

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“EFECTOS DE LA INCRETINA GLP-1 SOBRE EL
ACOPLAMIENTO RETÍCULO ENDOPLÁSMICO-
MITOCONDRIA EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO
VASCULAR: ROL DE PKA Y MITOFUSINA-2”**

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica,
área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes, y
Memoria de Título de Bioquímica por:

PABLO ESTEBAN MORALES CAMPOS

Director de Tesis
Dr. Mario Chiong Lay

Santiago, Chile
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

PABLO ESTEBAN MORALES CAMPOS

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día _____.

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hernán Lara P. (Presidente)

Dr. Yedy Israel J.

Dra. Paulina Donoso L.

Para mi Mamá

Para mi Papá

Para mi Pipi

Esta tesis de Magíster se llevó a cabo en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, el cual pertenece al Centro de Estudios Moleculares de la Célula, en las Facultades de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Medicina de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 2011 (Pablo Morales)
- Proyecto FONDECYT 1110180 (Dr. Mario Chiong)
- Proyecto Anillo ACT1111 (Drs. Sergio Lavandero y Mario Chiong)

La presente tesis de Magíster y memoria de pregrado ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

a) Presentaciones a congresos:

Morales PE, Torres G, Chiong M. Incretin GLP-1 promotes PKA-dependent functional endoplasmic reticulum-mitochondria coupling on vascular smooth muscle cells. XX Reunión Anual International Society for Heart Research Sección Latinoamericana. Sesión de Pósters. Santiago, Chile, 25-26 Octubre 2012.

Torres G, **Morales PE**, Michea L, Lavandero S, Chiong M. The incretin Glucagon like peptide-1 (GLP-1) induces mitochondrial fusion and mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells. XX Reunión Anual International Society for Heart Research Sección Latinoamericana. Sesión de Pósters. Santiago, Chile, 25-26 Octubre 2012.

Chiong M, **Morales PE**, Torres G, Michea L, Lavandero S. Interacción retículo endoplásmico y mitocondria inducido por incretina GLP-1 en células musculares lisas vasculares. XX Reunión Anual International Society for Heart Research Sección Latinoamericana. Simposio Mecanismos Moleculares de Patologías Cardiovasculares. Santiago, Chile, 25-26 Octubre 2012.

Morales PE, Torres G, Michea L, Lavandero S, Chiong M. La incretina GLP-1 promueve el acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias en células de músculo liso vascular sin alterar la captación de glucosa. II Congreso Ciencia Joven. Sesión de Pósters. Santiago, Chile, 6 Septiembre 2012.

Morales PE, Torres G, Michea L, Lavandero S, Chiong M. Incretin GLP-1 promotes functional endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in vascular smooth muscle cells. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile, 2-5 Octubre 2012

Torres G, **Morales PE**, Michea L, Lavandero S, Chiong M. Glucagon like Peptide -1 (GLP-1) modulates mitochondrial dynamics and metabolism in vascular smooth muscle cells. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Puerto Varas, Chile, 2-5 Octubre 2012.

del Campo A, Parra V, Gutiérrez T, **Morales PE**, Lavandero S. A bidirectional and complex relationship between mitochondrial dynamics and insulin signaling and skeletal muscle cells. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Oral session. Puerto Varas, Chile, 2-5 Octubre 2012.

Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, **Morales PE**, Contreras-Ferrat A, Vásquez-Trincado C, Lavandero S. Impaired mitochondrial Ca^{2+} uptake in pathological cardiomyocyte hypertrophy disrupts the proper insulin signaling. XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Oral Session. Puerto Varas, Chile, 2-5 Octubre 2012.

Morales PE, Torres G, Michea L, Lavandero S, Chiong M. GLP-1 promotes energetic metabolism in vascular smooth muscle cells. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011.

Torres G, **Morales PE**, Michea L, Lavandero S, Chiong M. Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) Promotes Mitochondrial Fusion in Vascular Smooth Muscle Cells. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011. 15

Pennanen C, Rivera P, **Morales PE**, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Role of mitochondrial dynamics on the pathophysiology of cardiomyocyte hypertrophy. XXXIV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Poster session. Valdivia, Chile, 27-30 Septiembre 2011.

b) Publicaciones:

Chiong M, **Morales PE**, Torres G, Gutiérrez T, García L, Ibacache M, Michea L. Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cells proliferation. VASA. Aceptado para publicación, 2012.

Kuzmicic J, Del Campo A, López-Crisosto C, **Morales PE**, Pennanen C, Bravo-Sagua R, Hechenleitner J, Zepeda R, Castro PF, Verdejo HE, Parra V, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure. Rev Esp Cardiol 64:916-23, 2011.

Troncoso R, Vasquez-Trincado C, del Campo A, Gatica D, **Morales PE**, Paredes F, Gutiérrez T, López-Crisosto C, Torrealba N, Garcia L, Diaz-Araya G, Battiprolu PK, Nemchenko A, Ferdous A, Gillete TG, Hill JA, Lavandero S. Chapter 9: Regulation of autophagy by Insulin/IGF-1 signaling pathways. Autophagy: Principles, Regulation and Roles in Disease - Nova Publisher-September 2, 2011

Pennanen C, Parra V, López-Crisosto C, **Morales PE**, del Campos A, Verdejo H, Gutiérrez T, Rivera P, Zepeda R, Ferreira J, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial dynamics plays a critical role in the development of norepinephrine-induced cardiac hypertrophy in calcineurin-regulated pathway. Manuscrito en preparación.

del Campo A, Parra V, Gutiérrez T, **Morales PE**, Vasquez-Trincado C, López-Crisosto C, Verdejo H, Troncoso R, Bravo R, Kuzmicic J, Zorzano A, Lavandero S. Mitochondrial fission impairs insulin signaling and effects in mitochondrial calcium-dependent way. Manuscrito en preparación.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar, a Dios. Por todas las bendiciones y oportunidades que ha puesto en mi camino, y porque Su compañía y amor han permitido que llegue hasta este lugar.

Al Profesor Sergio Lavandero, por permitirme ser parte de este gran grupo de trabajo y apoyarme siempre que se lo he pedido. Al Profesor Mario Chiong, por la enorme confianza depositada en mi trabajo y en mis capacidades. Gracias a ambos por el conocimiento y la experiencia que han compartido conmigo. También quiero agradecer a Don Fidel y a la Sra. Gindra, por la paciencia que me han tenido cada vez que se me pierde algo, y por la preocupación y compromiso que he visto en su labor.

Muchas gracias a todos los miembros del Grupo Mitocondrias. Gracias por los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, de verdad que hacen de este laboratorio un excelente lugar para trabajar. Quiero agradecer especialmente a Camila, por su constante apoyo y ayuda. También quiero dar las gracias a Valentina, a Gloria, a Lauchón y a Ovejín, por todos los consejos y ayuda entregados.

Quiero agradecer la compañía, paciencia y apoyo de mis amigos de carrera. A Bernie, Grillo, Sebastián, Pablo, Feña, Vale, Damián y Lorenzo. Quiero agradecer especialmente a Marianne, por ser mi partner desde el comienzo, por todas las risas compartidas y por la sincera amistad que me ha entregado.

También quiero darle las gracias a mi familia. A mis tías Marta y María Elena, por toda la preocupación que muestran por mí. A mi tío Waldo, por acogerme como un hijo más en mi llegada a Santiago.

Finalmente, quiero agradecer con todo mi corazón a quienes han hecho de mí quién soy ahora. A mis papás Ana María y Víctor, por su amor incondicional, por su apoyo y por todas las lecciones que me han enseñado. A mi persona favorita, mi hermana Camila, porque su llegada transformó mi mundo. Porque la sonrisa de ustedes tres, me basta como premio. Gracias por todo.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La incretina GLP-1.....	9
1.1.1. Generalidades sobre las hormonas incretinas	9
1.1.2. Función de GLP-1 y control del metabolismo	9
1.1.3. GLP-1 y su sistema de transducción de señales	10
1.2. Musculatura lisa vascular	12
1.2.1. Generalidades sobre el músculo liso vascular	12
1.2.2. Rol metabólico de las mitocondrias en VSMC	12
1.3. Acoplamiento entre retículo endoplásmico y mitocondrias.....	13
1.3.1. Función mitocondrial y su regulación por Ca^{2+}	13
1.3.2. Comunicación entre retículo endoplásmico y mitocondrias.....	14
1.3.3. Participación del acoplamiento RE-mitocondria en el traspaso de Ca^{2+} ..	15
1.3.4. Rol de Mitofusina-2.....	16
1.4. GLP-1, actividad mitocondrial y musculatura lisa vascular.....	17
1.4.1. Efectos de GLP-1 sobre la vasculatura.....	17
1.4.2. Regulación de la actividad mitocondrial por GLP-1 y acoplamiento RE- mitocondria en la vasculatura	18
1.5. Resumen de antecedentes claves	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Reactivos.....	21
4.2. Modelo de estudio y cultivo celular	22

4.3.	Estimulación con GLP-1	22
4.4.	Preparación de extractos celulares totales	22
4.5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas	23
4.6.	Western blot	23
4.7.	Medición de los niveles mitocondriales de Ca ²⁺	24
4.8.	Inmunofluorescencia indirecta	25
4.9.	Análisis digital de imágenes.....	26
4.10.	Análisis estadístico	28
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Modulación del acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias por GLP-1	29
5.1.1.	Acercamiento físico entre RE y mitocondrias.....	29
5.1.2.	Acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias	32
5.2.	Efecto de GLP-1 sobre los niveles de Mitofusina-2 y participación de PKA ...	34
5.3.	Participación de PKA y Mitofusina-2 en el acoplamiento RE-mitocondria inducido por GLP-1	36
5.3.1.	Acoplamiento físico entre RE y mitocondria.....	36
5.3.2.	Acoplamiento funcional entre RE y mitocondria.....	38
6.	DISCUSIÓN	40
6.1.	Modulación del acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias por GLP-1 .	40
6.1.1.	Acercamiento físico entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1.....	41
6.1.2.	Efecto de la pre-incubación con GLP-1 en el traspaso de Ca ²⁺ desde el RE a la mitocondria	43
6.2.	Participación de PKA en el acoplamiento entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1	44
6.3.	Efecto de GLP-1 sobre Mitofusina-2 y rol de PKA	46
6.4.	Rol de GLP-1 en complicaciones vasculares en pacientes diabéticos.....	48
7.	PERSPECTIVAS	49
8.	CONCLUSIONES	51
9.	REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos pancreáticos y extra-pancreáticos de GLP-1.....	10
Figura 2. Vías de transducción de señales activadas por GLP-1 en distintos tipos celulares.....	11
Figura 3. Estructuración del acoplamiento entre retículo endoplásmico y mitocondrias y traspaso de Ca^{2+}	16
Figura 4. Medición de Ca^{2+} mitocondrial.	25
Figura 5. Cuantificación de la colocalización mediante coeficientes de Manders y análisis radial.....	27
Figura 6. Modulación de la colocalización entre RE y mitocondrias por GLP-1.....	31
Figura 7. Efecto de la pre-incubación con GLP-1 en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina.....	33
Figura 8. Niveles de Mitofusina-2 en respuesta a GLP-1 y participación de PKA.....	35
Figura 9. Rol de PKA en la modulación de la colocalización entre RE y mitocondrias inducida por GLP-1.....	37
Figura 10. Participación de PKA en el efecto de la pre-incubación con GLP-1 en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina.....	39
Figura 11. Modelo propuesto para la acción de GLP-1 sobre el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias en VSMC.	50

ABREVIATURAS

µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µM	: Micromolar
µm	: Micrómetro
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AKAP	: Proteína de anclaje para kinasa A
Akt/PKB	: Proteína-kinasa Akt o proteína kinasa B
AMPc	: Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	: Análisis de la varianza
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: ARN mensajero
ATP	: Adenosín trifosfato
ATPasa	: Adenosín trifosfatasa
BSA	: Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺	: Ión calcio
CCCP	: Carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona
CREB	: Proteína que se une a elementos de respuesta dependiente de AMPc
DME	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
Epac	: Proteína de intercambio activada por AMPc
ERK	: Kinasa regulada por señales extracelulares
Ex4	: Exendin-4
FBS	: Suero fetal bovino
GIP	: Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	: Péptido similar al glucagón tipo 1
GLP-1R	: Receptor de GLP-1
GLUT	: Transportador de glucosa
Gs	: Proteína G estimuladora
GTP	: Guanosín trifosfato
GTPasa	: Guanosín trifosfatasa
h	: Horas
IP ₃	: Inositol-1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	: Receptor de IP ₃
K _{ATP}	: Canal de potasio dependiente de ATP
kDa	: Kilo Dalton

MAM	: Membrana asociada a mitocondrias
MCU	: Uniporter de calcio mitocondrial
Mfn-2	: Mitofusina-2
Min	: Minutos
MTO	: MitoTracker Orange
nM	: Nanomolar
nm	: Nanómetro
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAH	: Hipertensión arterial pulmonar
PBS	: Tampón de fosfato salino
p-CREB	: Factor transcripcional CREB fosforilado en Serina ¹³³
PI-3K	: Fosfatidilinositol- 3 kinasa
PKA	: Proteína kinasa dependiente de AMPc
pM	: Picomolar
pmol	: Picomol
PSF	: Función de difusión puntual
RE	: Retículo endoplásmico
RyR	: Receptor de Ryanodina
s	: Segundos
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SEM	: Error estándar de la media
Ser	: Serina
SERCA	: Calcio-ATPasa del retículo sarco-endoplasmático
SMC	: Células de músculo liso
TBS	: Tampón de Tris salino
Tyr	: Tirosina
VDAC	: Canal de aniones dependiente de voltaje
VSMC	: Células de la musculatura lisa vascular
β- tub	: β-tubulina
Δψ	: Potencial mitocondrial

RESUMEN

La hormona GLP-1 es una reguladora importante de la homeostasis de la glucosa, favoreciendo su metabolismo en varios tejidos a través de la activación de la vía del AMP cíclico-proteína kinasa A. En las células de músculo liso vascular (VSMC), el control del metabolismo de la glucosa es esencial para la mantención de la función y el fenotipo celular, ya que al favorecer su oxidación en las mitocondrias, se previene la aparición de un fenotipo desdiferenciado, característico de patologías cardiovasculares. Un mecanismo que promueve la actividad mitocondrial es su acoplamiento con el retículo endoplásmico (RE), pues se favorece el traspaso de metabolitos y Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Estructuralmente, el acoplamiento entre ambos organelos depende de Mitofusina-2 (Mfn-2). Existe evidencia de que una disminución en el acoplamiento entre RE y mitocondrias en VSMC conduce a la aparición de un fenotipo proliferativo, mientras que el uso de GLP-1 previene el desarrollo de este fenotipo. Además, datos de nuestro grupo de trabajo sugieren que esta hormona potencia la actividad mitocondrial. Basados en estos antecedentes, quisimos estudiar si GLP-1 era capaz de promover el acoplamiento entre RE y mitocondrias en la línea celular vascular A7r5, y evaluar el posible rol de PKA y de Mfn-2 en el fenómeno.

A través de inmunofluorescencia indirecta con marcación de RE y mitocondrias, se observó un aumento en la colocalización entre ambos organelos en células estimuladas con GLP-1 (100 nM, 3 h). Además, mediante el uso de la sonda fluorescente Rhod-FF, sensible a Ca^{2+} mitocondrial, se determinó que la pre-incubación de estas células con GLP-1 favorecía la entrada de Ca^{2+} reticular a la mitocondria. En forma paralela, se determinó que el tratamiento por 3 h con GLP-1 aumentó los niveles de Mfn-2, efecto que se perdió cuando las células se pre-incubaron con el inhibidor de PKA, H-89. Finalmente, se determinó que el incremento en la colocalización entre RE y mitocondrias y el aumento en la entrada de Ca^{2+} reticular a las mitocondrias en respuesta al tratamiento con GLP-1, se inhibían en células pre-tratadas con H-89. Así, concluimos que la incretina GLP-1 promueve el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias en células de la musculatura lisa vascular, a través de un mecanismo que requiere de la activación de PKA, y presumiblemente, del aumento de la proteína Mfn-2.

