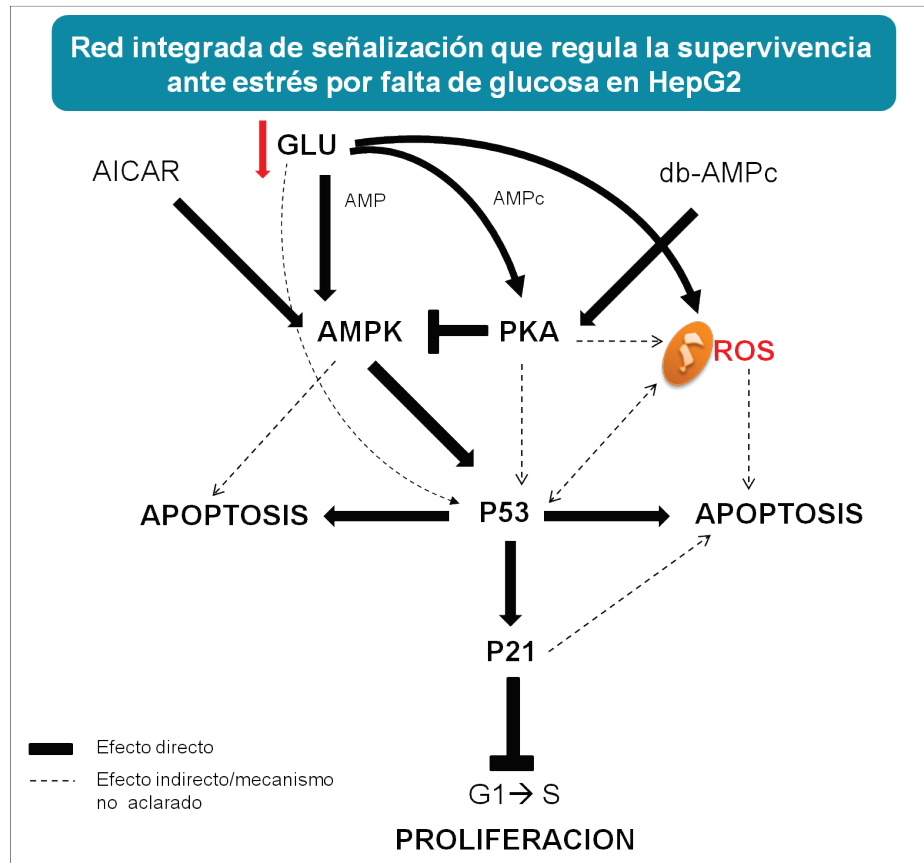
indirectamente la desfosforilación de otro residuo de CREB (Ser129), llevando así a una menor actividad transcripcional de dicha proteína (250). En nuestro escenario, podría suceder, por un lado, que la inhibición parcial de AMPK por PKA prevenga la acumulación de p21 inducida por AMPK-p53; y al mismo tiempo la inhibición de CREB por AMPK disminuya la expresión de p21 dependiente de CREB. Así, como resultante de ambos procesos, se observaría la disminución en los niveles proteicos de p21. Serían interesantes estudios adicionales que evalúen estas posibles fosforilaciones de CREB en nuestras condiciones experimentales para probar esta hipótesis.

Estos estudios nos permiten especular que en células con un genotipo en donde AMPK no pueda ser fosforilada e inhibida por PKA, la activación simultánea de ambas quinasas tendría un efecto antitumoral, al sumarse el efecto pro-apoptótico de ambas quinasas y el efecto anti-proliferativo de AMPK. El arresto de la proliferación inducido por AMPK, así como la apoptosis mediada por esta quinasa, no se vería afectado por la activación de PKA. En relación a esta hipótesis, hemos comenzado a desarrollar líneas estables conteniendo la subunidad catalítica de AMPK, AMPK $\alpha$ 1, salvaje ó con mutaciones individuales de los residuos potencialmente fosforilables por PKA ( $\alpha$ Ser173/ $\alpha$ Ser485/ $\alpha$ Ser497). Utilizaremos estas transformantes para comparar su sensibilidad a la falta de glucosa evaluando tanto la muerte celular como el ciclo celular.

A modo esquemático, en la Figura 5.2.22 se muestra la red hipotética de señalización mediada por las quinasas AMPK y PKA en la regulación de la supervivencia durante la falta de glucosa en células HepG2. Algunos de estos mecanismos ya han sido dilucidados, mientras que otros no están completamente esclarecidos. Aportar a la comprensión de los mecanismos de señalización que regulan la supervivencia de las células tumorales bajo diferentes condiciones nutricionales, contribuye a la generación de una base fundamental de conocimiento que permite el diseño de nuevas estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento del cáncer.

En resumen, los resultados de esta etapa de nuestro trabajo indican que la falta de glucosa en células HepG2 induce la activación de dos vías de quinasas, AMPK y PKA, que regulan diferencialmente la muerte y la proliferación y que existe una interregulación entre ambas controlando la expresión de proteínas claves para el arresto del ciclo celular. Así, el control del crecimiento tumoral en este tipo celular puede ser

una resultante tanto de las intervenciones dietarias que regulan la activación de estas quinasas como de los niveles hormonales capaces de modular las mismas.



**Figura 5.2.22.** La activación de AMPK inducida por la ausencia de glucosa (o por el activador AICAR), conducen por un lado al arresto de la progresión del ciclo celular a través de la inducción de p53 y su target p21, y, por el otro, a la activación de apoptosis, que puede ser parcialmente dependiente de p53. (Además la ausencia de glucosa podría llevar a la activación de p53 independientemente de AMPK, y conducir así a apoptosis y arresto de la proliferación). Por otro lado, la ausencia de glucosa induce a la activación de PKA y a un aumento en la generación de ROS mediada por PKA (que puede ser a través de la respiración mitocondrial como vimos en hepatocitos) lo que finalmente conduce a activación apoptótica dependiente de PKA. En este proceso podría también participar p53, que, se sabe, puede inducirse por ROS, o bien ella misma puede contribuir a su producción y así conducir a apoptosis. Por otro lado, PKA puede fosforilar e inhibir a AMPK. Este evento se pone de manifiesto al activar PKA con dbAMPc (en condiciones donde AMPK está totalmente activa con AICAR), donde observamos la prevención parcial de los efectos antiproliferativos y apoptóticos de AMPK. A su vez, la activación de PKA induce apoptosis a través de la generación ROS (y/o de p53 y p21 citoplasmático). Por esta razón, durante la coactivación, aun cuando PKA inhiba AMPK y la apoptosis mediada por esta vía, se detecta la muerte apoptótica inducida por PKA *per se*.

No es posible privar totalmente de glucosa a las células de cáncer *in vivo*, pero sí pueden tratarse animales y humanos con el inhibidor competitivo y análogo a glucosa, 2-desoxiglucosa. La administración de este compuesto junto con algún agente que induzca estrés oxidativo ya ha sido planteado como una posible estrategia terapéutica anticancerígena (175). Varios inhibidores de la glucólisis han demostrado una

prometedora actividad anti cáncer *in vitro* e *in vivo* y muchos han sido ya utilizados en ensayos clínicos. Entre ellos, el 3-bromopiruvato y la lonidamida, que inhiben la hexoquinasa; la 2-desoxiglucosa; la oxitiamina, que inhibe la vía de las pentosas fosfato, de gran importancia en la detoxificación de ROS en células tumorales; y el Imatinib, que disminuye la actividad hexoquinasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Sin embargo, algunos tejidos normales, como el cerebro, usan glucosa como principal fuente de energía y la inhibición de la glucólisis podría ser potencialmente tóxica. Una forma de minimizar estos problemas sería desarrollar inhibidores glucolíticos que no atraviesen la barrera hemato-encefálica. También sería importante evaluar los efectos de combinar inhibidores glucolíticos y otras modalidades terapéuticas para obtener un tratamiento efectivo (161).