SUMMARY

Effects of incretin GLP-1 on endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in vascular smooth muscle cells: role of PKA and Mitofusin-2.

The hormone GLP-1 is an important regulator of glucose homeostasis that promotes its metabolism on several tissues through a cyclic AMP-protein kinase A pathway. In vascular smooth muscle cells (VSMC) glucose metabolism is involved in the control of both cellular function and phenotype, given that promoting its oxidation in the mitochondria prevents the appearance of VSMC undifferentiated phenotype, a hallmark of cardiovascular pathologies. Mitochondrial activity is activated by their coupling with the endoplasmic reticulum (ER), which enhances metabolite and Ca^{2+} transfer from the ER to the mitochondria. Structurally, the coupling between these organelles depends on Mitofusin-2 (Mfn-2). A decrease on ER-mitochondria coupling in VSMC leads to a proliferative phenotype, while GLP-1 treatment prevents its appearance. Besides, data from our work group suggests that this hormone enhances mitochondrial activity. Based on this background, we evaluated whether GLP-1 modulated functional coupling between ER and mitochondria in the vascular cell line A7r5, and the involvement of PKA and Mfn-2 on this phenomenon.

Immunofluorescence analysis of ER and mitochondria stained cells revealed that GLP-1 (3 h, 100 nM) treatment increased colocalization of these two organelles. Furthermore, by using the mitochondrial Ca^{2+} sensitive fluorescence probe, Rhod-FF, we determined that pre-incubation of these cells with GLP-1 enhanced reticular Ca^{2+} entry into the mitochondria. Moreover, the treatment with GLP-1 by 3 h increased Mfn-2 levels, an effect that was prevented by the pre-incubation with the PKA inhibitor, H-89. Finally, the increment of ER and mitochondria colocalization and the increase on reticular Ca^{2+} entry into the mitochondria in response to GLP-1 stimulation were both abolished in H-89 pre-treated cells. Therefore, we concluded that the hormone GLP-1 promotes ER and mitochondria coupling in VSMC, through a mechanism that requires PKA activation, and presumably, an increment of Mfn-2 levels.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La incretina GLP-1

1.1.1. Generalidades sobre las hormonas incretinas

El control de los niveles de glucosa en la sangre es una tarea fundamental para la sobrevivencia de un individuo. Si bien es cierto, la hormona insulina es la principal reguladora de los niveles de glucosa en la sangre, desde los años 60' se sabe que no sólo el páncreas es el responsable de normalizar la glicemia después de la ingesta de alimentos. Se ha determinado que una dosis de glucosa ingerida de forma oral en individuos sanos induce un aumento en la insulina sanguínea mayor que el provocado por una dosis equivalente administrada de forma intravenosa (**Elrick et al., 1964; Perley et al., 1967**). Estas observaciones sugerían que el tracto digestivo estaba involucrado en la liberación de insulina inducida por glucosa, afirmación que quedó comprobada al identificarse nuevas hormonas procedentes del intestino, capaces de controlar la secreción de insulina desde el páncreas (**Holst et al., 1987; Mojsov et al., 1987**). Dichas hormonas corresponden al polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1), y estimulan la liberación de insulina en respuesta a glucosa tanto en modelos *in vitro* (**Mojsov et al., 1987**) como *in vivo* (**Kreymann et al., 1987**). Ambas hormonas, conocidas como incretinas (intestine secretion insulin), componen el eje entero-insular, y tienen variadas funciones en el organismo, no sólo relacionadas con el control de la glicemia (**Ranganath, 2008**).

1.1.2. Función de GLP-1 y control del metabolismo

GLP-1 no sólo favorece la liberación de insulina en respuesta a la ingesta de alimento (**Kreymann et al., 1987; Mojsov et al., 1987**), sino que puede modular la función de otros órganos (**Figura 1**). Esta hormona controla la ingesta de alimentos a nivel del sistema nervioso central (**Turton et al., 1996**), previene el daño cardíaco en respuesta a infarto (**Bose et al., 2005; Liu et al., 2010**), favorece la vaso-dilatación (**Nyström et al., 2005; Green et al., 2008**), entre otras funciones.

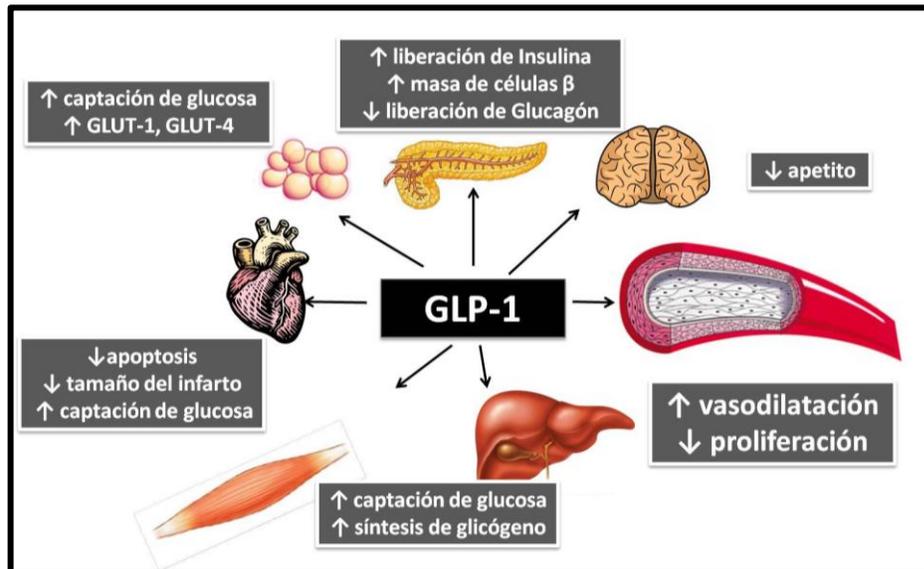


Figura 1. Efectos pancreáticos y extra-pancreáticos de GLP-1.

Se muestran los diversos efectos que tiene la incretina GLP-1, que incluyen las respuestas metabólicas y fenotípicas en páncreas, sistema nervioso central, musculatura lisa vascular, hígado, músculo esquelético, corazón y adipocitos.

A nivel metabólico, GLP-1 es capaz de controlar la utilización de glucosa en diversos tejidos. En músculo esquelético, promueve la entrada de glucosa y su posterior incorporación a cadenas de glicógeno (**González et al., 2005; Alcántara et al., 1997; Luque et al., 2002**), además de estimular su oxidación en la mitocondria y utilización (**Alcántara et al., 1997; Luque et al., 2002**). En células adiposas, aumenta la captación de glucosa (**Sancho et al., 2005**), y favorece la síntesis de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 (**Egan et al., 1997**). De forma similar, GLP-1 favorece la captación de glucosa en corazones sometidos a una pequeña isquemia, presumiblemente gracias a un aumento en la traslocación de GLUT1 (**Ban et al., 2008; Zhao et al., 2006**).

1.1.3. GLP-1 y su sistema de transducción de señales

El receptor de GLP-1 (GLP-1R) es una proteína de 463 aminoácidos, de 7 dominios transmembrana, perteneciente a la familia de receptores acoplados a

proteína G (Thorens, 1992). Se ha encontrado en islotes pancreáticos (Xu et al., 1999) cardiomiocitos, células musculares de aorta mesentérica (Ban et al., 2008), pulmón y algunas zonas del cerebro (Kanse et al., 1988). La activación del GLP-1R por su ligando conlleva un aumento intracelular de AMP cíclico (AMPc) (Drucker et al., 1987; Thorens, 1992) activando a la proteína-quinasa dependiente de AMPc, PKA y a la proteína de intercambio activada por AMPc, Epac (Holz, 2004; Yu et al., 2010). La activación de estas vías por GLP-1 se han descrito en páncreas (Drucker et al., 1987; Thorens, 1992), en cardiomiocitos (Ban et al., 2008; Vila et al., 2001) y en hepatocitos (Ben-Shlomo et al., 2010). Sin embargo, GLP-1R no está acoplado al sistema proteína Gs/adenilato ciclasa/AMPc en músculo esquelético, ya que GLP-1 o Exendin 4 (Ex4, un péptido mimético de GLP-1) no aumentan los niveles de AMPc (Alcántara et al., 1997; Delgado et al., 1995; Luque et al., 2002) sino que activan la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K), las quinasas reguladas por estímulos extracelulares (fosfo-ERK-1/2) y la proteína quinasa B (Akt/PKB) (Acitores et al., 2004; González et al., 2005). Así, pareciera ser que la señalización de GLP-1 es tejido específica (Figura 2)

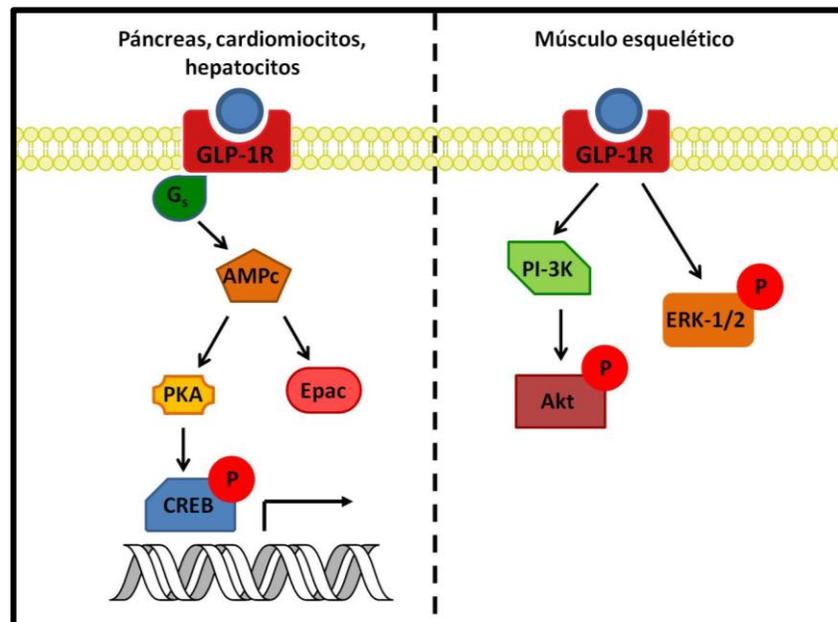


Figura 2. Vías de transducción de señales activadas por GLP-1 en distintos tipos celulares.

1.2. Musculatura lisa vascular

1.2.1. Generalidades sobre el músculo liso vascular

Las células de la musculatura lisa vascular (VSMC) son las principales componentes de la capa media arterial. Su principal función es la contracción de los vasos sanguíneos, regulando el flujo y la presión arterial. Además, secretan distintas proteínas de la matriz extracelular, lo que proporciona sostén para el resto de las células que componen el vaso sanguíneo **(Cecchetti et al., 2011; Murphy, 1989; Rzuicidlo et al., 2007)**. Las VSMC tienen una alta plasticidad fenotípica, pudiendo oscilar entre un estado diferenciado de función contráctil, y un fenotipo desdiferenciado, altamente proliferativo y de aumentada capacidad secretora **(Cecchetti et al., 2011; Owens et al., 2004; Rzuicidlo et al., 2007)**. Este cambio fenotípico se ha asociado altamente a la aparición y progresión de diversas enfermedades vasculares, tales como aterosclerosis e hipertensión **(Doran et al., 2008; Owens et al., 2004; Rudijanto, 2007)**.

El principal sustrato metabólico en VSMC es glucosa, la que es destinada mayoritariamente a la ruta glicolítica. Sin embargo, aún en condiciones basales y de oxigenación adecuada, la glucosa no termina su oxidación completa en la mitocondria, ya que cerca del 90% del flujo a través de esta vía termina en lactato, en un proceso generalmente llamado "glicólisis aerobia" **(Butler et al., 1985; Paul, 1983)**. Se ha observado una correlación directa entre la fuerza ejercida durante la contracción muscular y el consumo de oxígeno, por lo que el metabolismo oxidativo a cargo de las mitocondrias se ha relacionado principalmente con la función contráctil de las VSMC **(Paul et al., 1975; Peterson et al., 1974)**.

1.2.2. Rol metabólico de las mitocondrias en VSMC

La función metabólica de las mitocondrias es clave para mantener el fenotipo de las VSMC. Se ha visto que favorecer la oxidación mitocondrial de la glucosa previene la aparición de hipertensión arterial pulmonar (PAH), una patología caracterizada por una alta tasa de proliferación celular **(Sutendra et al., 2010)**. El remodelado vascular o

la proliferación de las SMC de arteria pulmonar tampoco se observa cuando se activa a la enzima piruvato deshidrogenasa (enzima que permite la conversión de piruvato a acetil-CoA), por lo que pareciera que un aumento en la razón oxidación mitocondrial de la glucosa / glicólisis puede ser responsable de esta protección **(Sutendra et al., 2010)**. Además, cuando se desarrolla PAH en ratones, la actividad de la piruvato deshidrogenasa, el contenido de α -cetoglutarato (un intermediario del ciclo de Krebs) y los niveles basales de Ca^{2+} en la mitocondria se encuentran disminuidos, lo que estaría reflejando un mal funcionamiento del organelo **(Sutendra et al., 2011)**. De forma inversa, cuando se favorece excesivamente el metabolismo citosólico de la glucosa (aumento en la tasa glicolítica, activación de la vía de las pentosas o la vía de los polioles) por sobre su oxidación mitocondrial, se promueve la proliferación celular y se aumenta la resistencia a estímulos apoptóticos, conduciendo a la aparición de diversas patologías **(Chiong et al., 2012)**. Parece claro entonces, que el control del metabolismo oxidativo de la glucosa a través de la regulación de la actividad mitocondrial en este tipo celular, repercute enormemente en su fenotipo celular, y por lo tanto, en la función vascular.

1.3. Acoplamiento entre retículo endoplásmico y mitocondrias

1.3.1. Función mitocondrial y su regulación por Ca^{2+}

Las mitocondrias son importantes reguladores del metabolismo celular en diversos tipos celulares, ya que contienen la maquinaria enzimática necesaria para realizar el acoplamiento entre el potencial electroquímico (o potencial mitocondrial, $\Delta\psi$) con la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa). Además de la síntesis de ATP, las mitocondrias se encargan de la β -oxidación de los ácidos grasos, participan en la gluconeogénesis, contiene todas las enzimas para el ciclo de Krebs y se relaciona íntimamente con el inicio de la vía intrínseca de la apoptosis **(Gvozdjǎková, 2008)**.

La eficiencia metabólica de las mitocondrias puede ser regulada por ciertos estímulos, con tal de suplir las necesidades energéticas de la célula. El Ca^{2+} regula de forma directa o indirecta la actividad de diversas deshidrogenasas que participan del ciclo de Krebs, favoreciendo la generación de poder reductor y por lo tanto, de ATP

(Denton et al., 1980; Jouaville et al., 1999; Gellerich et al., 2010). Sin embargo, una excesiva cantidad de Ca^{2+} en las mitocondrias genera efectos deletéreos para la célula, ya que favorece la liberación al citoplasma de factores pro-apoptóticos, como citocromo c o Smac/DIABLO, conduciendo a la muerte celular **(Rimessi et al., 2008)**.

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria ocurre a través del recientemente descrito uniporter de calcio mitocondrial (MCU), ubicado en la membrana interna mitocondrial **(Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011)**. Este canal presenta una constante de disociación para Ca^{2+} excepcionalmente baja, cercana a los 2 nM, dando cuenta de su alta selectividad, además de una constante de activación elevada ($K_{0.5} = 19$ mM), por lo que permite el paso de grandes cantidades del ión **(Kirichok et al., 2004)**. Por otra parte, la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana externa es un proceso no tan específico, ya que ocurre a través del VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje) **(Rizzuto et al., 2009)**.

1.3.2. Comunicación entre retículo endoplásmico y mitocondrias

El reservorio intracelular más grande de Ca^{2+} es el retículo endoplásmico (RE). Junto con participar en la síntesis de proteínas y su correcto plegamiento, el RE controla los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} en distintos fenómenos, tales como excitotoxicidad, expresión génica, apoptosis y contracción muscular **(Berridge, 2002; Berridge et al., 2003; Wray et al., 2010)**. La salida de Ca^{2+} desde el lumen del RE hacia el citoplasma ocurre gracias a la activación del canal receptor de Ryanodina (RyR) y el receptor de inositol trifosfato (IP_3R), mientras que su recaptura se realiza a través de la bomba SERCA (calcio-ATPasa del retículo sarco-plasmático) **(Berridge et al., 2003; Wray et al., 2010)**.

Dadas las variadas funciones de este organelo, no es de extrañar que participe coordinadamente con otros organelos en la modulación de la función celular. De hecho, desde la década de los 60's se sabe que la interacción física y funcional del RE con las mitocondrias permite el eficiente traspaso de metabolitos y Ca^{2+} entre ellos **(Figura 3)**. Esta comunicación es un fenómeno altamente dinámico y heterogéneo al interior de la células, y es fundamental para la supervivencia celular, el

control del metabolismo energético y la síntesis de lípidos (**Hayashi et al., 2009; Cárdenas et al., 2010; Rowland et al., 2012**). Además, este contacto no es un proceso azaroso ni aleatorio, ya que una gran cantidad de proteínas, tales como VDAC, IP₃R y Mitofusina-2, entre otras, participan en esta interacción física (**Hayashi et al., 2009; Pizzo et al., 2007**).

1.3.3. Participación del acoplamiento RE-mitocondria en el traspaso de Ca²⁺

El alto valor de la constante de activación del MCU permite inferir que la entrada de Ca²⁺ hacia la mitocondria requiere de altas concentraciones citoplasmáticas del ión. Aún cuando diversos estímulos aumentan el Ca²⁺ citoplasmático, los niveles que se alcanzan no son lo suficientemente elevados para que el Ca²⁺ pueda difundir hacia la mitocondria (**Collins et al., 2001; Rizzuto et al., 1993**), por lo que es necesario un mecanismo especial que favorezca la entrada de Ca²⁺ al organelo. La respuesta a esta dicotomía parece ser la cercanía entre el IP₃R del RE con las mitocondrias (**Csordás et al., 1999; Rizzuto et al., 1998, 1993**). Cuando se libera Ca²⁺ a través del IP₃R, la concentración de este ión en las cercanías del canal aumenta cerca de un orden de magnitud más que la concentración de Ca²⁺ alcanzada en el citoplasma completo, generando micro-dominios de alta concentración de Ca²⁺. Así, la ubicación estratégica de mitocondrias en la vecindad de estos sitios de liberación permite que se alcancen los niveles de Ca²⁺ necesarios para que éste pueda entrar a la mitocondria (**Csordás et al., 1999; Rizzuto et al., 1998, 1993**). Además, se ha observado que el IP₃R es capaz de formar un complejo multiproteico con VDAC en zonas de alto contacto entre RE y mitocondrias (conocidas como MAM, membranas asociadas a mitocondrias), lo que puede explicar el eficiente traspaso de Ca²⁺ desde este canal hacia las mitocondrias (**Szabadkai et al., 2006**).

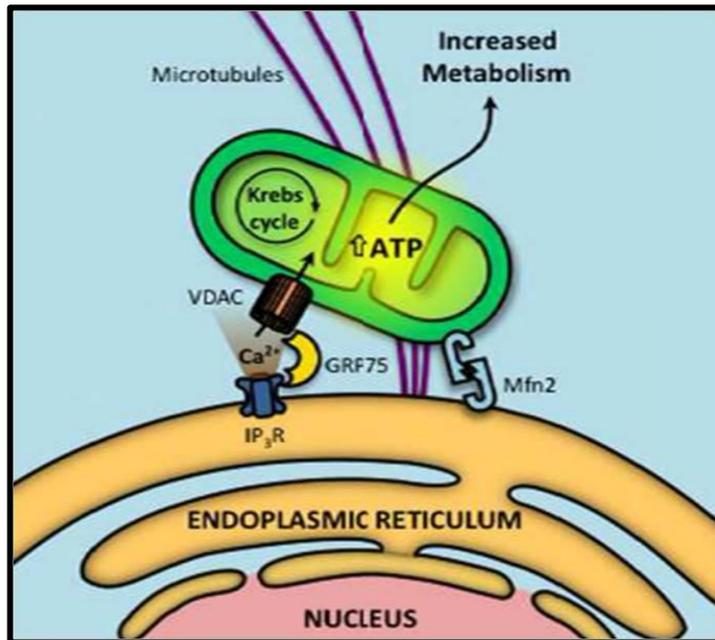


Figura 3. Estructuración del acoplamiento entre retículo endoplásmico y mitocondrias y traspaso de Ca^{2+} .

La interacción entre RE y mitocondrias permite el eficiente traspaso de Ca^{2+} desde el RE hacia las mitocondrias. Este acoplamiento funcional está mediado por el receptor de inositol trifosfato (IP_3R), por el canal de aniones dependiente de voltaje mitocondrial (VDAC) y por Mitofusina-2 (Mfn-2), entre otras. Adaptado de **(Bravo et al., 2011)**.

1.3.4. Rol de Mitofusina-2

Mitofusina-2 (Mfn-2) (Entrez Gene: *MFN2*, *Homo sapiens*) es una proteína de la membrana externa mitocondrial de 84 kDa cuyo extremo N-terminal posee un dominio GTPasa, mientras que en el C-terminal posee dominio transmembrana, con ambos extremos hacia el citosol **(Chan, 2006; Rojo et al., 2002)**. Su función primaria es ser parte de la maquinaria proteica necesaria para la fusión mitocondrial **(Chen et al., 2003; Santel et al., 2000)**. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que Mfn-2 no sólo se encuentra en la membrana externa mitocondrial, sino que también en el RE, específicamente en zonas de alta yuxtaposición con mitocondrias **(García-Pérez et al., 2011; de Brito et al., 2008)**. La delección de *Mfn2* induce, junto con la esperada fragmentación mitocondrial, un alto grado de desorganización de la red reticular y una disminución en la colocalización entre RE y mitocondria, la que se recupera al

re-expresar una Mfn-2 dirigida a RE **(de Brito et al., 2008)**. Además, la captación de Ca^{+2} en las mitocondrias de células *Mfn2^{-/-}* se ve disminuida en respuesta a agentes inductores de liberación de Ca^{+2} desde el RE, confirmando que el acoplamiento no sólo físico sino funcional entre ambos organelos es dependiente de esta proteína **(de Brito et al., 2008)**. El acoplamiento con el RE mediante Mfn-2 también controla la actividad mitocondrial, ya que parámetros del metabolismo mitocondrial, como el consumo de oxígeno o el potencial mitocondrial disminuyen por la delección de Mfn-2 **(Bravo et al., 2011; Chen et al., 2012)**. En VSMC, se ha reportado que forskolina, una molécula que promueve la formación de AMPc, aumenta los niveles de Mfn-2 **(X. Guo et al., 2007)**. Este antecedente sugiere un posible rol de AMPc y PKA en la regulación de la expresión de esta proteína.

1.4. GLP-1, actividad mitocondrial y musculatura lisa vascular

1.4.1. Efectos de GLP-1 sobre la vasculatura

Existen pocos reportes sobre el efecto que tiene GLP-1 sobre el tejido vascular. Se ha descrito que GLP-1 induce vasodilatación en forma independiente del endotelio, sugiriendo que GLP-1 tiene acción directa sobre las VSMC **(Nyström et al., 2005)**. Además, este efecto vasodilatador es mediado por el canal de potasio sensible a ATP, K_{ATP} , y es dependiente de la generación de AMPc **(Green et al., 2008)**.

El remodelado vascular también se ve afectado por GLP-1 o sus análogos. Por ejemplo, el pre-tratamiento con Ex4 previene la formación de la capa neo-íntima vascular en respuesta a daño endotelial **(Goto et al., 2011)**. Además, la proliferación de las VSMC en respuesta a estímulos mitogénicos se ve disminuida en células tratadas con Ex4 **(Goto et al., 2011)**. Por otra parte, en ratones con tendencia a desarrollar aterosclerosis (*Apoe^{-/-}*), se observó que la infusión continua de GLP-1 por 4 semanas previno la aparición de lesiones ateroscleróticas y la infiltración de macrófagos a tejido aórtico, junto con disminuir el contenido de ácidos grasos no esterificados en la sangre. Además, la pre-incubación con GLP-1 previno la proliferación de SMC humanas **(Nagashima et al., 2011)**. Estos antecedentes indican que GLP-1 tiene efectos a nivel vascular, ya que es capaz de regular su fenotipo. Sin

embargo, se desconoce cuáles pueden ser los efectos metabólicos de la hormona sobre este tejido, ni que mecanismos pueden estar involucrados en su función.

1.4.2. Regulación de la actividad mitocondrial por GLP-1 y acoplamiento RE-mitocondria en la vasculatura

Hasta donde sabemos, no existen antecedentes publicados de los posibles efectos de GLP-1 sobre la actividad mitocondrial. Resultados de nuestro grupo de trabajo muestran que, efectivamente, GLP-1 modula la función mitocondrial en la línea de músculo liso vascular A7r5. Hemos observado que la estimulación con GLP-1 induce un aumento en el consumo de oxígeno y en el potencial mitocondrial, ambos parámetros relacionados con una mayor actividad de este organelo (**Torres G, datos no publicados**). Estos resultados nos permiten sugerir que GLP-1 regula el metabolismo mitocondrial en esta línea de células vasculares.

Por otra parte, se ha reportado que el aumento en la distancia entre RE y mitocondrias repercute en el metabolismo y en el fenotipo celular de las VSMC (**Sutendra et al., 2011**). Como es de esperar, este fenómeno se asoció a una disminución en la actividad de enzimas mitocondriales (**Sutendra et al., 2011**). Esto permite inferir que el acoplamiento entre RE y mitocondrias repercute sobre la función mitocondrial en VSMC, y que a su vez, esto modula su fenotipo.

1.5. Resumen de antecedentes claves

La incretina GLP-1 es un importante regulador del metabolismo celular en diversos tejidos, principalmente del metabolismo de la glucosa. El control metabólico de la glucosa tiene vital relevancia en el músculo liso vascular, ya que una disminución de su metabolismo mitocondrial o un incremento en su metabolismo citoplasmático induce un fenotipo proliferativo, característico en distintos estados patológicos (**Chiong et al., 2012**). Aunque se ha descrito que GLP-1 previene la aparición de un fenotipo proliferativo en VSMC, no se han descrito efectos metabólicos de la hormona sobre este tipo celular (**Goto et al., 2011; Nagashima et al., 2011**). Debido a la importancia del control de la actividad mitocondrial en el tejido vascular, nuestro grupo decidió

estudiar los efectos de GLP-1 sobre el metabolismo, y observamos que, en efecto, esta hormona favorece el metabolismo mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo de esta modulación no ha sido estudiado **(Torres G, datos no publicados)**. La función mitocondrial puede ser regulada por el acoplamiento funcional entre este organelo y el RE, ya que el traspaso de Ca^{2+} reticular hacia la mitocondria activa el metabolismo en este organelo **(Hayashi et al., 2009; Cárdenas et al., 2010; Rowland et al., 2012)**. Molecularmente, este acoplamiento es dependiente de la GTPasa Mfn-2 **(de Brito et al., 2008)**, una proteína inducida por forskolina **(X. Guo et al., 2007)**. Se ha reportado que el aumento en la distancia entre RE y mitocondrias en VSMC, y por lo tanto, una disminución en la actividad mitocondrial, induce un fenotipo proliferativo y de alta resistencia a estímulos apoptóticos. Esto sugiere que el control del acoplamiento entre RE y mitocondrias es importante para el control del fenotipo en este tipo celular **(Sutendra et al., 2011)**.

Estos antecedentes nos permiten preguntarnos si GLP-1 tiene algún efecto sobre el acoplamiento entre RE y mitocondrias en VSMC. Además, ¿es capaz GLP-1 de modular los niveles de Mfn-2? Dado que los niveles de Mfn-2 aumentan en respuesta a forskolina, ¿existe alguna relación entre PKA y Mfn-2? Y si este fuera el caso, ¿qué rol cumple PKA y Mfn-2 sobre el acoplamiento entre RE y mitocondrias?

2. HIPÓTESIS

“GLP-1 promueve el acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias en células de músculo liso vascular por un mecanismo dependiente de PKA y de Mitofusina-2”

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Establecer si GLP-1 induce el acoplamiento entre retículo endoplásmico y mitocondrias en la línea celular de músculo liso vascular A7r5, y si este proceso depende de PKA y Mitofusina-2.

3.2. Objetivos específicos

- Establecer si GLP-1 favorece el acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias en la línea celular A7r5.
- Determinar si GLP-1 aumenta la masa de Mitofusina-2 y si esto depende de la activación de PKA.
- Determinar si el eventual acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias inducido por GLP-1 es dependiente de la actividad de PKA y de Mitofusina-2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU): medio Eagle modificado de Dulbecco (DME), gelatina, tritón X-100, carboxi-cianuro-3-clorofenilhidrazona (CCCP), tripsina-EDTA 1X, anticuerpo anti β -tubulina (cat. T0198), dodecilsulfato de sodio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, glicina, glucosa y Tris base (tris(hidroximetil)aminometano). En American Peptide Company (Sunnyvale, CA, EEUU) se compró (Ser8)-GLP 1 (7-36) amida humana (cat. 46-1-05). El cocktail inhibidor de proteasas cOmplete Mini (11 836 170 001) y el cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP (04 906 837 001) se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). Los anticuerpos secundarios anti inmunoglobulina G (IgG) de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, Ca, EEUU) junto con el dihidrocloruro de H-89 (cat. 371963). En Cell Signalling (Danvers, MA, EEUU) se obtuvieron los anticuerpos anti CREB (86B10, cat. 9104) y anti CREB fosforilado (Ser¹³³, cat. 9191). De Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU) se obtuvo el suero fetal bovino (FBS). El anticuerpo anti Mfn-2 (ab50838) se adquirió en Abcam (Cambridge, MA, EEUU). El anticuerpo secundario Alexa anti ratón (A-11029), la sonda Mito Tracker Orange CMTMRos (cat. M7510) y la sonda Rhod-FF AM (cat. R23983) se compraron en Molecular Probes-Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). El anticuerpo anti KDEL (ADI-SPA-827) se compró en Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EEUU). El reactivo quimioluminiscente para Western Blot EZ-ECL (20-500-1000) se adquirió en Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, CA, EEUU). La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile). Todos los otros compuestos orgánicos e inorgánicos, sales, ácidos y solventes se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

4.2. Modelo de estudio y cultivo celular

Para la realización de este proyecto, se empleó la línea celular A7r5, derivada de músculo liso de aorta torácica de rata (ATCC CRL-1444). Esta línea se cultivó en medio de cultivo DME de alta glucosa (glucosa 25 mM, piruvato 1 mM, bicarbonato al 0,15%, pH 7,2) suplementado con FBS al 10%. Las células se mantuvieron en incubadores termorregulados a 37°C, en una atmósfera de aire humidificada con 5% de dióxido de carbono y 95% de aire.

4.3. Estimulación con GLP-1

Para la estimulación con GLP-1, las células se privaron de suero 24 h antes de cada experimento. Minutos antes de comenzar un experimento, el medio de cultivo se reemplazó con medio fresco, previamente ambientado a 37°C en un baño termorregulado. En todos los experimentos se utilizó una concentración final de GLP-1 de 100 nM. El inhibidor de PKA, H-89 (10 µM), se agregó 30 min antes de comenzar la estimulación con GLP-1 y se mantuvo en el medio de cultivo durante todo el experimento.