Conclusiones

---

## 6. Conclusiones

En el **Capítulo 1** del presente trabajo de tesis mostramos que la ausencia de glucosa durante 6 horas en cultivo primario de hepatocitos induce la activación de la vía mitocondrial de apoptosis, la cual es dependiente de la actividad de PKA y de la interacción de la misma con sus proteínas de anclaje. Nuestros resultados indicaron que la incubación en medio libre de glucosa lleva a un aumento en la señalización por PKA en mitocondrias y en otros compartimentos subcelulares. La activación de PKA provoca un aumento precoz en los niveles de ROS durante la ausencia de glucosa mediante dos mecanismos. En primer lugar, la señalización atribuida a la fracción de PKA localizada en mitocondria conduce a una mayor producción de ROS durante la respiración mitocondrial. Por otro lado, PKA es capaz de regular negativamente la expresión transcripcional de las enzimas antioxidantes Catalasa y Superóxido dismutasa. El aumento temprano en los niveles de ROS mediado por PKA es el desencadenante de la activación apoptótica luego de 6 horas de restricción de glucosa, constituyendo una vía, aparentemente conservada desde las levaduras, capaz de modular la actividad mitocondrial gatillando así este suicidio celular en respuesta a la carencia de glucosa.

En el **Capítulo 2** describimos que la restricción de glucosa en células de hepatocarcinoma humano, HepG2, no sólo induce apoptosis a partir de las 12 horas, sino que también induce un arresto en la progresión del ciclo celular. Nuestros resultados indicaron un aumento en la señalización de las quinasas PKA y AMPK durante la ausencia de glucosa y que las mismas actúan aditivamente regulando la muerte en células HepG2. PKA contribuye a la producción de ROS en ausencia de glucosa y a la consiguiente activación apoptótica. Por su parte, la activación de AMPK induce apoptosis a la vez que un arresto en la progresión del ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> asociado a la inducción de p53-p21.

Demostramos, además, la existencia de una interacción entre las vías de señalización de AMPK y PKA en la regulación de la progresión del ciclo celular. Observamos que la activación de PKA previene parcialmente el arresto de la proliferación inducido por la estimulación de AMPK, y dicho efecto se liga a una marcada disminución en los niveles proteicos de p21. En apoyo de estos hallazgos,

también demostramos que PKA fosforila a AMPK y de esta manera regula negativamente la activación de la misma en estas células. En suma, los resultados de esta parte del trabajo indican que la falta de glucosa en células HepG2 involucra estas dos vías de quinasas que regulan diferencialmente la muerte y la proliferación y que existe una interacción entre AMPK y PKA en el control de la expresión de proteínas claves para el arresto del ciclo celular.

Finalmente, a partir de lo expuesto en ambos capítulos, pudimos comprobar nuestra hipótesis de que las quinasas PKA y AMPK son capaces de regular la supervivencia de las células de origen hepático durante la restricción de glucosa modulando vías de muerte celular y/o la progresión del ciclo celular. Además demostramos la existencia de distintos contextos celulares (en la quiescencia ó la transformación tumoral), en donde la restricción de glucosa afecta diferencialmente la supervivencia. En este sentido, es de interés remarcar que, si bien los niveles de apoptosis detectados en hepatocitos normales son comparables a los observados en células HepG2, en estas últimas también se observa muerte por necrosis. Por otro lado, el impacto de la restricción de glucosa es mayor aún en las células tumorales debido a que la disminución en el número de células viables es secundaria tanto al aumento de la muerte celular, como al arresto de la proliferación.

## Referencias Bibliográficas

---

## 7. Referencias Bibliográficas

1. Aguilar V. y Fajas L. (2010) Cycling through metabolism. *EMBO Mol. Med.* 2, 338-348
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M. y col. (1999) *Biología molecular de la célula*. 3° Ed., Omega, Barcelona, pp. 596-614
3. Cooper G. M. (1999) *The cell, a molecular approach*. ASM Dress and Sinauer Associated Inc. Washington, pp. 1191-1205
4. Lewin B. (2000) *Genes*. 5° Ed., McGraw-Hill, Oxford, pp. 2850-2912
5. Blow J. (1997) Preventing replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor. *Cell Biol.* 122, 143-152
6. Black J. D. (2000) Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* 5, 406-423
8. Ortega S., Malumbres M. y Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1602(1), 73-87
9. Polager S., Kalma Y., Berkovich E. y Ginsberg D. (2002) E2Fs up-regulate expressions of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21, 437-446
10. Orłowski C. (1996) The mammalian cell cycle in normal and abnormal growth. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 25, 491-502
11. Nishitani H. y Lygerou Z. (2002) Control of DNA replication licensing in cell cycle. *Genes Cells* 523-534
12. Hunter T. y Pines J. (1994) Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-582
13. Grana X. y Reddy E. P. (1995) Cell cyclin control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene* 11, 211-219
14. Giaccia A.J. y Kastan M.B. (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12, 2973-2983
15. Prives C. y Hall P.A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol.* 187, 112-126
16. Appella E. y Anderson C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268, 2764-2772
17. Liang S.H. y Clarke M.F. (2001) Regulation of p53 localization. *Eur. J. Biochem.* 268, 2779-2783

18. Shieh S.Y., Ikeda M., Taya Y. y Prives C. (1997) DNA damage induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325–334
19. Maya R., Balass M., Kim S.T. y col. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 15, 1067–1077
20. Mirzayans R., Andrais B., Scott A. y Murray D. (2002) New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (Article ID 170325), 1-16
21. Abbas T. and Dutta A. (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer.* 9(6), 400–414
22. Maddocks O. D. K. y Vousden K. H. (2011) Metabolic regulation by p53. *J. Mol. Med.* 89, 237–245
23. Vousden K. H. y Ryan K. M. (2009) p53 and metabolism. *Nature* 9, 691-700
24. Vousden K. H. y Lane D. P. (2007) p53 in health and disease. *Nature* 8, 275-283
25. Okada H. y Mak T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* 4, 592-603
26. Malhi H., Gores G. J. y Lemasters J. J. (2006). Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?. *Hepatology* 43(2), Suppl. 1, 831-844
27. Patel T., Steer C. J. y Gores G. J. (1999) Apoptosis and the liver: A mechanism of disease, growth regulation, and carcinogenesis. *Hepatology* 30, 811-815
28. Green D. R. y Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629
29. Salvesen G. S. y Dixit V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10964-10967
30. Green D.R. y Evan G. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19-30
31. Wyllie A. H. (1997). Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 189-197.
32. Chávez-Galán L., Arenas-Del Angel M. C., Zenteno E., Chávez R. y Lascurain R. (2009) Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6(1), 15-25
33. Hammerman P. S., Fox C. J. y Thompson C. B. (2004). Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends Biochem. Sci.* 28(11), 586-592