4.4. Preparación de extractos celulares totales

Las células se sembraron en placas de 60 mm a una confluencia del 80-90%. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron tres veces con solución de amortiguador fosfato salino PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) fría y luego se lisaron con 50 µL de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente el extracto se desnaturó a 100°C por 5 min en amortiguador SDS-PAGE 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% v/v; 2 mercaptoetanol 20%; SDS

9,2%; azul de bromofenol 0,02%), para ser almacenado a -20°C hasta su uso posterior.

4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron alrededor de 30 μg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3% y el separador al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 110 V hasta el final de la corrida electroforética. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45 μm a amperaje constante de 400 mA por 90 min en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %).

4.6. Western blot

Posterior a la electrotransferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo (TBS 1x (Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 2 mM); Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron toda la noche, con agitación suave, con el anticuerpo primario correspondiente en la siguiente dilución: anti CREB fosforilado (conejo), anti CREB (ratón) y anti Mfn-2 (conejo), dilución 1:1.000; anti β -tubulina (ratón), dilución 1:5.000, todos en solución de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5% p/v). Luego, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón, según corresponda, conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en solución de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se expusieron en una película de

fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron mediante el programa computacional Image J. Para la obtención del blot de CREB total, las membranas ya utilizadas en la obtención de CREB fosforilado se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2% p/v, TCA 30% p/v, ácido sulfosalicílico 30% p/v) para desprender los anticuerpos y posteriormente, se incubaron y se trataron con el anticuerpo anti CREB, tal como se hizo en los otros casos.

4.7. Medición de los niveles mitocondriales de Ca²⁺

Las células A7r5 se sembraron en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de 25 mm cubiertos con gelatina al 2% p/v y se crecieron hasta un 60-70% de confluencia. El protocolo utilizado se resume en la **Figura 4**. Las células se privaron de suero por 24 h y luego se estimularon con GLP-1 100 nM por 0-3 h. Posteriormente, se lavaron con medio Krebs (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 g/mL glucosa) y se pre-incubaron durante 30 min con la sonda fluorescente RhodFF (5,4 μM) para medir Ca²⁺ mitocondrial. Luego, las células se lavaron y los cubreobjetos se montaron en un microscopio confocal invertido (Carl Zeiss Axiovert 135 M LSM Microsystems). Las imágenes fluorescentes se colectaron cada 0,985 s. En cada medición se dejaron las células sin estimular durante los primeros 100 s para determinar los niveles basales de Ca²⁺ mitocondrial. Pasado este tiempo, se les agregó un pulso de histamina 100 mM y se capturaron las imágenes durante los 250 s siguientes. Finalmente, se agregó CCCP 50 μM, a modo de control de la técnica. Para cada secuencia de imágenes obtenida, se determinaron los niveles de fluorescencia en regiones de interés (ROI) de células individuales. Los valores se expresaron como F/F₀, donde F corresponde a la fluorescencia en cada segundo y F₀ al promedio de la fluorescencia durante los primeros 100 s. La determinación de la velocidad de entrada se realizó mediante una regresión lineal de la curva F/F₀ vs tiempo, en los primeros 10 s post-estimulación con histamina. El área bajo la curva consideró valores de fluorescencia por sobre el nivel basal, sólo durante el tiempo de la estimulación con histamina (100-350 s). Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ (NIH Image).

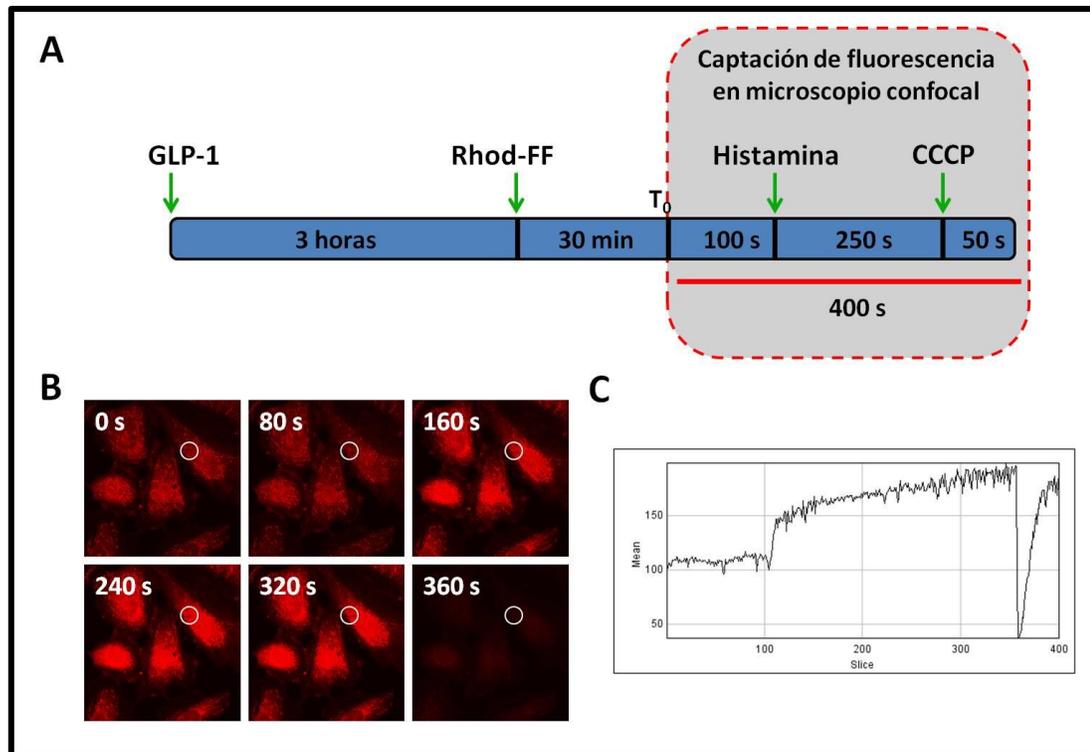


Figura 4. Medición de Ca^{2+} mitocondrial.

(A) Células A7r5 se estimularon por 3 h con GLP-1 100 nM, y luego se incubaron con la sonda sensible a Ca^{2+} mitocondrial, Rhod-FF, por 30 min. Posteriormente, el cubreobjetos se montó en un microscopio confocal invertido y se procedió a la captación de la fluorescencia. Se capturaron imágenes de la fluorescencia basal por 100 s, luego en respuesta a histamina por 250 s y finalmente, a CCCP por 50 s. **(B)** Imágenes representativas de células A7r5 cargadas con Rhod-FF sometidas a los estímulos indicados en A, visualizadas mediante microscopía confocal. Se indica el momento del cual se obtiene la imagen. **(C)** Gráfico de la fluorescencia versus tiempo del área indicada en las imágenes de B, sin procesar.

4.8. Inmunofluorescencia indirecta

Las células A7r5 se sembraron en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina al 2% p/v, y se crecieron hasta un 70% de confluencia. Posterior a la privación de suero por 24 h, se estimularon con GLP-1 100 nM por 0 – 3 h. Para marcar la red mitocondrial, 30 min antes de finalizado el

estímulo, a todos los pocillos se les agregó MitoTracker Orange (MTO, 400 nM). Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% p/v en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% v/v en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% p/v en PBS (filtrado) durante 1 h. Luego, las células se incubaron con anticuerpo anti KDEL (ratón, dilución 1:500) en PBS-BSA 1% p/v durante toda la noche a 4°C, para marcar el RE. Se lavaron nuevamente con PBS y luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón Alexa 488 (dilución 1:500). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje. Una vez montadas, las inmunofluorescencias se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (Carl Zeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania).

4.9. Análisis digital de imágenes

La cuantificación digital de la colocalización de las imágenes de inmunofluorescencia antes descritas, se realizó analizando los coeficientes de Manders para cada una de las señales fluorescentes en estudio y asociadas a dos canales (un canal para cada una de las señales, MTO y Alexa 488), con el programa Image J (**Manders et al., 1993**). Matemáticamente, los coeficientes de Manders son la proporción entre la señal de un canal que se encuentra colocalizada con la señal del otro canal en relación a la cantidad total de señal en ese canal. Dado que se utilizan dos canales para analizar la colocalización (canal rojo para la señal proveniente de MTO y canal verde para la señal obtenida desde el anticuerpo Alexa 488 anti ratón), se calcularon dos coeficientes de Manders, uno para cada canal (**Figura 5**).

Previo a este análisis, se realizó la eliminación de la fluorescencia fuera de foco usando el modelo teórico de algoritmo de deconvolución Landweber y la PSF (Point Spread Function) correspondiente para cada condición de lente objetivo del microscopio confocal y de fluorescencia utilizada. Además, mediante el uso de un programa generado en nuestro laboratorio, se pudo determinar la fluorescencia de

cada señal en distintas áreas celulares, con tal de cuantificar la colocalización entre mitocondrias y RE en cada una de ellas (**Bravo et al., 2011**).

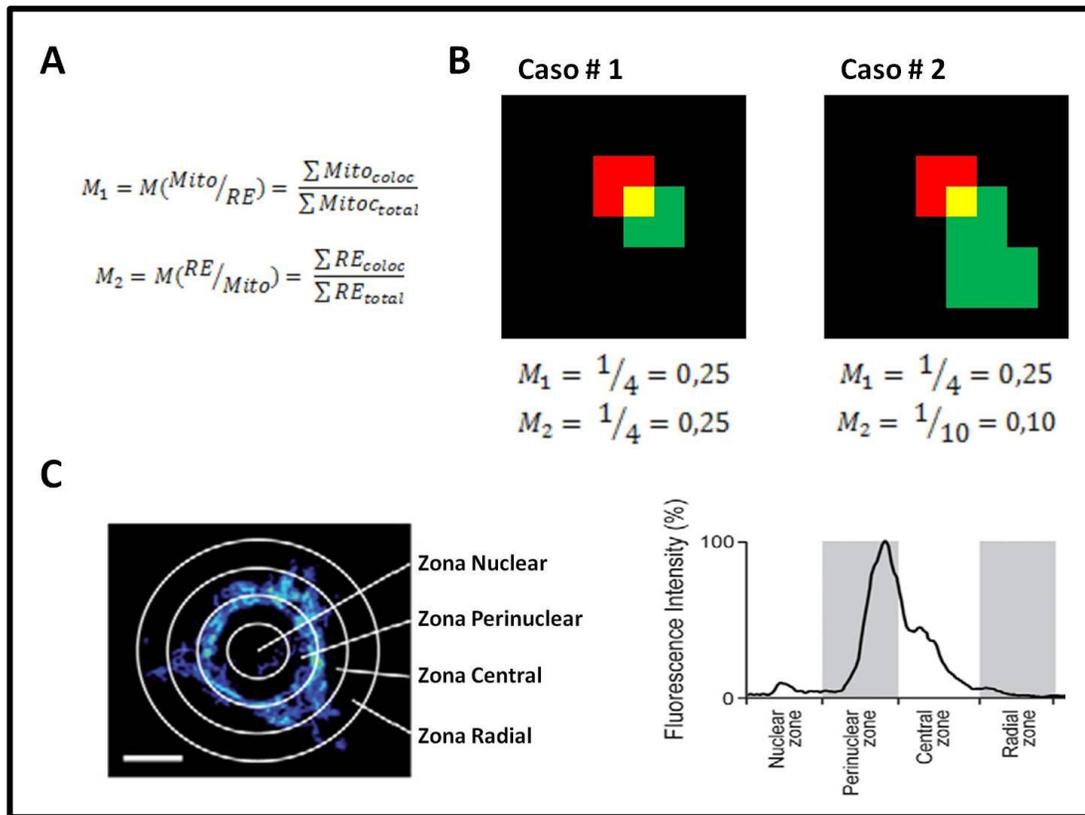


Figura 5. Cuantificación de la colocalización mediante coeficientes de Manders y análisis radial.

(A) Fórmulas matemáticas para la determinación del coeficiente de Manders para la señal mitocondrial sobre la reticular (M_1) y para la señal reticular sobre la mitocondria (M_2), donde *coloc* da cuenta de la cantidad de señal que colocaliza con la fluorescencia del otro canal, y *total* representa la cantidad total de la señal indicada. **(B)** Se muestra cómo puede variar el coeficiente de Manders de una de las señales frente a distintas situaciones, incluso cuando el área de colocalización se mantiene constante. **(C)** Mediante un programa computacional, se establecen regiones concéntricas que delimitan distintas área al interior de una célula. Posteriormente, se analiza la fluorescencia de cada señal (mitocondrial y de retículo endoplásmico) en cada una de las regiones delimitadas, lo que permite el cálculo del coeficiente de Manders en cada una de ellas. Adaptado de (**Bravo et al., 2011**).

4.10. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. En caso de que el experimento involucrara más de 2 condiciones de estudio, los datos se analizaron por ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Dunnet para determinar la significancia estadística de los resultados. De lo contrario, se analizaron mediante el test t de Student. Para los análisis de colocación por área celular, los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías, seguido del análisis de Bonferroni. En todos los casos, se consideró como valor significativo un $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Modulación del acoplamiento funcional entre retículo endoplásmico y mitocondrias por GLP-1

Como se ha mencionado, existe evidencia de que la comunicación entre RE y las mitocondrias es un proceso fundamental para diversas funciones celulares, especialmente para el control del metabolismo mitocondrial (**Cárdenas et al., 2010**). El acercamiento físico entre ambos organelos permite el paso de Ca^{2+} reticular hacia la mitocondria de forma más eficiente, favoreciendo el metabolismo oxidativo en este organelo. Este fenómeno es importante para la función del músculo liso vascular, ya que se ha visto que un aumento en el metabolismo mitocondrial en este tejido es capaz de prevenir el desarrollo de patologías asociadas a una alta tasa de proliferación (**Sutendra et al., 2010**). Más aún, se ha reportado que favorecer la comunicación entre RE y mitocondrias en este tipo celular es un posible mecanismo para generar esta “protección” (**Sutendra et al., 2011**). Dado que la incretina GLP-1 es capaz de promover el metabolismo mitocondrial (**Torres G, datos no publicados**) y se ha reportado en la literatura que, además, previene la proliferación en VSMC, decidimos evaluar si esta hormona es capaz de promover el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias.

5.1.1. Acercamiento físico entre RE y mitocondrias

Para determinar si GLP-1 favorecía el acoplamiento funcional entre mitocondrias y RE en la línea celular A7r5, utilizamos dos estrategias experimentales complementarias. Por una parte, decidimos evaluar el acercamiento físico entre RE y mitocondrias mediante inmunofluorescencia indirecta de células con la red mitocondrial y reticular marcadas por la sonda MitoTracker Orange y anticuerpo anti KDEL, respectivamente. En segundo lugar, analizamos la funcionalidad de este acercamiento mediante la determinación de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a la histamina, molécula capaz de favorecer la liberación de Ca^{2+} desde el RE. En ambos casos, estimulamos las células con GLP-1 100 nM por 0 – 3 h.

En la **Figura 6A** podemos observar imágenes representativas y los posteriores análisis (**Figura 6B** y **6C**) de células teñidas para observar la red mitocondrial y el RE, tanto en condiciones basales o luego de 3 h con GLP-1. A simple vista, parece ser que el RE no cambió su morfología en respuesta a GLP-1. Sin embargo, la red mitocondrial se observó más interconectada y fusionada, lo que se reflejó en la longitud y en la forma de las mitocondrias (más alargadas que las que se observan en la situación control). Además, cuando se realizó la superposición de ambas imágenes (señal de RE y de mitocondrias), se observó que en las células tratadas con GLP-1 apareció una gran cantidad de señal de color amarillo, lo que es indicativo de colocalización entre ambos organelos. La cuantificación de este parámetro se realizó mediante el cálculo de los coeficientes de Manders para cada señal, tanto en las células completas (**Figura 6B**) como para las diversas regiones sub-celulares (**Figura 6C**). Se observó un aumento significativo de la colocalización de la señal mitocondrial sobre la de RE cuando las células se estimularon con GLP-1, tanto para células completas como para cada región sub-celular. Sin embargo, no se observó este cambio cuando se cuantificó la colocalización de la señal reticular sobre la mitocondrial, probablemente debido a la gran cantidad de marca de RE en relación a la marca mitocondrial. El análisis de post hoc para el ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas entre las distintas regiones celulares, pero sí que el tratamiento con GLP-1 modificó la colocalización, lo que da cuenta de un efecto global de la hormona sobre este parámetro, no restringido a un área celular particular.

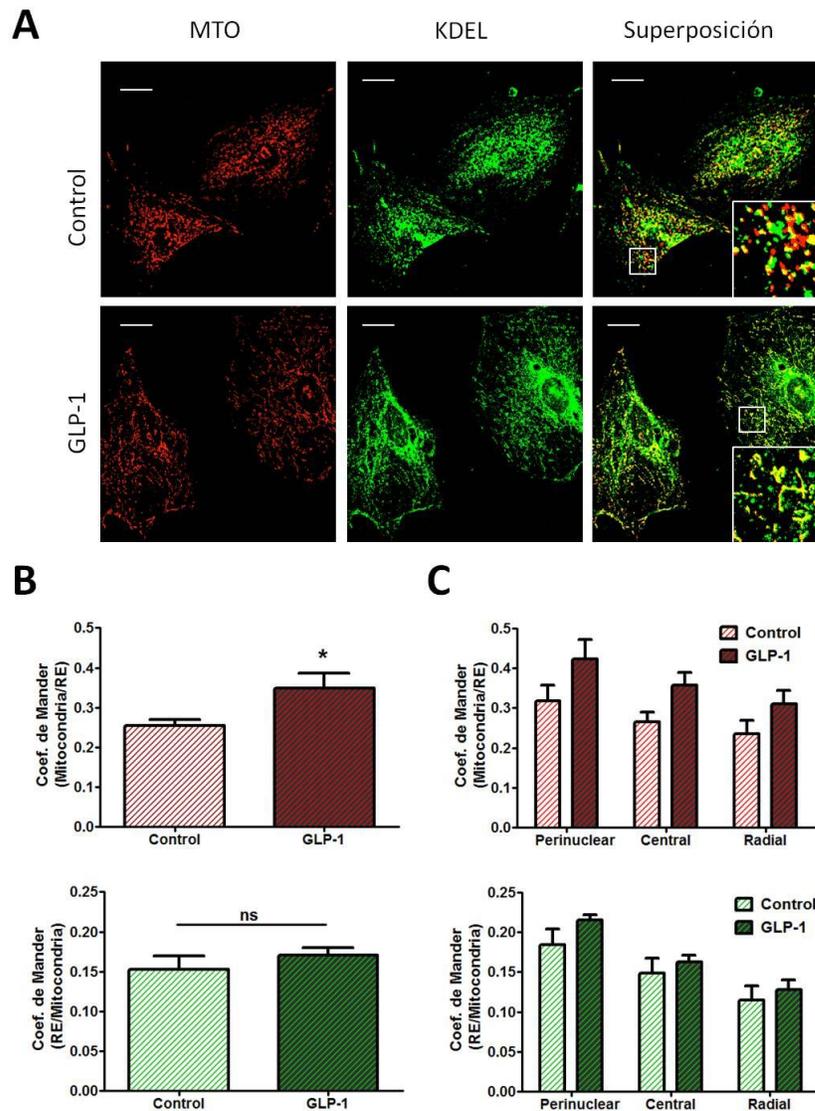


Figura 6. Modulación de la colocación entre RE y mitocondrias por GLP-1.

Mediante inmunofluorescencia indirecta, se determinó el grado de colocación entre RE y mitocondrias de células A7r5 tratadas por 0 – 3 h con GLP-1 100 nM. Las células se trataron con MitoTracker Orange y con anticuerpo anti KDEL para teñir la red mitocondrial y reticular, respectivamente. **(A)** Imágenes representativas de células teñidas con anticuerpo anti KDEL (panel izquierdo), MitoTracker Orange (panel central) y superposición de las señales (panel derecho), estimuladas según se indica. Barra de escala, 20 μ m. Cuantificación de la colocación mediante coeficientes de Manders para ambas señales, tanto para **(B)** célula completa como **(C)** por región sub-celular. n = 5. MTO: MitoTracker Orange; ns: no significativo. Promedio \pm SEM. *p < 0,05 vs basal.

5.1.2. Acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias

Para determinar si este aumento en la colocalización entre RE y mitocondrias tenía repercusiones funcionales, se evaluaron los cambios en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a histamina, en células pre-incubadas con GLP-1 por 0 - 3 h. En la **Figura 7A** se muestra la cinética promedio obtenida, mientras que en la **Figura 7B** se muestra una magnificación de ésta en el rango de 98 – 110 s. Se observó que tanto en las células control como en las estimuladas con GLP-1, el tratamiento con histamina incrementó los niveles de Ca^{2+} mitocondrial. Sin embargo, en aquellas tratadas con GLP-1, los niveles de Ca^{2+} mitocondrial alcanzados en respuesta a histamina fueron más altos, lo que se evidenció como un aumento en el área bajo la curva sobre un 50% en relación a las células no tratadas (**Figura 7A**). Además, la entrada de Ca^{2+} a las mitocondrias en células estimuladas con GLP-1 fue más rápida, ya que la pendiente de la fluorescencia versus tiempo en los primeros segundos post-estimulación con histamina fue mayor que la observada en las células controles ($2,4 \pm 1,2$ vs $4,1 \pm 1,1$ unidades arbitrarias/s, $p < 0,05$) (**Figura 7B**).

Este mayor aumento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a histamina en células A7r5 tratadas por 3 h con GLP-1, en conjunto con el aumento en la colocalización entre RE y mitocondrias (ver **Figura 6**), nos permiten concluir que la incretina es capaz de favorecer el acoplamiento físico y funcional entre los dos organelos.

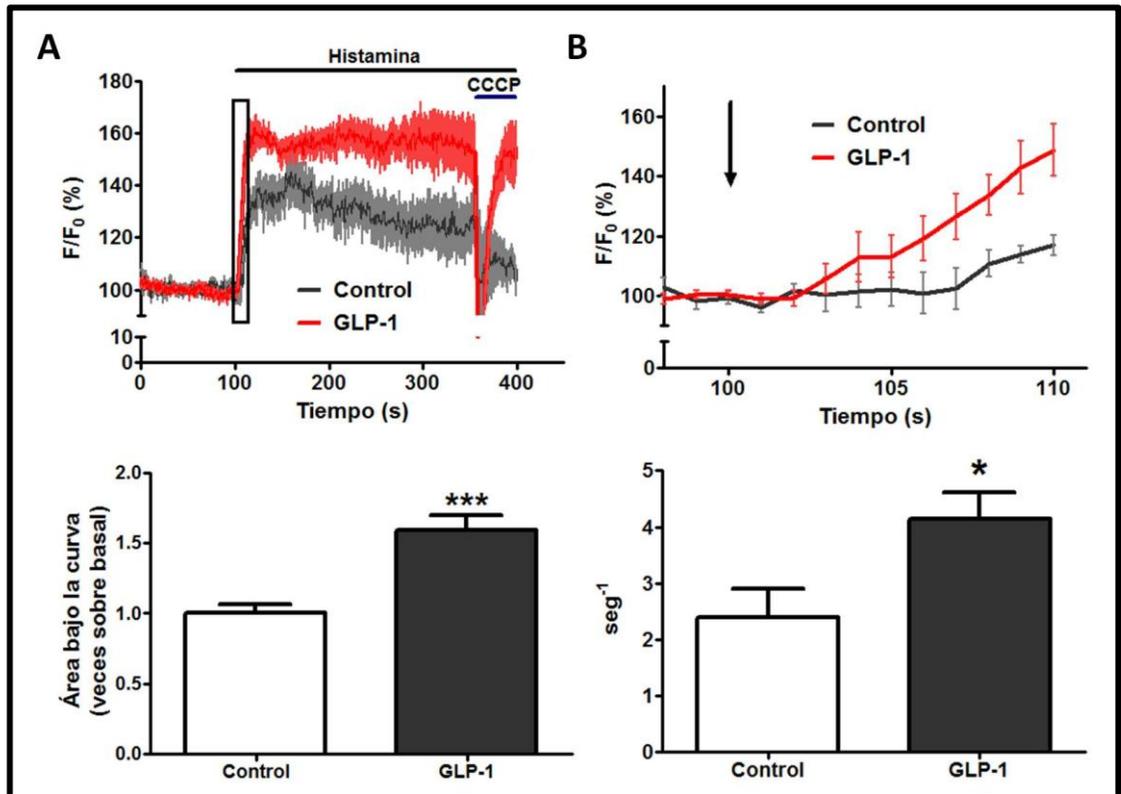


Figura 7. Efecto de la pre-incubación con GLP-1 en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina.

Posterior a la estimulación con GLP-1 100 nM por 0 – 3 h, las células se incubaron con la sonda Rhod-FF y la fluorescencia se capturó mediante microscopía confocal. **(A)** Cinética de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en estado basal o en respuesta a histamina (barra negra). CCCP se agregó en los últimos 50 s como control de la técnica (barra azul). Se muestra en la parte inferior la cuantificación del área bajo la curva entre los 100 – 350 s para ambas condiciones. **(B)** Cinética de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en el período 98 – 110 s (cuadro negro en B). La flecha indica el momento en que se agregó la histamina. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la pendiente en los primeros 10 s luego de la estimulación con histamina como indicador de la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. $n = 6$. Promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ vs basal; *** $p < 0,001$ vs basal.

5.2. Efecto de GLP-1 sobre los niveles de Mitofusina-2 y participación de PKA

La GTPasa Mfn-2 es una de las proteínas que participa en acoplamiento entre RE y mitocondria (**de Brito et al., 2008**). Se ha observado que en cultivo primario de VSMC, los niveles de esta proteína aumentan en respuesta a forskolina, un agente capaz de incrementar los niveles de AMPc (**Guo X et al., 2007**). Basados en estos antecedentes y en los resultados hasta ahora obtenidos, quisimos determinar los efectos de GLP-1 sobre los niveles de Mfn-2, y el posible rol de PKA en esta respuesta. Para esto, realizamos una curva de tiempo-respuesta (0 – 6 h) de los niveles de Mfn-2 en respuesta a GLP-1, y mediante western blot, determinamos sus niveles proteicos. La estimulación con GLP-1 causó un aumento en los niveles de Mfn-2, alcanzado un efecto máximo a las 3 h (**Figura 8A**). Dado que queríamos estudiar la participación de PKA en esta respuesta, quisimos determinar en primer lugar si esta kinasa se activaba en respuesta a GLP-1. Para esto, evaluamos los niveles de fosforilación de CREB, un factor transcripcional blanco de PKA. Como se muestra en la **Figura 8B**, la estimulación por 15 min con GLP-1 indujo un aumento significativo en la fosforilación de CREB. Para corroborar que este cambio fuera producto de la activación de PKA, pre-incubamos las células con H-89, un inhibidor químico de esta kinasa, y luego estimulamos con GLP-1. Efectivamente, la fosforilación de CREB observada en respuesta a GLP-1 se previno en presencia de este inhibidor, demostrando que este fenómeno dependía de PKA. Este resultado es indicativo, entonces, de que GLP-1 activó a PKA en nuestro modelo de estudio, y por lo tanto, podría estar implicado en la respuesta de los niveles de Mfn-2 a GLP-1 (**Figura 8B**). Entonces, para dilucidar la participación de PKA en el incremento de Mfn-2, pre-incubamos las células con el inhibidor H-89, y posteriormente estimulamos por 3 h con GLP-1. En la **Figura 8C** se observa que GLP-1 fue capaz de aumentar los niveles de Mfn-2, pero este efecto se previno completamente cuando PKA se encontraba inhibida. Estos resultados nos permiten concluir que la estimulación con GLP-1 aumenta los niveles de Mfn-2, a través de una vía transduccional en la que participa PKA.

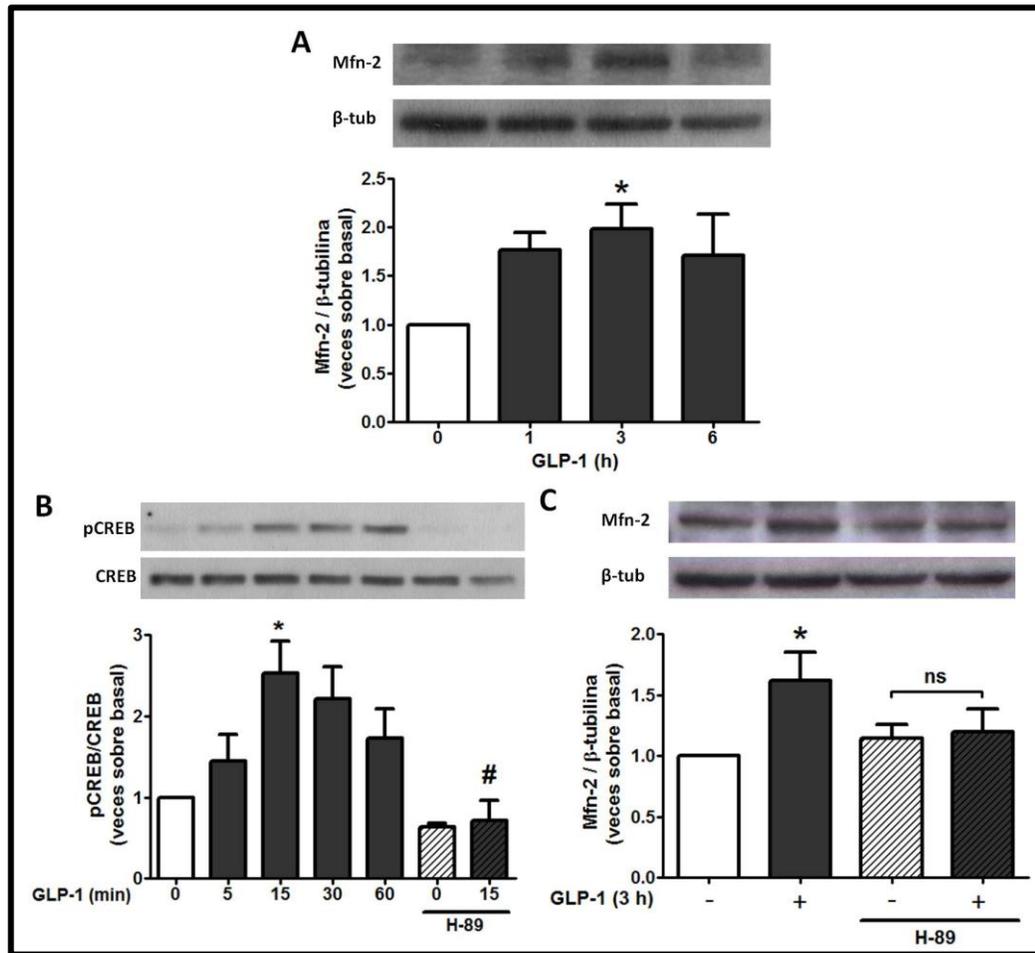


Figura 8. Niveles de Mitofusina-2 en respuesta a GLP-1 y participación de PKA.

(A) Células A7r5 se estimularon por 0 – 6 h con GLP-1 100 nM y posteriormente, los extractos de proteínas totales obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de Mfn-2 y β -tubulina (utilizado como control de carga). En la parte superior se muestra una imagen representativa del blot obtenido. En la parte inferior, se muestra la cuantificación de las señales. $n = 4$. **(B)** Células A7r5 se estimularon con por los tiempos indicados con GLP-1 100 nM y pre-incubaron con H-89 por 30 min, según se indica. Los extractos totales se sometieron a western blot para detectar los niveles de CREB fosforilado en Ser¹³³ (pCREB) y los niveles totales de CREB. En la parte superior se muestra una imagen representativa del blot obtenido. En la parte inferior, se muestra la cuantificación de las señales. $n = 3-5$. **(C)** Las células se estimularon por 0 – 3 h con GLP-1, en presencia o ausencia de H-89, según se indica. Luego se trataron de forma similar a lo hecho en A. $n = 4$. Mfn-2: Mitofusina-2; β -tub: β -tubulina; ns: no significativo. Promedio \pm SEM. * $p < 0,05$ vs basal; # $p < 0,05$ vs 15 min.