34. Murphy T. M., Perry A. S. y Lawler M. (2008) The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 11–25
35. Martindale J. y Holbrook N. J. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1–15
36. Oren M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 10, 431–442
37. Moll U. M., Marchenko N. y Zhang X-k. (2006) p53 and Nur77/TR3 – transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25, 4725–4743
38. Green, D.R., y Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127–1130
39. Vanlangenakker N., Berghe T. V., Krysko D. V., Festjens N. y Vandenabeele P. (2008) Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8(3), 207–220
40. Golstein P. y Kroemer G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32(1), 37–43
41. Hitomi J., Christofferson D. E., Ng A. y col. (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135(7), 1311– 1323
42. Edinger A. L. y Thompson C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663–669
43. Festjens N., Vanden Berghe T. y Vandenabeele P. (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(9-10), 1371
44. Fulda S., Gorman A. M., Hori O. y Samali A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 214074
45. Skulachev V. P. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11(4), 473-485
46. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. (2013) Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys Acta* 1833, 3448–3459
47. Vaseva A.V., Marchenko N.D., Ji K., Tsirka S.E., Holzmann S. y Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149, 1536–1548
48. King A. y Gottlieb E. (2009) Glucose metabolism and programmed cell death: an evolutionary and mechanistic perspective. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 885-893

49. Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M. y Klionsky D. J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075
50. Kroemer G. y Levine B. (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 1004-1010
51. Eskelinen E. L. (2008) New insights into the mechanisms of macroautophagy in Mammalian cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 266, 207-247
52. Liang X. H., Jackson S., Seaman M. y col. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402 (6762), 672-676
53. Pattingre S., Tassa A., Qu X. y col. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6), 927-939
54. Akar U., Chaves-Reyez A., Barria M. y col. (2008) Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4(5), 669-679
55. Maiuri M. C., Le Toumelin G., Criollo A. y col. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26(10), 2527-2539
56. Oberstein A., Jeffrey P. D. y Shi Y. (2007) Crystal structure of the Bcl-XL-beclin 1 peptide complex: beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem.* 282(17), 13123-13132
57. Feng Z., Zhang H., Levine A. J. y Jin S. (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8204-8209
58. Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552(2), 335-344
59. Liochev S. I. y Fridovich I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* 48, 157-161
60. Radi R., Cassina A., Hodara R., Quijano C. y Castro L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1451-1464
61. Babior B. M. (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* 50: 267-269
62. Babior B. M., Lambeth J. D. y Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 342-344
63. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J. y Vaz A. D.N. (1992). Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J.* 6, 669-673

64. Chen Q., Vazquez E. J., Moghaddas S., Hoppel C. L. y Lesnefsky E. J. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 278(38), 36027–36031
65. Mitchell P. (1977). Vectorial chemiosmotic processes. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 996–1005
66. Noji H. y Yoshida M. (2001). The rotary machine in the cell ATP synthase. *J. Biol. Chem.* 276, 1665–1668
67. Lehninger Principles of Biochemistry. Nelson D. L. y Cox M. M. (2005) 4<sup>o</sup> Ed. W. H. Freeman, pp. 690-705
68. Masayasu I. (1994) Protective mechanism against reactive oxygen species. in the liverbiology and pathobiology (Arias M, Boyer J, Fausto N, Jakoby W, Schachter D, and Shafritz D, eds), New York, pp. 443-459
69. Hamanaka R. B. y Chandel N. S. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochem. Sci.* 35(9), 505-513
70. Barja G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31, 347–366
71. Brand M. D., Affourtit C., Esteves T. C., Green K., Lambert A. J., Miwa S., Pakay J. L. y Parker N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755-767
72. Lambert A. J., Brand M. D. (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* 382, 511–517
73. Bartz R. R. y Piantadosi C. A. (2010) Clinical review: Oxygen as a signaling molecule. *Crit. Care* 14, 234
74. Warner D. S., Sheng H. y Batinic'Haberle I. (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. of Exp. Biol.* 207, 3221-3231
75. Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47- 95
76. Radi R. , Turrens J. F., Chang L. Y., Bush K. M., Crapo J. D. y Freeman B. A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 22028–22034
77. Phung C. D., Ezieme J. A. and Turrens J. F. (1994). Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 479–482

78. Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916-92148
79. Smith C. V., Jones D. P., Guenther T. M., Lash L. H. y Lauterburg B. H. (1996) Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 1-1249
80. Roychowdhury S., Wolf G., Keilhoff G. y Horn T. F. (2003) Cytosolic and mitochondrial glutathione in microglial cells are differentially affected by oxidative/nitrosative stress. *Nitric. Oxide.* 8, 39-47
81. DeLeve L. D. y Kaplowitz N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 5, 287-305
82. Grimm S. y Brdiczka D. (2007) The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855
83. Borutaite V. y Brown G. C. (2007) Mitochondrial regulation of caspase activation by cytochrome oxidase and tetramethylphenylenediamine via cytosolic cytochrome c redox state. *J. Biol. Chem.* 282, 31124-31130
84. Hussain S. P., Amstad P., He P., Robles A., Lupold S., Kaneko I., Ichimiya M., Sengupta S., Mechanic L., Okamura S., Hofseth L. J., Moake M., Nagashima M., Forrester K. S. y Harris C. C. (2004) p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 64(7), 2350-2356.
85. Sen N., Satija Y. K. y Das S. (2012) p53 and metabolism: old player in a new game. *Transcription* 3 (3), 119-123
86. Johnson T. M., Yu Z-X., Ferrans V. J., Lowenstein R. A. y Finkel T. (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11848-11852
87. Ferretti A. C., Larocca M. C., Favre C. (2012) Nutritional stress in eucaryotic cells: Oxidative species and regulation of survival in time of scarceness. *Mol. Genet. Metab.* 105(2), 186-192
88. El Mjiyad N., Caro-Maldonado A., Ramírez-Peinado S. y Muñoz-Pinedo C. (2010) Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene* 30, 253–264
89. Vander Heiden M. G., Cantley L. C. y Thompson C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
90. Wellen K. E. y Thompson C. B. (2012) A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(4), 270-276
91. Kim C., Vigil D., Anand G. y Taylor S. S. (2006). Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 651-654.