5.3. Participación de PKA y Mitofusina-2 en el acoplamiento RE-mitocondria inducido por GLP-1

Sabiendo que GLP-1 es capaz de aumentar el acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria y además, que promueve un incremento en los niveles de la proteína Mfn-2 a través de la activación de PKA, quisimos determinar si estos fenómenos estaban relacionados. Para esto, en primer lugar, evaluamos la comunicación entre ambos organelos en respuesta a GLP-1, en presencia del inhibidor de PKA, H-89. Las aproximaciones experimentales utilizadas fueron las mismas empleadas para resolver el objetivo específico 1, es decir, determinación de la colocalización entre RE y mitocondrias mediante inmunofluorescencia indirecta y medición de los niveles de Ca^{2+} mitocondriales en respuesta a histamina.

5.3.1. Acoplamiento físico entre RE y mitocondria

En la **Figura 9A** se muestran imágenes representativas de células tratadas con GLP-1 por 0 – 3 h, en presencia o ausencia de H-89, teñidas para determinar la red reticular y mitocondrial. Al igual que lo observado anteriormente, se observó que el tratamiento con GLP-1 indujo cambios en la morfología mitocondrial, favoreciendo la aparición de un fenotipo elongado y fusionado. Además, se observó la aparición de señal de color amarillo al superponer las imágenes de ambos canales (mitocondrial y de RE), lo que fue sugerente de un aumento en la colocalización. Sin embargo, cuando las células se pre-trataron con H-89, no se observó este aumento en la colocalización entre los organelos. La cuantificación de los coeficientes de Manders, tanto para mitocondrias sobre RE como para RE sobre mitocondria se condice con lo observado. Se observó una clara tendencia al aumento en la colocalización en respuesta a GLP-1, efecto que fue prevenido por la pre-incubación con H-89 (**Figuras 9B-C**). El análisis de colocalización en células completas no mostró un aumento estadísticamente significativo para ninguno de los dos coeficientes de Manders (**Figura 9B**). Sin embargo, al analizar las áreas sub-celulares por separado, el análisis de ANOVA de dos vías indicó la existencia de un efecto del tratamiento sobre la colocalización

(Figura 9C). Al igual que lo observado anteriormente, este efecto no estaba restringido a una región celular, sino que correspondía a un efecto global.

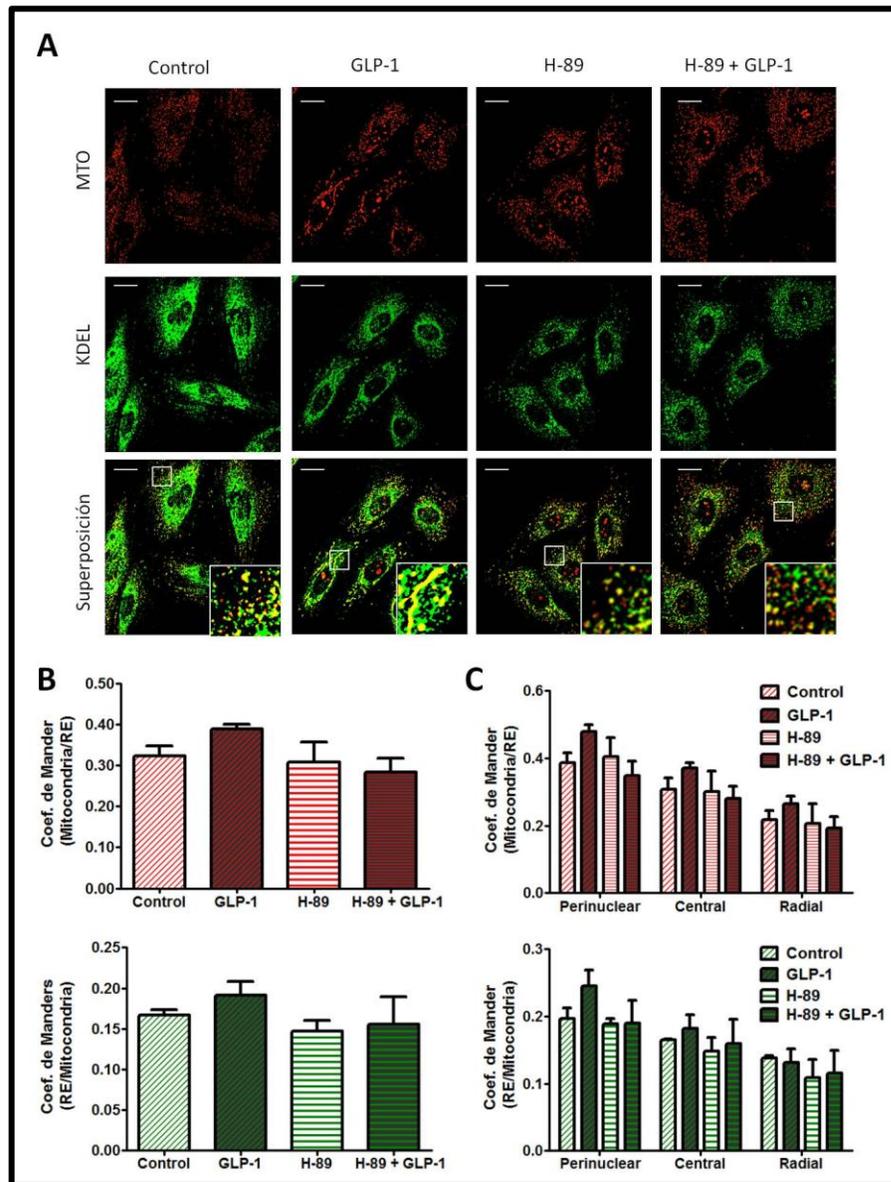


Figura 9. Rol de PKA en la modulación de la colocación entre RE y mitocondrias inducida por GLP-1.

Mediante inmunofluorescencia indirecta, se determinó el grado de colocación entre RE y mitocondrias de células A7r5 tratadas por 0 – 3 h con GLP-1 100 nM en ausencia o presencia de H-89. Las células se trataron con MitoTracker Orange y con anticuerpo anti KDEL para teñir la red mitocondrial y reticular, respectivamente. **(A)** Imágenes

representativas de células teñidas con anticuerpo anti KDEL (panel izquierdo), MitoTracker Orange (panel central) y superposición de las señales (panel derecho), estimuladas según se indica. Barra de escala, 20 μm . Cuantificación de la colocalización mediante coeficientes de Manders para ambas señales, tanto para **(B)** célula completa como **(C)** por región sub-celular. Promedio \pm SEM. n = 4. MTO: MitoTracker Orange.

5.3.2. Acoplamiento funcional entre RE y mitocondria

Se determinaron los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a histamina para evaluar la funcionalidad del acercamiento entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1. En la **Figura 10A** se muestra la cinética obtenida, en células tratadas con GLP-1 por 3 h, en presencia o ausencia de H-89. Se observó que la pre-incubación con GLP-1 aumentaba la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina en relación a las células sin estimular, y que este efecto se perdía por completo cuando PKA se encontraba inhibida por H-89. Estas observaciones concuerdan con la cuantificación del área bajo la curva para cada una de las condiciones (**Figura 10A**). Además, la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria también se vio afectada por H-89, ya que tal como se muestra en la **Figura 10B**, el aumento en la pendiente fluorescencia versus tiempos en los primeros segundos generado por el pre-tratamiento con GLP-1 no se observó cuando las células se trataron con H-89. Estos resultados, junto con los expuestos en el párrafo anterior, nos permiten deducir que el aumento en el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1 es dependiente de la activación de PKA.

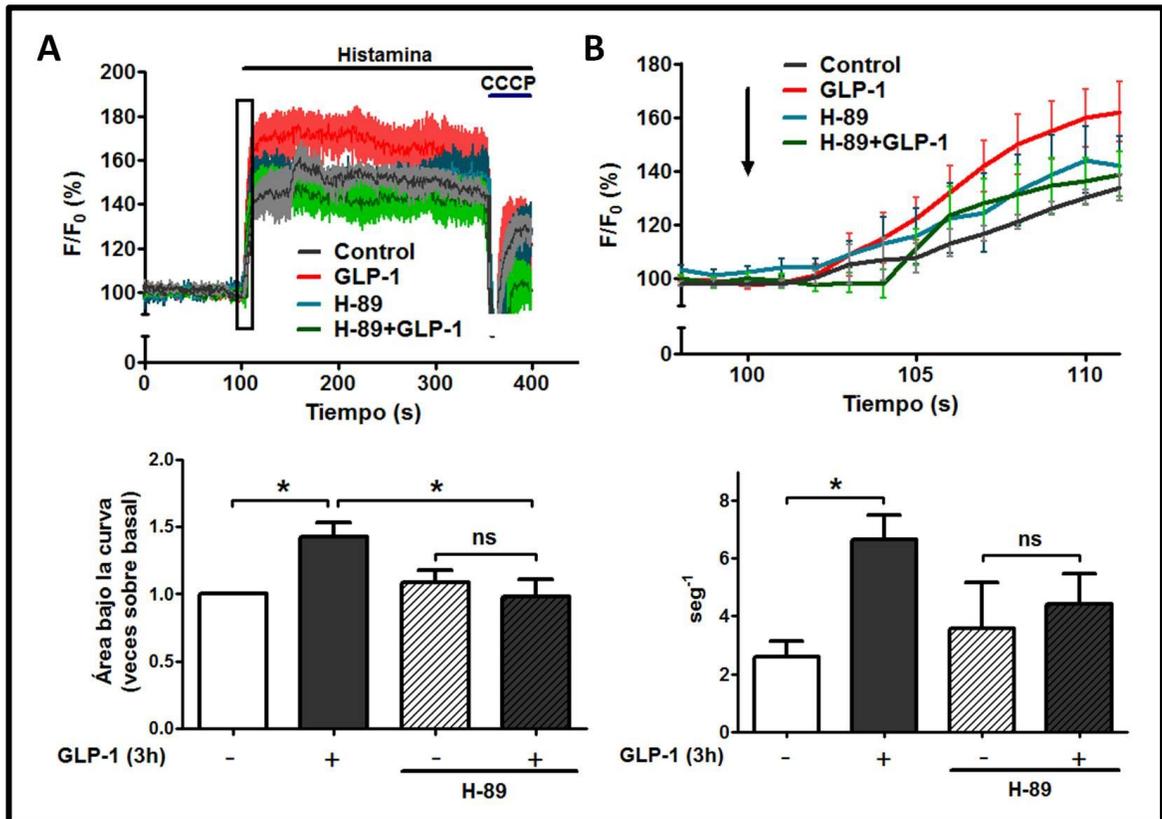


Figura 10. Participación de PKA en el efecto de la pre-incubación con GLP-1 en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina.

Células A7r5 se estimularon por 0 – 3 h con GLP-1 100 nM, en ausencia o presencia de H-89 y luego se incubaron con la sonda Rhod-FF. La fluorescencia se capturó mediante microscopía confocal. **(A)** Cinética de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en estado basal o en respuesta a histamina (barra negra). CCCP se agregó en los últimos 50 s como control de la técnica (barra azul). Se muestra en la parte inferior la cuantificación del área bajo la curva entre los 100 – 350 s para todas las condiciones experimentales. **(B)** Cinética de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en el período 98 - 110 s (cuadro negro en B). La flecha indica el momento en que se agregó la histamina. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la pendiente en los primero 10 s luego de la estimulación con histamina como indicador de la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. n = 5. Promedio \pm SEM. *p < 0,05 vs basal o GLP-1 3 h, según se indique.

6. DISCUSIÓN

6.1. Modulación del acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias por GLP-1

Las mitocondrias son, por excelencia, los organelos encargados de la síntesis de ATP, y por lo tanto, de controlar el metabolismo celular **(Gvozdjaková, 2008)**. A su vez, la actividad mitocondrial puede ser regulada por Ca^{2+} , ya que este ión controla alostéricamente a diversas enzimas del ciclo de Krebs, favoreciendo la formación de poder reductor en la matriz mitocondrial **(Denton et al., 1980; Gellerich et al., 2010)**. La entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial se realiza a través del MCU, un canal ubicado en la membrana interna mitocondrial, altamente selectivo para Ca^{2+} , pero de baja afinidad **(Kirichok et al., 2004)**. Esto condiciona el traspaso de Ca^{2+} desde el citosol a la mitocondria a regiones celulares específicas, donde se puedan alcanzar las concentraciones de Ca^{2+} necesarias para poder ingresar a la mitocondria. En este sentido, se ha visto que el RE juega un papel importante, ya que es el reservorio de Ca^{2+} más grande de la célula, y por lo tanto, regula la concentración citoplasmática de este ión **(Berridge et al., 2003)**. De esta forma, si las mitocondrias se encuentran cercanas a sitios de liberación de Ca^{2+} desde el RE, la alta concentración de este ión formada en la vecindad de estos sitios permite el eficiente traspaso de Ca^{2+} hacia la mitocondria **(Jouaville et al., 1999; Rizzuto et al., 1998, 1993)**. Esta interacción física y funcional entre RE y mitocondrias se conoce como “acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias”, y se ha visto que es vital para la actividad mitocondrial, no sólo como respuesta a estímulos extracelulares, sino también como mecanismo constitutivo para la función mitocondrial **(Cárdenas et al., 2010; Rowland et al., 2012)**.

En VSMC de arteria pulmonar, se ha visto que el aumento de la actividad mitocondrial a través de estrategias moleculares o farmacológicas, favorece la aparición de un fenotipo más diferenciado, de baja tasa de proliferación **(Sutendra et al., 2010)**. Más aún, cuando se disminuye la distancia entre RE y mitocondrias en este modelo celular, lo que se traduce en un aumento en los niveles de Ca^{2+} y en la actividad mitocondrial, se observa un fenotipo similar **(Sutendra et al., 2011)**. Dado que GLP-1 es capaz de prevenir la proliferación de VSMC y el remodelado vascular

(Goto et al., 2011; Nagashima et al., 2011) quisimos determinar si esta hormona modula de alguna forma el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias en la línea celular A7r5.

6.1.1. Acercamiento físico entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1

Mediante inmunofluorescencia indirecta de células marcadas con MitoTracker Orange y con anticuerpo anti KDEL, pudimos visualizar la red mitocondrial y reticular en células tratadas o no con GLP-1 por 3 h. Se puede observar en la **Figura 6**, que el tratamiento con GLP-1 induce cambios en la morfología mitocondrial, pasando desde un fenotipo puntual y fragmentado, a uno altamente interconectado. Generalmente, este tipo de morfología se asocia con un aumento en el metabolismo mitocondrial (Chen et al., 2005; Yasuda et al., 2011), lo que concuerda con los datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo (Torres G, datos no publicados). En las imágenes que muestran la superposición de las señales mitocondrial y reticular, se observa cómo la señal de color rojo (mitocondrias) prácticamente desapareció cuando las células son estimuladas con GLP-1, lo que da a entender que una alta cantidad de mitocondrias colocalizan con el RE (**Figura 6A**). La cuantificación de este parámetro a través de los coeficientes de Manders indica que, efectivamente, GLP-1 indujo un aumento en la colocalización de estos organelos (**Figura 6B**). Es importante señalar que esta variación en el coeficiente de Manders no es consecuencia de variaciones en la intensidad de las señales, ya que el cálculo de este valor se determina exclusivamente basado en la “cantidad” de pixeles de una imagen que colocalizan con los de otra imagen, y no en el “valor” (o intensidad) que toma este pixel.