92. Feliciello A., Gottesman M. E. y Avvedimento E. V. (2005). cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell. Signal.* 17, 279-287
93. Jarnaess E. y Taskén K. (2007). Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes *Biochem. Soc. Tran.* 37(5), 931-937
94. McConnachie G., Langeberg L. K. y Scott J. D. (2006). AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol. Med.* 12(7), 317-323
95. Wong W. y Scott J. D. (2004). AKAP signaling complexes: focal points in space and time. *Mol. Cell Biol.* 5, 959-970
96. Hundsrucker C., Rosenthal W. y Klussmann E. (2006). Peptides for disruption of PKA anchoring. *Biochem. Soc. Trans.* 34(4), 472-473
97. Zaman S., Lippman S. I., Schneper L., Slonim N. y Broach J. R. (2009) Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol. Syst. Biol.* 5, 245
98. Diviani F y Scout JD (2001) AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 114, 1431-143
99. Akbar S. y Minor T. (2001). Significance and molecular targets of protein kinase A during cAMP-mediated protection of cold stored liver grafts. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1708-1714
100. Danial N. N., Gramm C. F., Scorrano L., Zhang C. Y., Krauss S., Ranger A. M., Robert Datta S., Greenberg M. E., Licklider L. J., Lowell B. B., Gygi S. P. y Korsmeyer S. J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature.* 424, 952-956
101. Mattaloni S. M., Kolobova E., Favre C., Marinelli R. A., Goldenring J. R. y Larocca M. C. (2012) AKAP350 Is involved in the development of apical "canalicular" structures in hepatic cells HepG2. *J. Cell Physiol.* 227(1), 160-171
102. Moujalled D., Weston R., Anderton H., Ninnis R., Goel P., Coley A., Huang D. C., Wu L., Strasser A. y Puthalakath H. (2011) Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim. *EMBO Rep.* 12, 77-83
103. Zhang L. y Insel P. A. (2004) The pro-apoptotic protein Bim is a convergence point for cAMP/protein kinase A- and glucocorticoid-promoted apoptosis of lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* 279, 20858-20865
104. Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L. J., Taylor S. S., Scott J. D. y Korsmeyer S. J. (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell.* 3, 413-422

105. Acin-Perez R., Salazar E., Kamenetsky M., Buck J., Levin L. R. y Manfredi G. (2009) Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 9, 265-276
106. Prabu S. K., Anandatheerthavarada H. K., Raza H., Srinivasan S., Spear J. F. y Avadhani N. G. (2006) Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J. Biol. Chem.* 281, 2061-2070
107. Leadsham J. E. y Gourlay C. W. (2010) cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol.* 11, 92
108. Carlucci A., Adornetto A., Scorziello A., Viggiano D., Foca M., Cuomo O., Annunziato L., Gottesman M. y Feliciello A. (2008). Proteolysis of AKAP121 regulates mitochondrial activity during celular hipoxia and brain ischemia. *EMBO J.* 27, 1073-1084
109. Lee I., Bender E. y Kadenbach B. (2002) Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235, 63-70
110. Helling S., Vogt S., Rhiel A., Ramzan R., Wen L., Marcus K. y Kadenbach B. (2008) Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1714-1724
111. Lee I., Salomon A. R., Ficarro S., Mathes I., Lottspeich F., Grossman L. I. y Hüttemann M. (2005) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 6094-6100
112. Technikova-Dobrova Z., Sardanelli A. M., Speranza F., Scacco S., Signorile A., Lorusso V. y Papa S. (2001) Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of mammalian mitochondrial proteins: enzyme and substrate characterization and functional role. *Biochemistry* 40, 13941-13947
113. Papa S., Rasmø D. D. Technikova-Dobrova Z., Panelli D., Signorile A, Scacco S., Petruzzella V., Papa F., Palmisano G., Gnoni A., Micelli L. y Sardanelli A. M. (2012) Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett.* 586, 568–577
114. Palorini R., De Rasmø D., Gaviraghi M., Sala Danna L., Signorile A., Cirulli C., Chiaradonna F., Alberghina L. y Papa S. (2013) Oncogenic K-ras expression is associated with derangement of the cAMP/PKA pathway and forskolin-reversible alterations of mitochondrial dynamics and respiration. *Oncogene* 32, 352-362
115. Palorini R., Simonetto T., Cirulli C. y Chiaradonna F. (2013) Mitochondrial Complex I Inhibitors and Forced Oxidative Phosphorylation Synergize in Inducing Cancer Cell Death. *Int. J. Cell Biol.* 2013:243876

116. Valsecchi F., Ramos-Espiritu L. S., Buck J., Levin L. R. y Manfredi G. (2013) cAMP and Mitochondria. *Physiology* 28, 199-109
117. Lin S. J., Defossez P. A. y Guarente L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128
118. Görner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E. L., Ammerer G., Ruis H. y Schüller C. (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.* 21, 135-144
119. Phillips A. J., Crowe J. D. y Ramsdale M. (2006). Ras pathway signaling accelerates programmed cell death I the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 726-731
120. Enns L. C., Morton J. F., Treuting P. R., Emond M. J., Wolf N. S., McKnight G. S., Rabinovitch P. S. y Ladiges W. C. (2009). Disruption of Protein Kinase A in Mice Enhances Healthy Aging. *PLoS ONE* 4(6), e5963, 1-11
121. Sanz P., Alms G.R., Haystead T.A. y Carlson M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase, *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328
122. Mihaylova M. M. y Shaw R. J. (2012) The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13(9), 1016–1023
123. Kim M. J., Park I. J., H Yun, Kang I., Choe W., Kim S. S. y Ha J. (2010) AMP-activated protein kinase antagonizes pro-apoptotic extracellular signal-regulated kinase activation by inducing dual-specificity protein phosphatases in response to glucose deprivation in HCT116 carcinoma. *J. Biol. Chem.* 285(19), 14617-14627
124. Mihaylova M. M. y Shaw R. J. (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13(9), 1016-1023
125. Hardie D. G. y Alessi D. R. (2013) LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link-ten years after. *BMC Biol.* 11: 36
126. Rattan R., Giri S., Singh A. K. y Singh I. (2005) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside Inhibits Cancer Cell Proliferation in Vitro and In Vivo via AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 280 (47), 39582-39593
127. Amodeo G.A., Rudolph M.J. y Tong L. (2007) Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* 449, 492–495
128. Emerling B.M., Weinberg F., Snyder C., Burgess Z., Mutlu G.M., Viollet B., Budinger G.R. y Chandel N.S. (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1386–1391

129. Hurley R. L., Barré L. K., Wood S. D., Anderson K. A., Kemp B. E., Means A. R. y Witters L. A. (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J. Biol. Chem.* 281(48), 36662-36672
130. Garcia-Haro L., Garcia-Gimeno M. A., Neumann D., Beullens M., Bollen M. y Sanz P. (2010) The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6  $\beta$  cells. *FASEB J.* 24, 5080-5091
131. Wang T., Yu Q., Chen J., Deng B., Qian L. y Le Y. (2010) PP2A Mediated AMPK Inhibition Promotes HSP70 Expression in Heat Shock Response. *PLoS ONE* 5(10), e13096
132. Motoshima H., Goldstein B. J., Igata M. and Araki E. (2006) AMPK and cell proliferation-AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J. Physiol.* 574(1): 63-71
133. Imamura K., Ogura T., Kishimoto A., Kaminishi M. y Esumi H. (2001) Cell Cycle Regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 562-567
134. Kim H. S., Hwang J. T., Yun H., Chi S. G., Lee S. J., Kang I., Yoon K. S., Choe W. J., Kim S. S. y Ha J. (2008). Inhibition of AMP-activated protein kinase sensitizes cancer cells to cisplatin-induced apoptosis via hyper-induction of p53. *J. Biol. Chem.* 283(7), 3731-3742.
135. Okoshi R., Ando K., Suenaga Y, Sang M., Kubo N., Kizaki H., Nakagawara A. y Ozaki T. (2009). Transcriptional regulation of tumor suppressor p53 by cAMP-responsive element-binding protein/AMP-activated protein kinase complex in response to glucose deprivation. *Genes to Cells* 14, 1429-1440
136. Zang Y., Yu L. F., Nan F. J., Feng L. Y. y Li J. (2009) AMP-activated protein kinase is involved in neural stem cell growth suppression and cell cycle arrest by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -d-ribofuranoside and glucose deprivation by down-regulating phospho-retinoblastom protein and cyclin D. *J. Biol. Chem.* 284(10), 6175-6184
137. Panieri E., Toietta G., Mele M., Labate V., Chiatamone Ranieri S., Fusco S., Tesori V., Antonini A., Maulucci G., De Spirito M., Galeotti T., and Pani G. (2010) Nutrient withdrawal rescues growth factor-deprived cells from mTOR-dependent damage. *Aging* 2(8), 487-503
138. Mukherjee P., Mulrooney T. J., Marsh J., Blair D., Chiles T. C. y Seyfried T. N. (2007) Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain. *Mol. Cancer* 7, 37