La cuantificación de estos coeficientes indica que sí existió un aumento significativo en la colocalización de la señal mitocondrial respecto de la reticular, mas no en el sentido inverso (**Figura 6B**). Esta discrepancia no nos parece sorprendente, ya que, tal como se explicó, los valores del coeficiente de Manders se determinan en base a la cantidad de señal de uno de los canales. Dado que la señal reticular es mucho más abundante que la señal obtenida a partir de las mitocondrias (**Figura 6A**), incluso cuando se incrementa el acercamiento entre ambos organelos, el aumento en

el valor numérico del coeficiente de Manders de RE sobre mitocondrias es muy discreto, por lo que no se puede alcanzar una diferencia estadísticamente significativa en relación a la situación control. Por otra parte, observamos en la **Figura 6C**, que el efecto inducido por GLP-1 no estaba restringido a un área celular en particular, sino que era más bien un efecto de acción global. Esto es interesante ya que, generalmente, una alta proporción del RE se encontraba cercano al núcleo, lo que permitiría presuponer que esta es una región más susceptible a cambios morfológicos. En nuestro modelo de estudio, este no pareció ser el caso.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio, han mostrado que la colocalización entre RE y mitocondrias en tejido cardíaco alcanza valores en los coeficientes de Manders cercanos a 0,8 (**Gutiérrez T, datos no publicados**). Este grado de acercamiento excede por mucho los valores obtenidos en nuestro modelo celular (coeficiente de Manders Mitocondria/RE cercano a 0,3, **Figura 6B**). Sin embargo, el músculo cardíaco es un tejido altamente dependiente de la función mitocondrial, por lo que no se extraña asumir que este organelo se encuentre en estrecho contacto con el RE. Por otra parte, las VSMC son células principalmente glicolíticas, por lo que el aporte energético de este organelo es relativamente bajo, lo que permite suponer que el contacto RE-mitocondria es bajo. Basados en esto, creemos que el cambio inducido por GLP-1 sobre el acercamiento entre ambos organelos (sobre el 30% en relación a las células no estimuladas) es bastante importante, y podría tener consecuencias importantes en la función mitocondrial. Nos parece necesario indicar que, a pesar de ver un incremento en la cercanía entre ambos organelos, la resolución óptica en el plano XY que nos entrega el microscopio confocal utilizado en nuestros experimentos es cercana a los 230 nm, por lo que no podemos asegurar que el incremento en la colocalización implique necesariamente un contacto directo entre ambos organelos. Creemos que el uso de microscopios de mayor potencia resolutive podría ayudarnos a este respecto.

6.1.2. Efecto de la pre-incubación con GLP-1 en el traspaso de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria

Para determinar si el acercamiento físico entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1 tenía repercusiones funcionales, evaluamos el traspaso de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Para esto, medimos los niveles de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a histamina, una hormona ampliamente utilizada en la literatura como agente inductor de IP_3 , y por lo tanto, de la liberación de Ca^{2+} desde el RE (**De Stefani et al., 2011; Rizzuto et al., 1998, 1993**). Como se observa en la **Figura 7A**, el pulso de histamina indujo un rápido aumento de los niveles de Ca^{2+} en la mitocondria. La fuerte y veloz baja en la fluorescencia observada cuando agregamos el desacoplante mitocondrial, CCCP, indica que efectivamente la sonda utilizada en nuestros experimentos (Rhod-FF) se destinaba principalmente a la mitocondria, ya que se sabe que la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es un proceso altamente dependiente del potencial mitocondrial (**Kirichok et al., 2004**). Se observa, además, que cuando las células se pre-incubaron con GLP-1, el aumento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial fue significativamente mayor, como queda de manifiesto en la cuantificación del área bajo la curva (**Figura 7A, inferior**). Este resultado nos permite concluir que GLP-1 de alguna forma, favorece el traspaso de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Si bien es cierto, no comprobamos experimentalmente que histamina indujera la liberación de Ca^{2+} desde el RE en nuestro modelo de estudio, la alta constante de disociación de la sonda utilizada ($K_d = 19 \mu\text{M}$) nos permite inferir que la hormona necesariamente provocó un aumento muy elevado de Ca^{2+} en las cercanías de las mitocondrias, lo que concuerda con los valores estimados de las concentraciones de Ca^{2+} que se generan en las zonas circundantes de una fuente de Ca^{2+} intracelular como el IP_3R (**Collins et al., 2001; Csordás et al., 1999; Rizzuto et al., 1993**).

De forma complementaria, cuantificamos la pendiente de la cinética en los primeros 10 s post-estimulación con histamina, y observamos que la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria fue significativamente mayor en las células estimuladas con GLP-1 (**Figura 7B**). Este resultado es concordante con lo observado anteriormente, ya que si GLP-1 induce el acercamiento entre RE y mitocondrias, es de esperar que el Ca^{2+} proveniente del RE entre más rápido a las mitocondrias.

En su totalidad, estos resultados nos permiten afirmar que GLP-1 promueve el acercamiento entre RE y mitocondrias, y que esto se ve reflejado como una mayor eficiencia en el traspaso de Ca^{2+} entre ambos organelos.

Nos parece necesario mencionar que, a pesar de que nuestros resultados sugieren que la mayor entrada de Ca^{2+} reticular a la mitocondria ocurre de forma paralela a un acercamiento físico entre ambos organelos, no podemos descartar que otros mecanismos también estuviesen involucrados en este fenómeno. Por ejemplo, podría darse el caso de que frente a la estimulación con GLP-1, la afinidad del uniporter de calcio mitocondrial y/o que el contenido de Ca^{2+} en el RE hubiesen aumentado, lo que también daría cuenta de una mayor transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria. Claramente, estas suposiciones podrían abordarse experimentalmente en el futuro.

6.2. Participación de PKA en el acoplamiento entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1

Posterior a la determinación del efecto positivo que ejerció GLP-1 sobre la comunicación entre RE y mitocondrias, quisimos determinar si PKA estaba involucrada en el proceso. Nosotros mostramos que GLP-1 es capaz de activar a esta proteína (**Figura 8B**), sin embargo, hasta el momento no sabíamos qué papel podría jugar PKA en las respuestas inducidas por GLP-1. Al igual que en el objetivo anterior, estudiamos el acoplamiento entre RE y mitocondrias mediante inmunofluorescencia indirecta de células teñidas con MitoTracker Orange y anticuerpo anti KDEL, y además evaluamos los cambios en el nivel de Ca^{2+} mitocondrial en respuesta a histamina.

En la **Figura 9A** observamos que GLP-1 fusionó la red mitocondrial. Además, el tratamiento con GLP-1 indujo simultáneamente un mayor grado de colocalización entre RE y mitocondrias. La pre-incubación con el inhibidor de PKA, H-89, no modificó notablemente la red mitocondrial en relación a la situación control, aunque se observó que la morfología del RE se volvía más difusa y fragmentada. Esto podría indicar que PKA participa de alguna forma en la estructuración del RE, información hasta el momento no descrita.. La pre-incubación con H-89 pareciera prevenir el efecto positivo

de GLP-1 sobre el acoplamiento entre RE y mitocondrias, ya que no se observó en las imágenes un cambio notorio en la distribución de la fluorescencia proveniente de RE y mitocondrias respecto de las no tratadas con la hormona. Estas observaciones se condicen con la cuantificación de los coeficientes de Manders, donde se observó una clara tendencia al aumento en respuesta a GLP-1, mientras que no se observó diferencias con la situación basal cuando las células se trataron con H-89 (**Figura 9B**). Al igual que los datos señalados en la **Figura 6**, el efecto fue más notorio analizando el coeficiente de Manders de mitocondria sobre RE que el coeficiente inverso. Es importante señalar que el análisis estadístico de la colocalización en células completas (**Figura 9B**) no arrojó diferencias significativas entre las distintas condiciones estudiadas. Sin embargo, el análisis de ANOVA de dos vías realizado para la determinación del efecto de GLP-1 y H-89 en las diferentes regiones celulares sí indicó que el tratamiento tiene un efecto, aunque la dispersión de los datos no permitió determinar qué ocurre en las distintas regiones celulares para cada condición. De esta manera, estos resultados nos permiten suponer que el acercamiento físico inducido por GLP-1 es un proceso dependiente de PKA.

Para corroborar esta observación, continuamos con la determinación de la funcionalidad de este acoplamiento y su dependencia de PKA. Como se muestra en la **Figura 10A**, la pre-incubación con GLP-1 favoreció la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria en respuesta a histamina. Sin embargo, cuando las células se trataron además con H-89, el aumento inducido por GLP-1 se perdió por completo. Este resultado queda cuantificado a través de la determinación del área bajo la curva, donde se observó que no hay diferencias significativas entre las células controles y las tratadas con GLP-1, cuando ambas se tratan con el inhibidor de PKA (**Figura 10A, inferior**). Además, el aumento en la velocidad de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria observado en células tratadas con GLP-1, se perdió cuando las células se incubaron con H-89. Se observó también que la respuesta a histamina en las células tratadas con H-89 no difirió a la respuesta observada en las células control, por lo que incluso cuando el inhibidor sí afectase la morfología del RE, la liberación de Ca^{2+} desde este reservorio, ni la captación del ión por parte de las mitocondrias, pareciera verse severamente alterada.

En conjunto, los resultados expuestos en las **Figuras 9 y 10** nos permiten concluir que el aumento en el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias inducido por GLP-1, es un proceso dependiente de la activación de PKA. Se ha reportado que esta kinasa es capaz de traslocarse desde el citoplasma hacia el RE o a la membrana externa mitocondrial, principalmente gracias a proteínas de andamiaje con sitios de reconocimiento para PKA, conocidas como AKAP (**Huang et al., 1999**). Su traslocación a la membrana mitocondrial se ha relacionado con un aumento en el metabolismo de este organelo, ya que es capaz de favorecer la fusión mitocondrial y controlar la actividad de distintos componentes de la cadena transportadora de electrones (**Carlucci et al., 2008**). Por otra parte, se ha visto que la GTPasa Rab32 tiene actividad de AKAP, y puede promover la traslocación de PKA hacia zonas del RE de elevado contacto con las mitocondrias, conocidas como MAM (**Bui et al., 2010**). Aunque estos antecedentes sugieren que PKA sí podría modular de forma directa el acoplamiento RE-mitocondria, no se puede descartar el posible rol indirecta de esta kinasa en la regulación de este fenómeno, a través de la modulación de proteínas que participan en el acoplamiento.

6.3. Efecto de GLP-1 sobre Mitofusina-2 y rol de PKA

Como se ha mencionado anteriormente, el acoplamiento entre RE y mitocondrias es un proceso dependiente de una serie de proteínas, tales como el canal VDAC mitocondrial, el canal de Ca^{2+} reticular IP_3R , entre otras (**Pizzo et al., 2007**). Se ha visto que la proteína Mfn-2, relacionada principalmente con la modulación de la morfología mitocondrial (**Chen et al., 2003**) se encuentra además en el RE y participa en el acoplamiento con mitocondrias, a través de interacciones homo u heterodiméricas (**de Brito et al., 2008**). Por otra parte, se ha reportado que los niveles de esta enzima aumentan en VSMC en presencia de forskolina, una molécula que incrementa los niveles de AMPc. Dado que probamos que GLP-1 activa a PKA y por lo tanto, induce un aumento en los niveles de AMPc (**Figura 8B**), quisimos determinar si la estimulación con GLP-1 modula los niveles de Mfn-2. Efectivamente, la estimulación por 3 h con GLP-1 provocó un aumento significativo en la masa proteica de Mfn-2 (**Figura 8A**). Estos resultados nos parecen concordante con datos de la literatura, que

indican que la sobre-expresión de Mfn-2 mediante estrategias moleculares tiene un efecto anti-proliferativo y pro-apoptótico en cultivos primarios de VSMC (**Guo X et al., 2007; Guo Y. H. et al., 2007**). Ya que la administración sostenida de GLP-1 o Ex4 tiene efectos similares sobre el remodelado vascular (**Goto et al., 2011; Nagashima et al., 2011**), creemos que el aumento en los niveles de Mfn-2 podría ser el responsable, al menos en parte, de esta respuesta.

Lo siguiente fue determinar si el aumento de los niveles de Mfn-2 en respuesta a GLP-1 era dependiente de PKA. Observamos en la **Figura 8C** que, al igual que en la **Figura 8A**, GLP-1 indujo un aumento en los niveles de Mfn-2. Sin embargo, la pre-incubación con H-89 previno por completo este aumento, indicando que GLP-1 requiere de la activación de PKA para aumentar los niveles de Mfn-2.

Estos resultados nos parecen promisorios, ya que no hay reportes que indiquen que GLP-1 modula los niveles de Mfn-2. Además, a pesar de que ya se sabía que el aumento de AMPc conducía a un incremento en los niveles de esta proteína, no existía información disponible en relación al papel de PKA sobre esta respuesta, hasta ahora. Por el momento, no sabemos si este aumento en la cantidad de Mfn-2 es consecuencia de una mayor síntesis de la proteína o por inhibición de su degradación. Para esto, sería útil medir los niveles de ARNm de Mfn-2 en respuesta a GLP-1, o bloquear la síntesis de proteínas y determinar si este efecto se mantiene. Estudios bioinformáticos preliminares en nuestro laboratorio han mostrado que *Mfn2* de rata posee elementos de respuesta a AMPc (CRE) en su promotor, lo que sumado a los resultados obtenidos en este proyecto, nos permiten presumir que GLP-1 podría activar una vía de señalización no descrita previamente, PKA-CREB-Mfn-2.

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el acoplamiento entre RE y mitocondrias es vital para el metabolismo mitocondrial frente a una situación de estrés de RE (**Bravo et al., 2011**). Bajo estas circunstancias, el uso de un adenovirus que codifica para un ARN antisentido dirigido contra Mfn-2, previno el aumento en el consumo de oxígeno observado en las células tratadas con un adenovirus control (**Bravo et al., 2011**). Por otra parte, hemos visto que el uso de este mismo adenovirus en células de músculo esquelético repercute de forma negativa sobre el traspaso de

Ca²⁺ desde el RE hacia las mitocondrias **(del Campo A, datos no publicados)**. A pesar de que estos antecedentes se obtienen en líneas celulares distintas a la utilizada en nuestro proyecto, creemos que una situación similar podría darse en nuestro modelo.

6.4. Rol de GLP-1 en complicaciones vasculares en pacientes diabéticos

A lo largo de este trabajo, hemos mencionado la importancia del control del metabolismo de la glucosa en las VSMC, ya que un desbalance en este conduce a desordenes fenotípicos importantes **(Chiong et al., 2012)**. Junto con otras alteraciones metabólicas, el descontrol de los niveles de glucosa en la sangre es un marcador de la Diabetes Mellitus (DM). La hiperglicemia sostenida genera diversas alteraciones vasculares, ya que favorece la proliferación y migración de VSMC **(Beckman et al., 2002; Suzuki et al., 2001)**, promoviendo la aparición de nefropatías, retinopatías e infartos cardíacos **(Beckman et al., 2002; The emerging risk factors collaboration, 2010)**. Coincidentemente, los niveles de GLP-1 en pacientes diabéticos se encuentran disminuidos **(Nauck et al., 1986)**. Basados en los resultados obtenidos, y en los antecedentes presentados anteriormente, creemos que la restauración de los niveles normales de esta incretina podría mejorar la deteriorada función vascular en pacientes diabéticos, no sólo porque se promovería la normalización de la glicemia **(Nauck et al., 1993)**, sino también porque se favorecería el acoplamiento entre RE y mitocondrias en las VSMC, lo que se ha visto que repercute positivamente en el fenotipo de este tipo celular. Obviamente, lo mencionado corresponde estrictamente a suposiciones, ya que no existe evidencia experimental que corrobore nuestra hipótesis. Además, no podemos olvidar que GLP-1 tiene efectos en diversos órganos, por lo que el posible efecto positivo sobre la vasculatura podría ser de origen multifactorial.