139. Yang P-M, Liu Y-L, Lin Y-C, Shun C-T, Wu M-S y Chen C-C (2010) Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of atorvastatin in digestive malignancies. *Cancer Res.* 70(19), 7699-7709
140. Tomic T., Botton T., Cerezo M., Robert G., Luciano F., Puissant A., Gounon P., Allegra M., Bertolotto C., Bereder J-M, Tartare-Deckert S., Bahadoran P., Auberge P., Ballotti R. y Rocchi S. (2011) Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* (2011), 2
141. Shi W-Y, Xiao D., Wang L., Dong L-H, Yan Z-X, Shen Z-X, Chen S-J, Chen Y y Zhao W-L (2012) Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.* (2012), 3
142. Berkers C. R., Maddocks O. D. K., Cheung E. C., Mor I. y Vousden K. H. (2013) Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab.* 8(5), 617-633
143. Okoshi R., Ozaki T., Yamamoto H., Ando K., Koida N., Ono S., Koda T., Kamijo T., Nakagawara A. y Kizaki H. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem.* 283(7), 3979-3987
144. Meisse D., Van de Castele M., Beauloye C., Hainault I., Kefas B. A., Rider M. H., Foufelle F. y Hue L. (2002) Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* 526, 38-42
145. Blázquez C., Geelen M. J. H., Velasco G. y Guzmán M. (2001) The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes. *FEBS Lett.* 489, 149-153
146. Ido Y., Carling D. y Ruderman N. (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 51, 159-167
147. Stefanelli C., Stanic I., Bonavita F., Flamigni F., Pignatti C., Guarnieri C. y Caldarera C. M. (1998) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 821–826
148. Russell R. R., Li J., Coven D. L., Pypaert M., Zechner C., Palmeri M., Giordano F. J., Mu J., Birnbaum M. J. y Young L. H. (2004) AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest.* 114(4), 495-503
149. Djouder N., Tuerk R. D., Suter M., Salvioni P., Thali R. F., Scholz R., Vahtomeri K., Auchli Y., Rechsteiner H., Brunisholz R. A., Viollet B., Makela T. P., Wallimann T., Neumann D. y Krek W. (2010) PKA phosphorylates and inactivates AMPK $\alpha$  to promote efficient lipolysis. *EMBO J.* 29, 469-481

150. Ahn J-H., McAvoy T., Rakhilin S. V., Nishi A., Greengard P. y Naim A. C. (2007) Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56 $\delta$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(8), 2979-2984
151. Stone J. D., Narine A. y Tulis D. A. (2012) Inhibition of vascular smooth muscle growth via signaling crosstalk between AMP-activated protein kinase and cAMP-dependent protein kinase. *Front. Physiol.* 3(409), 1-12
152. Houssay B. A. y col. (2000). *Fisiología Humana*. 7º Ed., El Ateneo, pp. 208-215
153. Meyer P. (1985). *Fisiología Humana*. Salvat, pp. 103-111
154. Arias B. y col. (1994). *The liver biology and pathobiology*. 3º Ed., RAVEN PRESS, pp. 3-11; 321-345
155. Klover P. J. y Mooney R. A. (2004) Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 753–758
156. Blum J. J., Rabkin M. S. (1986) Quantitation of fluxes in the gluconeogenic, glycolytic, and pentose phosphate pathways in isolated rat hepatocytes: Energetic considerations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 194, 255-270
157. Ferrer J. C., Favre C., Gomis R. R., Fernández-Novell J. M., García-Rocha M., de la Iglesia N., Cid E. y Guinovart J. J. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546, 127-132
158. Collier J. J. y Scott D. K. (2004). Sweet changes: glucose homeostasis can be altered by manipulating genes controlling hepatic glucose metabolism. *Mol. Endocrinol.* 18(5), 1051-1063
159. Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314
160. Mulukutla B. C., Khan S., Lange A. and Hu W-S. (2010) Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* 28, 476-484
161. Pelicano H., Martin D. S., Xu R-H. Huang P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633–4646
162. Katabi M. M., Chan H. L. B., Karp S. E. y Batist G. (1999). Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Hum. Gene Ther.* 10, 155-164
163. DeBerardinis R. J., Lum J. J., Hatzivassiliou G. y Thompson c. B. (2008) The biology of cáncer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7(1), 11-20
164. Kroemer G. y Pouyssegur J. (2008) Tumor cell metabolism: cáncer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13(6), 472-482

165. Ramos Montoya A., Lee W. N., Bassilian S., Lim S. Trebukhina R. V., Kazhyna M. V. y col. (2006) Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: a new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int. J. Cancer* 119(12), 2733-2741
166. Hatzivassiliou G., Zhao F., Bauer D. E., Andreadis C., Shaw A. N. Dhanak D. y col. (2005) ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8(4), 311-321
167. Brusselmasn K., De Schrijver E., Verhoeven G. y Swinnen J. V. (2005) RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65(15), 6719-6725
168. Pizer E. S., Wood F. D., Pasternack G. R. y Kuhajda F. P. (1996) Fatty acid synthase (FAS): a target for cytotoxic antimetabolites in HL60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res.* 56(4), 745-751
169. Menendez J. A. y Lupu R. (2007) Fatty acid synthase and lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7(10), 763-777
170. DeBerardinis R. J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S. y col. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(49), 19345-19350
171. Medina M. A., Sanchez-Jimenez F., Marquez F. J., Perez-Rodriguez J., Quesada A. R. y Nunez de Castro I. (1988) Glutamine and glucose as energy substrates for Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem. Int.* 16(2), 339-347
172. Souba W. W. (1993) Glutamine and cancer. *Ann. Surg.* 218(6), 715-728
173. Mazurek S., Eigenbrodt E., Failing K. y Steinberg P. (1999) Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. *J Cell Physiol.* 181(1), 136-146
174. Frezza C. y Gottlieb E. (2009). Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biol.* 19, 4-11
175. Simons A. L., Mattson D. M., Dornfeld K. y Spitz D. R. (2009) Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* 5(9), 2-6
176. Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69-90
177. Perz J. F., Armstrong G. L., Farrington L. A., Hutin Y. J. F. y Bell B. P. (2006) The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* 45, 529-538

178. Llovet J. M., Burroughs A. y Bruix J. (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362, 1907-1917
179. Calle E. E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K. y Thun M. J. (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625-1638
180. Chen X., Cheung S. T., So S., Fan S. T., Barry C., Higgins J., Lai K. M., Ji J., Dudoit S., Ng I. O., Van De Rijn M., Botstein D. y Brown P. O. (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol. Biol. Cell.* 13, 1929-1939
181. Yeh S. H., Chen P. J., Shau W. Y., Chen Y. W., Lee P. H., Chen J. T. y Chen D. S. (2001) Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 121, 699-709
182. Yokoo H., Kondo T., Fujii K., Yamada T., Todo S. y Hirohashi S. (2004) Proteomic signature corresponding to alpha fetoprotein expression in liver cancer cells. *Hepatology* 40(3), 609-617
183. Wissemann D. H., Anundi I., Lauchart W., Viebahn R. y De Groot H. (1991). Differences in glycolytic capacity and hypoxia tolerance between hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology.* 13(2), 297-303
184. Taketa K., Shimamura J., Ueda M., Shimada Y. y Kosaka K. (1988) Profiles of carbohydrate-metabolizing enzymes in human hepatocellular carcinomas and preneoplastic livers. *Cancer Res.* 48, 467-474
185. Iyer V. V., Yang H., Ierapetritou M. G. y Roth. C. M. (2010) Effects of glucose and insulin on HepG2-C3A cell metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 107(2), 347-356
186. Ouattara D. A., Prot J-M., Bunescu A., Dumas M-E., Elena-Herrmann B., Leclercb E. y Brochot C. (2012) Metabolomics-on-a-chip and metabolic flux analysis for label-free modeling of the internal metabolism of HepG2/C3A cells. *Mol. BioSyst.* 8, 1908–1920
187. Robey R. B. and Hay N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects growth factors and Akt. *Oncogene.* 25, 4683-4696
188. Kelly J. H. y Darlington G. J. (1989) Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25(2), 217-222
189. Larocca M. C., Ochoa E. J., Rodriguez Garay E. A. y Marinelli R. A. (2002). Protein kinase C-dependent inhibition of the lysosomal degradation of endocytosed proteins in rat hepatocytes. *Cell. Signal.* 14, 641-647.
190. Gomis R. R., Favre C., Garcia-Rocha M., Fernandez-Novell J. M., Ferrer J. C. y Guinovart J. J. (2003). Glucose6-phosphate produced by gluconeogenesis and by glucokinase is equally effective in activating hepatic glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 9740-9746.

191. Durand-Scheneider A. M., Bouranga J. C., Feldman G. y Maurice M. (1991). Microtubule disruption interferes with the structural and functional integrity of the apical pole in primary. *J. Cell. Biol.* 56, 260-268
192. Baur H., Kasperek S. y Pfaff E. (1975) Criteria of viability of isolated rat liver cells. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 356 (6), 827-836
193. Cook J. A. y Mitchell J. B. (1989). Viability measure in mammalian cells systems. *Anal. Biochem.* 179, 1-7
194. Benford D. J. y Hubbard S. A. (1987). *Biochem. Toxicol.*, IRL Press, pp. 57-79
195. Bergmeyer H. U. y Bernt E. (1970). *Methods in Enzymatic Analyse.* 2º Ed, Bergmeyer H. U., pp. 1407-1410
196. Bova M. P., Tam D., McMahon G. y Mattson M. N. (2005) Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells. *Toxicol. Lett.* 155, 41–50
197. Favre C., Aguilar P. S. y Carillo M. C. (2008). Oxidative stress and chronological aging in glycogen-phosphorylase-deleted yeast. *Free Rad. Biol. Med.* 45, 1446–1456
198. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
199. Larocca M. C., Shanks R. A., Tian L., Nelson D. L., Stewart D. M. y Goldenring J. R. (2004) AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 (CIP4) at the Golgi apparatus. *Molec. Biol. Cell* 15, 2771-2781.
200. Bong-Jo K., Seung-Wook R. y Byoung-Joon S. (2006) JNK- and p38 Kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 21256–21265
201. Santiago A. P., Aguiar Chaves E., Oliveira M. F. y Galina A. (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie.* 90, 1566–1577
202. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5
203. Zhu H., Bannenberg G. L., Moldeus P. y Shertzer H. G. (1994) Oxidation pathways for the intracellular probe 20,70-dichlorofluorescein. *Arch. Toxicol.* 68, 582–587
204. Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M. A., Beebe D., Oates P. J., Hammes H. P., Giardino I. y Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790

205. Esposti M. D. y McLennan H. (1998) Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 430, 338–342
206. Sabbatini M. E., Villagra A., Davio C. A., Vatta M. S., Fernandez B. E. y Bianciotti L. G. (2003) Atrial natriuretic factor stimulates exocrine pancreatic secretion in the rat through NPR-C receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G929–G937
207. Sambrook J. y Fritsch E. F. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2<sup>o</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
208. Livak K. J. y Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25, 402–408
209. Herberg F. W., Maleszka A., Eide T., Vossebein L. y Tasken K. (2000). Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. *J. Mol. Biol.* 298, 329–339
210. Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A. J., Roth K. A., MacGregor G. R., Thompson C. B. y Korsmeyer S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 624–626
211. Arokium H., Ouerfelli H., Velours G., Camougrand N., Vallette F. M. y Manon S. (2007) Substitutions of potentially phosphorylatable serine residues of Bax reveal how they may regulate its interaction with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 35104–3511227
212. Lee Y. J., Galoforo S. S., Berns C. M., Chen J. C., Davis B. H., Sim J. E., Corry P. M. y Spitz D. R. (1998) Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrugresistant human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 5294–5299
213. Liu Y., Liu W., Song X. D. y Zuo J. (2005) Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells. *Mol. Cell Biochem.* 268, 45–51
214. Lee H. G., Li M. H., Joung E. J., Na H. K., Cha Y. N. y Surh Y. J. (2010) Nrf2-Mediated heme oxygenase-1 upregulation as adaptive survival response to glucose deprivation-induced apoptosis in HepG2 cells. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1639–1648
215. Fontana L., Partridge L. y Longo V. D. (2010) Extending healthy life span-From yeast to humans. *Science* 328, 321–326
216. Blander G., de Oliveira R. M., Conboy C. M., Haigis M. y Guarente L. (2003) Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 278, 38966–38969