7. PERSPECTIVAS

A lo largo de esta tesis, pudimos demostrar por primera vez que la incretina GLP-1 favorece el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias en la línea de músculo liso vascular A7r5, en un proceso dependiente de PKA. Además, nuestros resultados sugieren que este efecto sería mediado por la proteína Mfn-2. En conjunto, estas observaciones nos permitirían explicar, al menos en parte, los efectos benéficos observados de GLP-1 sobre el remodelado vascular. Como hemos señalado, un aumento en el metabolismo mitocondrial y un incremento en la comunicación entre RE y mitocondrias repercuten importantemente en el fenotipo la musculatura lisa vascular. Sin embargo, faltan datos experimentales que den cuenta de la relación de causalidad entre los fenómenos descritos en nuestro modelo de trabajo. Creemos que estos resultados abren la posibilidad de estudiar un nuevo mecanismo por el cual las incretinas pudiesen regular la función celular, principalmente su metabolismo. Finalmente, de comprobarse que los cambios fenotípicos inducidos por GLP-1 sobre el tejido vascular son dependientes de la regulación del acoplamiento entre RE y mitocondrias, podríamos estar frente a un mecanismo celular, no descrito hasta el momento, por el cual se podría regular la función vascular en pacientes diabéticos.

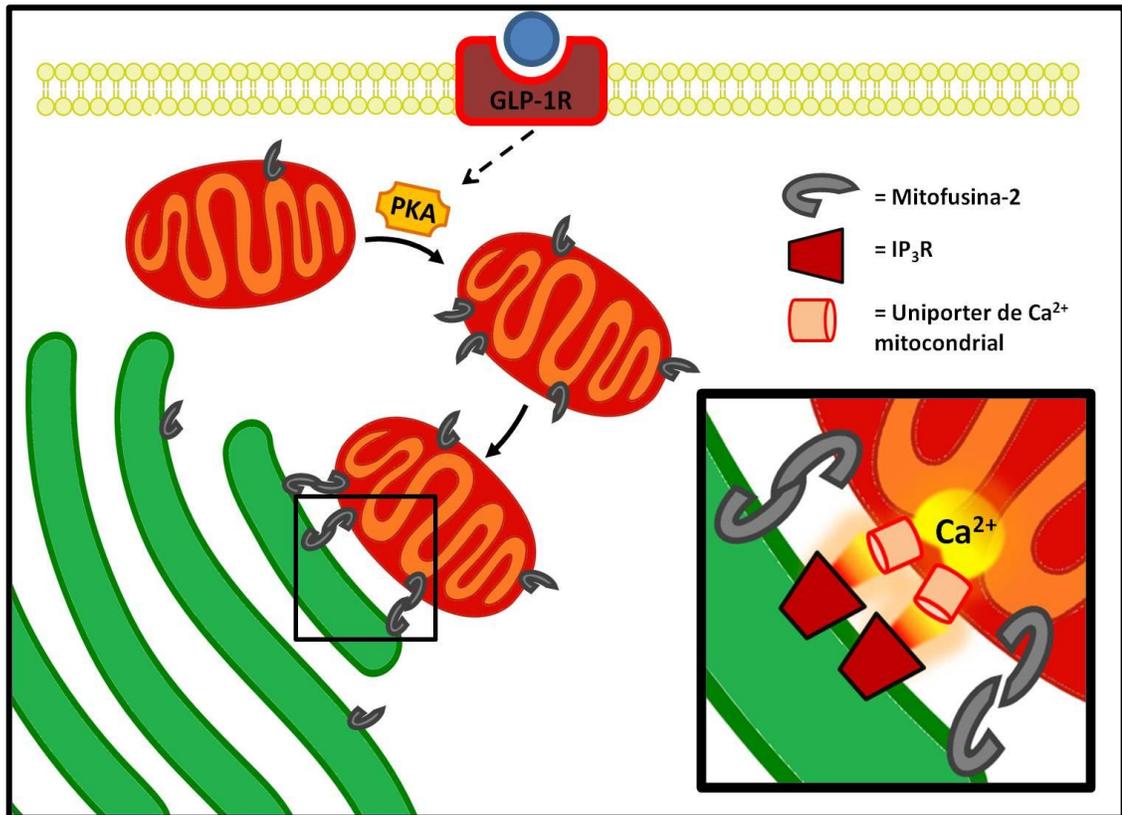


Figura 11. Modelo propuesto para la acción de GLP-1 sobre el acoplamiento funcional entre RE y mitocondrias en VSMC.

Al unirse a su receptor (GLP-1R), GLP-1 activa a PKA, aumentando los niveles de Mitofusina-2. Esto favorece la interacción entre RE y mitocondrias, permitiendo un mayor traspaso de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria.

8. CONCLUSIONES

1. La estimulación con GLP-1 por 3 h promueve el acercamiento entre las mitocondrias y el RE en la línea celular, ya que aumenta el grado de colocación entre ambos organelos, en un proceso mediado por la activación de PKA.

2. Bajo las mismas condiciones, la pre-incubación con GLP-1 favorece la entrada de Ca^{2+} proveniente del RE a la mitocondria, evaluado como un incremento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial y una velocidad de entrada mayor a lo observado en células no tratadas con la hormona. Similar a lo observado con el acercamiento físico, el efecto inducido por GLP-1 depende de la actividad de PKA.

3. La estimulación con GLP-1 induce un aumento en los niveles de Mfn-2, de forma tiempo dependiente, alcanzando su máximo efecto a las 3 h. Nuevamente, esta respuesta es mediada por la activación de PKA inducida por GLP-1.

9. REFERENCIAS

- Acitores, A., Gonza, N., Sancho, V., Valverde, I., Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2004). Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle. *J Endocrinol*, 180, 389–398.
- Alcántara, A. I., Morales, M., Delgado, E., López-Delgado, M. I., Clemente, F., Luque, M. A., Malaisse, W. J., et al. (1997). Exendin-4 agonist and exendin (9-39) amide antagonist of the GLP-1(7-36) amide effects in liver and muscle. *Arch Biochem Biophys*, 341, 1–7.
- Ban, K., Noyan-Ashraf, M. H., Hoefler, J., Bolz, S.-S., Drucker, D. J., Husain, M. (2008). Cardioprotective and vasodilatory actions of Glucagon-like peptide-1 receptor are mediated through both Glucagon-like Peptide-1 receptor- dependent and - independent pathways. *Circulation*, 117, 2340–2350.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. a, Sancak, Y., Bao, X. R., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341–345.
- Beckman, J. A., Creager, M. A., Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 287, 2570–2581.
- Ben-Shlomo, S., Zvibel, I., Shnell, M., Shlomai, A., Chepurko, E., Halpern, Z., Barzilai, N., et al. (2010). Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. *J Hepatol*, 1–10.
- Berridge, M. J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32, 235–249.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517–529.
- Bose, A. K., Mocanu, M. M., Carr, R. D., Brand, C. L., Yellon, D. M. (2005). Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia / reperfusion injury. *Diabetes*, 54, 146–151.
- Bravo, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J. P., Bui, M., Quiroga, C., et al. (2011). Increased ER – mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci*, 124, 2143–2152.
- Bui, M., Gilady, S. Y., Fitzsimmons, R. E. B., Benson, M. D., Lynes, E. M., Gesson, K., Alto, N. M., et al. (2010). Rab32 modulates apoptosis onset and mitochondria-associated membrane (MAM) properties. *J Biol Chem*, 285, 31590–31602.

- Butler, T. M., Siegelman, M. J. (1985). High-energy phosphate metabolism in vascular smooth muscle. *Annu Rev Physiol*, 47, 629–643.
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C.B., Birnbaum, M.J., Hallows, K.R., Foscett, J.K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 23, 270-283
- Carlucci, A., Lignitto, L., Feliciello, A. (2008). Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol*, 18, 604–613.
- Cecchetti, A., Rocchiccioli, S., Boccardi, C., Citti, L. (2011). Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *International review of cell and molecular biology* (1st ed., Vol. 288, pp. 43–99). Elsevier Inc.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 22, 79–99.
- Chen, H., Chomyn, A., Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280, 26185–26192.
- Chen, H., Detmer, S. a, Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E., Chan, D. C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160, 189–200.
- Chen, Y., Csordás, G., Jowdy, C., Schneider, T. G., Csordás, N., Wang, W., Liu, Y., et al. (2012). Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca²⁺ crosstalk. *Circ Res*, 111, 863–875.
- Chiong, M., Morales, P. E., Torres, G., García, L., Ibacache, M., Michea, L. (2012). Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation. VASA. Aceptado para publicación.
- Collins, T. J., Lipp, P., Berridge, M. J., Bootman, M. D. (2001). Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. *J B Chem*, 276, 26411–26420.
- Csordás, G., Thomas, A. P., Hajnóczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J*, 18, 96–108.
- de Brito, O. M., Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456, 605–610

- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*, 336–340.
- Delgado, E., Luque, M. a, Alcántara, a, Trapote, M. a, Clemente, F., Galera, C., Valverde, I., et al. (1995). Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides*, *16*, 225–229.
- Denton, R. M., McCormack, J. G., Edgell, N. J. (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. *Biochem J*, *190*, 107–117.
- Doran, A. C., Meller, N., Mcnamara, C. A. (2008). The role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*, 812–819.
- Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., Habener, J. F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Nat Acad Sci U S A*, *84*, 3434–3438.
- Egan, J. M., Wang, Y., Kole, H. K., Montrose-Rafizadeh, C., Perfetti, R., Bernier, M. (1997). Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes: glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *J Mol Endocrinol*, *19*, 241–248.
- Elrick, H., Stimmler, L., Hlad, C. J., Arai, Y. (1964). Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab*, *24*, 1076–1082.
- García-Pérez, C., Schneider, T. G., Hajnóczky, G., Csordás, G. (2011). Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *301*, H1907–1915.
- Gellerich, F. N., Gizatullina, Z., Trumbeckaite, S., Nguyen, H. P., Pallas, T., Arandarcikaite, O., Vielhaber, S., et al. (2010). The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta*, *1797*, 1018–1027.
- González, N., Acitores, A., Sancho, V., Valverde, I., Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2005). Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes. *Regul Pept*, *126*, 203 – 211.
- Goto, H., Nomiya, T., Mita, T., Yasunari, E., Azuma, K., Komiya, K., Arakawa, M., et al. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun*, *405*, 79–84.
- Green, B. D., Hand, K. V., Dougan, J. E., McDonnell, B. M., Cassidy, R. S., Grieve, D. J. (2008). GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation

- of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys*, 478, 136–142.
- Guo, X., Kuang-Hueih, C., Guo, Y., Liao, H., Tang, J., Xiao, R.P. (2007). Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway. *Circ Res*, 101, 1113–1122.
- Guo, Y.H., Chen, K., Gao, W., Li, Q., Chen, L., Wang, G.S., Tang, J. (2007). Overexpression of Mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoprotein induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 411–7.
- Gvozdjaková, A. (Ed.). (2008). *Mitochondrial Medicine* (pp. 1–16). Springer.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., Su, T.P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19, 81–88.
- Holst, J. J., Orskov, C., Nielsen, O. V., Schwartz, T. W. (1987). Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS lett*, 211, 169–174.
- Holz, G. G. (2004). Epac: A new cAMP-binding protein in support of Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, 53, 5–13.
- Huang, L. J., Wang, L., Ma, Y., Durick, K., Perkins, G., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., et al. (1999). NH 2 -terminal targeting motifs direct dual specificity A-kinase – anchoring protein 1 (D-AKAP1) to either mitochondria or endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 145, 951–959.
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. a, Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 96, 13807–13812.
- Kanse, S. M., Kreymann, B., Ghatei, M. a, Bloom, S. R. (1988). Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS lett*, 241, 209–212.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427, 360–364.
- Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M., Bloom, S. (1987). Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 2, 1300–1304.
- Liu, Q., Anderson, C., Broyde, A., Polizzi, C., Fernandez, R., Baron, A., Parkes, D. G. (2010). Glucagon-like peptide-1 and the exenatide analogue AC3174 improve

cardiac function , cardiac remodeling , and survival in rats with chronic heart failure. *Cardiovasc Diabetol*, 9, 1–14.

- Luque, M. A., Acitores, A., Redondo, A., Morales, M., Valverde, I., Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2002). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose metabolism in human myocytes. *J Endocrinol*, 173, 465–473.
- Mojsov, S., Weir, G. C., Habener, J. F. (1987). Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest*, 79, 616–619.
- Murphy, R. A. (1989). Special topic: contraction in smooth muscle cells. *Annu Rev Physiol*, 51, 275–283.
- Nagashima, M., Watanabe, T., Terasaki, M., Tomoyasu, M., Nohtomi, K., Kim-Kaneyama, J., Miyazaki, a, et al. (2011). Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*, 54, 2649–2659.
- Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R., Creutzfeldt, W. (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29, 46-52.
- Nauck, M.A., Kleine, N., Orskov, C., Holst, J.J., Willms, B., Creutzfeldt, W. (1993). Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 36, 741-744.
- Nyström, T., Gonon, A. T., Sjöholm, A., Pernow, J. (2005). Glucagon-like peptide-1 relaxes rat conduit arteries via an endothelium-independent mechanism. *Regul Pept*, 125, 173 – 177.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84, 767–801.
- Paul, R. J. (1983). Functional compartmentalization of oxidative and glycolytic metabolism in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 244, C399–409.
- Paul, R. J., Peterson, J. W. (1975). Relation between length, isometric force, and O₂ consumption rate in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 228, 915–922.
- Perley, M. J., Kipnis, D. M. (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*, 46, 1954–1962.
- Peterson, J. W., Paul, R. J. (1974). Aerobic glycolysis in vascular smooth muscle: Relation to isometric tension. *Biochim Biophys Acta*, 357, 167–176.

- Pizzo, P., Pozzan, T. (2007). Mitochondria – endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol*, 17, 511–517.
- Ranganath, L. R. (2008). The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 46, 43–56.
- Rimessi, A., Giorgi, C., Pinton, P., Rizzuto, R. (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: From stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 808–816.
- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262, 744–777.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., et al. (2009). Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1342–1351.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., et al. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*, 280, 1763–1766.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115, 1663–1674.
- Rowland, A., Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 607–625.
- Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indone*, 39, 86–93.
- Rzucidlo, E. M., Martin, K. A., Powell, R. J. (2007). Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, 45, 25–32.
- Sancho, V., Trigo, M. V., González, N., Valverde, I., Malaisse, W. J., Villanueva-Peñacarrillo, M. L. (2005). Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol*, 35, 27–38.
- Santel, A., Fuller, M. T. (2000). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114, 867–874.
- Sutendra, G., Bonnet, S., Rochefort, G., Haromy, A., Folmes, K. D., Lopaschuk, G. D., Dyck, J. R. B., et al. (2010). Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*, 2, 44ra58.

- Sutendra, G., Dromparis, P., Wright, P., Bonnet, S., Haromy, A., Hao, Z., McMurtry, M. S., et al. (2011). The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*, 3, 88ra55.
- Suzuki, L. A., Poot, M., Gerrity, R. G., Bornfeldt, K. E. (2001). Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*, 50, 851–860.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., et al. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*, 175, 901–11.
- The emerging risk factors collaboration (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*, 375, 2215–2222.
- Thorens, B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 89, 8641–8645.
- Turton, M. D., O’Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M. B., Meeran, K., CHOI, S. J., et al. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379, 69–72.
- Vila, M. G., Egan, J. M., Wang, X., Sollot, S. J. (2001). Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res*, 89, 445–452.
- Wray, S., Burdyga, T. (2010). Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev*, 90, 113–178.
- Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., Bonner-Weir, S. (1999). Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48, 2270–2276.
- Yasuda, K., Hartman, P. S., Ishii, T., Suda, H., Akatsuka, A., Shoyama, T., Miyazawa, M., et al. (2011). Interrelationships between mitochondrial fusion, energy metabolism and oxidative stress during development in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 404, 751–5.
- Yu, Z., Jin, T. (2010). New insights into the role of cAMP in the production and function of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Cell Signal*, 22, 1–8.
- Zhao, T., Parikh, P., Bhashyam, S., Bolukoglu, H., Poornima, I., Shen, Y., Shannon, R. P. (2006). Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and

glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 317, 1106–1113.