217. Yang H., Yang T., Baur J. A., Perez E., Matsui T., Carmona J. J., Lamming D. W., Souza-Pinto N. C., Bohr V. A., Rosenzweig A., de Cabo R., Sauve A. A. y Sinclair D. A. (2007) Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival. *Cell* 130, 1095–1107
218. Sokolovic' M., Sokolovic' A., Wehkamp D., Loren V., van Themaat E., de Waart D. R., Gilhuijs-Pederson L. A., Nikolsky Y., van Kampen A. H., Hakvoort T. B. y Lamers W. H. (2008) The transcriptomic signature of fasting murine liver. *BMC Genomics* 9, 528
219. Pediaditakis P., Kim J. S., He L., Zhang X., Graves L. M. y Lemasters J. J. (2010) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by protein kinase A in rat liver mitochondria and hepatocytes. *Biochem. J.* 431, 411–421
220. Appukuttan A., Kasseckert S. A., Micoogullari M., Flacke J-P., Kumar S., Woste A., Abdallah Y., Pott L., Reusch H. P. y Ladilov Y. (2012) Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 93, 340–349
221. Meyer L. E., Machado L. B., Santiago A. P., da-Silva W. S., De Felice F. G., Holub O., Oliveira M. F. y Galina A. (2006) Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP recycling activity. *J. Biol. Chem.* 281, 37361–37371
222. Vincent A. M., McLean L. L., Backus C. y Feldman E. L. (2005) Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J.* 19, 638–640
223. Busik J. V., Mohr S. y Grant M. B. (2008) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57, 1952–1965
224. Herker E., Jungwirth H., Lehmann K. A., Maldener C., Frohlich K. U., Wissing S., Buttner S., Fehr M., Sigrist S. y Madeo F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164, 501–507
225. Chang S. H., Garcia J., Melendez J. A., Kilberg M. S. y Agarwal A. (2003) Heme oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *Biochem. J.* 371, 877–885
226. Alamdary S. Z., Digaleh H. y Khodaghali F. (2013) Dual contradictory effect of H89 on neuronal retraction, death and inflammation in differentiated PC12 cells subjected to oxidative stress. *J. Mol. Neurosci.* 51(3), 1030-1037
227. Hong J. Y., Lebofsky M., Farhood A. y Jaeschke H. (2009) Oxidant stress-induced liver injury in vivo: role of apoptosis, oncotic necrosis, and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G572–G581
228. Fang J., Qin H., Seki T., Nakamura H., Tsukigawa K. y Maeda H. (2011) Therapeutic potential of pegylated hemin for ROS-related diseases via induction of

- heme oxygenase-1: results from a rat hepatic ischemia/reperfusion injury model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339(3), 779-89
229. Yu H. C., Qin H. Y., He F., Wang L., Fu W., Liu D., Guo F. C., Liang L., Dou K. F. y Han H. (2011) Canonical notch pathway protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury in mice by repressing reactive oxygen species production through JAK2/STAT3 signaling. *Hepatology* 54, 979–988
230. Vaughn A. E. y Deshmukh M. (2008) Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature Cell Biol.* 10, 1477–1483
231. Méplan C., Richard M-J. y Hainaut P. (2000) Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem. Pharmacol.* 59, 25–33
232. Karawajew L., Rhein P., Czerwony G. y Ludwig W-D. (2005) Stress-induced activation of the p53 tumor suppressor in leukemia cells and normal lymphocytes requires mitochondrial activity and reactive oxygen species. *Blood* 105(12), 4767-4775
233. Augustyn K. E., Merino E. J. y Barton J. K. A role for DNA-mediated charge transport in regulating p53: Oxidation of the DNA-bound protein from a distance (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 18907–18912
234. Elmore S. P., Qian T., Grissom S. F. y Lemasters J. J. (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15, 2286–2287
235. Kim I. y Lemasters J. J. (2011) Mitochondrial degradation by autophagy (mitophagy) in GFP-LC3 transgenic hepatocytes during nutrient deprivation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C308– C317
236. Sardanelli A. M., Signorile A., Nuzzi R., Rasmò D. D., Technikova- Dobrova Z., Drahotà Z., Occhiello A., Pica A. y Papa S. (2006) Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMPdependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 5690–5696
237. De Rasmò D., Signorile A., Roca E. y Papa S. (2009) cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS J.* 276, 4325–4333
238. Piccoli C., Scacco S., Bellomo F., Signorile A., Iuso A., Boffolia D., Scrima R., Capitanio N. y Sergio Papa S. (2006) cAMP controls oxygen metabolism in mammalian cells. *FEBS Lett.* 580, 4539–4543
239. Papa S., De Rasmò D., Technikova-Dobrova Z., Panelli D., Signorile A., Scacco S., Petruzzella V., Papa F., Palmisano G., Gnoni A., Micelli L., Sardanelli A. M. (2012) Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases. *FEBS Lett.* 586, 568–577

240. Lemasters J. J., Holmuhamedov E. L., Czerny C., Zong Z. y Maldonado E. (2012) Regulation of mitochondrial function by voltaje dependent anion channels in ethanol metabolism and Warburg effect. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1536-1544
241. Suzuki A., Kusakai G. K., Kishimoto A., Lu J., Ogura T. y Esumi H. (2003) ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 22, 6177-6182
242. Chang S., Barbosa-Tessmann I., Chen C., Kilberg M. S. y Agarwal A. (2002) Glucose deprivation induces heme oxygenase-1 gene expression by pathway independent of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 277(3), 1933-1940
243. Suchankova G., Nelson L. A., Gerhart-Hines Z., Kelly M., Gauthier M. S., Saha A. K., Ido Y., Puigserver P. y Ruderman N. B. (2009) Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 836-841
244. Suzuki A., Kusakai G., Shimojo Y., Chen J., Ogura T., Kobayashi M. y Esumi H. (2005) Involvement of transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation. *J. Biol. Chem.* 280(36), 31557-31563
245. Matyakhina L., Lenherr S. M. y Stratakis C. A. (2002) Protein kinase A and chromosomal stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 968, 148–157
246. Giebler H. A., Lemasson I. y Nyborg J. K. (2000) p53 Recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation. *Mol. Cell Biol.* 20(13), 4849–4858
247. Wadgaonkar R., Phelps K. M., Haque Z., Williams A. J., Silverman E. S. y Collins T. (1999) CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor- $\kappa$ B and p53 signaling. *J. Biol. Chem.* 274 (4), 1879–1882
248. Asada M., Yamada T., Ichijo H., Delia D., Miyazono K., Fukumuro K. y Mizutani S. (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18 (5), 1223–1234
249. Thomson D. M., Herway S. T., Fillmore N., Kim H., Brown J. D., Barrow J. R. y Winder W. W. (2008) AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J. App. Physiol.* 104, 429–438
250. Horike N., Sakoda H., Kushiyama A., Ono H., Fujishiro M., Kamata H., Nishiyama K., Uchijima Y., Kurihara Y., Kurihara H. y Asano T. (2008). AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase C gene expression in the liver. *J. Biol Chem.* 283(49), 33902–33910

251. Garcia-Haro L., Garcia-Gimeno M. A., Neumann D., Beullens M., Bollen M. y Sanz P. (2012) Glucose-dependent regulation of AMP-activated protein kinase in MIN6 beta cells is not affected by the protein kinase A pathway. *FEBS Lett.* 586, 4241–4247
252. Walker-Samuel S., Ramasawmy R., Torrealdea F., Rega M., Rajkumar V., Johnson S. P., Richardson S., Gonçalves M., Parkes H. G., Årstad E., Thomas D. L., Pedley R. B., Lythgoe M. F. y Golay X. (2013) In vivo imaging of glucose uptake and metabolism in tumors. *Nature Med.* 19(8), 1067-1073
253. Mason E. F., Rathmell J. C. (2011) Cell metabolism: An essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813: 645-654
254. Vander Heiden M. G., Plas D. R., Rathmell J. C., Fox C. J., Harris M. H. y Thompson C. B. (2001) Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol. Cell Biol.* 21(17), 5899–5912
255. Zhao Y., Jonathan L. Coloff J. L., Ferguson E. C., Jacobs S. R., Cui K. y Rathmell J. C. (2008) Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J. Biol. Chem.* 283(52), 36344–36353
256. Puthalakath H., O'Reilly L. A., Gunn P., Lee L., Kelly P. N., Huntington N. D. y col. (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349
257. Pelicano H., Carney D., Huang P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* 7, 97–110
258. Graham N. A., Tahmasian M., Kohli B., Komisopoulou E., Zhu M., Vivanco I., Teitell M. A., Wu H., Ribas A., Lo R. S., Mellinghoff I. K., Mischel P. S. y Graebe T. G. (2012) Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. *Mol. Syst. Biol.* 8(589), 1-16
259. Montero J., Dutta C., van Bodegom D., Weinstock D. y Letai A. (2013) p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ.* 20, 1465–1474
260. Lee S. M., Kim J. H., Cho E. J. y Youn H. D. (2009) A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death Differ.* 16, 738–748
261. Vara D., Salazar M., Olea-Herrero N., Guzmán M., Velasco G. y Díaz-Laviada I. (2011) Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ.* 18, 1099-1111
262. Rahimi A., Lee Y. Y., Abdella H., Doerflinger M., Gangoda L., Srivastava R., Xiao K., Ekert P. G. y Puthalakath H. (2013) Role of p53 in cAMP/PKA pathway mediated apoptosis. *Apoptosis* 18(12), 1492-1499
263. Qiao L., McKinstry R., Gupta S., Gilfor D., Windle J. J., Hylemon P. B., Grant S., Fisher P. B. y Dent P. (2002) Cyclin kinase inhibitor p21 potentiates bile acid-induced apoptosis in hepatocytes that is dependent on p53. *Hepatology* 36, 39-48

264. Masgras I., Carrera S., de Verdier P. J., Brennan P., Majid A., Makhtar W., Tulchinsky E., Jones J. D. D., Roninson I. B. y Macip S. (2012) Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. *J. Biol. Chem.* 287(13), 9845–9854
265. Santidrián A. F. González-Gironés D. M., Iglesias-Serret D., Coll-Mulet L., Cosialls A. M., de Frias M., Campás C., González-Barca E., Alonso E., Labi V., Viollet B., Benito A., Pons G., Villunger A. y Gil J. (2010) AICAR induces apoptosis independently of AMPK and p53 through up-regulation of the BH3-only proteins BIM and NOXA in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 116(16), 3023-3032
266. Wang N., Pan W., Zhu M., Zhang M., Hao X., Liang G. y Feng Y. (2011) Fangchinoline induces autophagic cell death via p53/sestrin2/AMPK signalling in human hepatocellular carcinoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 164 731–742 731
267. Omar B., Zmuda-Trzebiatowska E., Manganiello V., Göransson O. y Degerman E. (2009) Regulation of AMP-activated protein kinase by cAMP in adipocytes: roles for phosphodiesterases, protein kinase B, protein kinase A, Epac and lipolysis. *Cell Signal.* 21(5), 760-766

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Cristián Favre y a la Dra. María Cecilia Larocca por haber aceptado dirigir mi Tesis, por confiar en mí, por transmitirme sus conocimientos y experiencia, por su dedicación y consejos, por asistirme en todo momento y ayudarme a transitar este camino hacia mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas que me permitieron realizar el presente trabajo de Tesis.

Gracias a mis compañeros de grupo o “hermanitos”, a Stellita por ayudarme y aconsejarme siempre, por enseñarme un montón de cosas a nivel profesional y humano, por sostenerme en mis peores momentos, por ser mi amiga incondicional. A Facu, por su buen humor de todos los días y compañerismo, por ayudarme y escucharme siempre. Gracias a los dos que sin ellos no hubiese sido lo mismo.

Gracias a mis “primos” los “carrillitos”, a los que les tengo un cariño muy especial, por todos los momentos compartidos. A Pauli, por la amistad que hemos construido, por su humildad, buen humor, y apoyo incondicional, y ayudarme tanto en todo. A Laurita, por su transparencia, simpatía, alegría y su risa contagiosa que la caracteriza, por ayudarme siempre a seguir adelante. A JPP por tantos momentos compartidos, por tantas charlas, por su buen humor, sinceridad, por brindarme su ayuda siempre, con sus conocimientos y asesorarme en temas informáticos. A Ari, por su buen humor constante, por estar presente en todo momento, alentarme siempre y preocuparse por mí. A Lu por su frescura y simpatía, por haberme escuchado tantas veces, por ayudarme en muchas cosas. Gracias a mis “primos” que hicieron que el trabajo de cada día se convirtiera en algo grato y lindo de hacer.

Agradezco también a los chicos de “este lado” por contribuir a generar un ambiente en el que da gusto trabajar, a Isma, que conozco casi de toda la vida, siempre dispuesto a ayudar en todo, a Gi, por su calidez, buen humor y alegría y a Chispy por su buena onda y transparencia y ayudarme siempre con sus conocimientos y pasándome protocolos y reactivos tantas veces.

Agradezco a los chicos “del otro lado”, a Dani, por su humildad e increíble humor que más de una vez me ha hecho llorar de risa y al que le debo más de una con

todo lo que me ayudó; a Lean por ese humor que lo caracteriza y sus palabras de aliento; a Julieta por su sinceridad, su incentivo a seguir adelante y charlas compartidas; a Andre, mi compañera de cuarto en tantos congresos, por su buena onda y serenidad; a Flavia, por su calidez y bondad y por darme fuerza tantas veces a seguir adelante; a Virgi por su amabilidad y gran corazón siempre dispuesta a darte una mano en todo; a Julia, por tantas charlas y mates compartidos y su ayuda en tantas cosas. A Noe, por su humildad, buen humor, sus consejos, y su ayuda en muchas oportunidades. A Agus por su sinceridad, espontaneidad, buen humor y tantos almuerzos y charlas compartidas. Gracias a JPR, Agos, Laura, Silvi, Ceci, Tere, Maite.

Gracias a Elena y Diego por ayudarme muchísimo en gran parte de mi tesis y por las lindas charlas compartidas. A José, por su buen humor constante y brindarme su ayuda tantas veces con las microscopías.

A los demás integrantes del IFISE por hacerme sentir siempre como en casa, por su amabilidad, generosidad y ayuda desinteresada.

A Mara y Rodrigo, por la paciencia y predisposición durante las largas horas de confocal y citómetro compartidas.

Gracias a mis tutoras Cristina Carnovale y María Gabriela Mediavilla por seguir año a año el progreso de mi tesis, por todos sus aportes y predisposición y especialmente a Cristina Carnovale por ser también Jurado de mi Tesis. Al resto del Jurado de Tesis: Dra. Mónica Lidia Kotler y Dra. María Fernanda Troncoso, por aceptar evaluar mi trabajo y dedicar gentilmente parte de su tiempo para hacerlo.

A mis amigos de toda la vida: Li, Maru, Vir, Fede, Tomás, Ceci por estar siempre en los buenos y malos momentos y por tantos años de amistad compartidos.

A mi familia, mi mamá, Mati, Fede y la Tata, por ayudarme a luchar y seguir adelante siempre, acompañarme en los buenos y malos momentos, por ser ejemplo de esfuerzo y perseverancia. Gracias por confiar en mí, hoy no estaría acá ni sería quien soy si no fuera por ellos.

A Lucas, por su apoyo incondicional, sus consejos, por alentarme siempre a seguir adelante a pesar de las dificultades, por su compañía constante en este camino que es la vida, por enseñarme a ser cada día mejor persona, pero más que nada por todo su amor.

Sin todas estas personas hubiera sido difícil transitar este camino.