

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“Policistina-1 regula la hipertrofia del cardiomiocito
dependiente de IGF-1 ”**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctora en Farmacología**

Por:

Carolina Isabel Fernández Pérez

Director de Tesis

Dr. Sergio Lavandero

SANTIAGO- CHILE

2018

CONTENIDO

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVO GENERAL.....	11
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<i>a. Objetivo específico 1:</i> Estudiar si policistina-1 participa en la hipertrofia del cardiomiocito de rata inducida por IGF-1 o estrés mecánico	11
<i>b. Objetivo específico 2:</i> Determinar cómo PC-1 regula la activación de la red transduccional Akt, ERK y Calcio activada por IGF-1.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
5.1 Cultivo primario de cardiomiocitos.....	12
5.2 Estímulos hipertróficos.....	12
5.3 Silenciamiento de PC-1.....	13
5.4 Extracción de proteínas.....	14
5.5 Western blot.....	14
5.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	15
5.7 Incorporación de Leucina.....	15
5.8 Ensayo de gen reportero.....	16
5.9 Inmunofluorescencia indirecta.....	16
5.10 Determinación de área y perímetro celular.....	17
5.1.1 Análisis estadístico.....	17
6. RESULTADOS.....	18
6.1. Objetivo específico 1. Determinar si Policistina-1 participa en la hipertrofia del cardiomiocito de rata inducida por IGF-1 o por estrés mecánico	18
6.1.1. Policistina-1 es necesaria para el aumento del marcador de hipertrofia β -MHC inducido por IGF-1.....	18
6.1.2. Policistina-1 se requiere para el aumento en el área y perímetro celular inducido por IGF-1.....	18
6.1.3. Policistina-1 se requiere para el aumento en la sarcomerización inducido por IGF-1.....	18
6.1.4. La disminución en los niveles de policistina-1 con un siRNA específico previene el aumento del marcador de hipertrofia β -MHC inducido por hiposmolaridad.....	23
6.1.5. Policistina-1 regula el aumento en la incorporación de leucina inducido por estrés mecánico por hiposmolaridad.....	23

6.2. Objetivo específico 2: Determinar cómo PC-1 regula la activación de la red transduccional Akt, ERK y Calcio activada por IGF-1	25
6.2.1. La disminución de los niveles de PC-1 atenúa la fosforilación del receptor de IGF-1 dependiente de IGF-1.....	25
6.2.2. La fosforilación de Akt inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC1.....	26
6.2.3. La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de policistina-1.....	28
6.2.4. Las cinéticas de calcio dependientes de IGF-1 no se modifican por la reducción de los niveles proteicos de policistina-1.....	29
6.2.5. La reducción de la fosforilación del receptor de IGF-1 estimulada por la disminución de los niveles proteicos de policistina 1 se previene al inhibir proteínas tirosina fosfatasas.....	30
6.2.6. La disminución de los niveles del receptor de IGF-1 fosforilado inducida por el siRNA para policistina 1 se previene con un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B.....	32
6.2.7. La disminución de fosforilación de Akt inducida por la reducción de los niveles de policistina se previene con un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa 1B.....	33
6.2.8. La disminución en la fosforilación de ERK1/2 dependiente IGF-1 observada al reducir los niveles proteicos de policistina-1 se previene con un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B.....	34
6.2.9. Efecto del siRNA contra policistina-1 en los niveles de ROS de cardiomiocitos tratados con IGF-1.....	35
6.2.10. Selectividad del efecto de PTP1B en la acción de policistina-1 en el cardiomiocito traado con IGF-1.....	37
6.2.11. Efecto de la inhibición de PTP1B en la respuesta hipertrófica a IGF-1 en cardiomiocitos con niveles reducidos de policistina-1.....	39
7. DISCUSIÓN	44
7.1. Participación de policistina-1 en la hipertrofia inducida por IGF-1.....	44
7.2. Participación de policistina-1 en la hipertrofia inducida por estrés mecánico por hiposmolaridad.....	47
7.3. Regulación de la fosforilación del receptor de IGF-1, Akt y ERK1/2 por policistina-1.....	49
7.4. Rol de las vías transduccionales activadas por IGF-1 y su receptor en el desarrollo de hipertrofia en los cardiomiocitos.....	50
7.5. Participación de la proteína tirosina fosfatasa 1B en la reversión de los efectos del silenciamiento de policistina-1.....	52
7.6. Mecanismo por el cual policistina-1 podría regular a la PTP1B.....	53
8. CONCLUSIONES	55
9. REFERENCIAS	57
10. ANEXO	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	<i>siRNA específico para Policistina-1 disminuye los niveles proteicos de esta proteína.....</i>	<i>13</i>
Figura 2:	<i>Disminución en los niveles de PC-1 inhibe el aumento de β-MHC dependiente de IGF-1.....</i>	<i>20</i>
Figura 3:	<i>Disminución en los niveles de PC-1 inhibe el aumento en el área y perímetro celular dependientes de IGF-1.....</i>	<i>21</i>
Figura 4:	<i>PC-1 se requiere para el aumento en la sarcomerización dependiente de IGF-1.....</i>	<i>22</i>
Figura 5:	<i>siRNA para Policistina-1 previene el aumento de β-MHC inducido por hiposmolaridad.....</i>	<i>24</i>
Figura 6:	<i>Policistina-1 regula el aumento en la incorporación de leucina inducido por estrés mecánico.....</i>	<i>24</i>
Figura 7:	<i>Disminución de los niveles de PC-1 atenúa la fosforilación del receptor de IGF-1 dependiente de IGF-1.....</i>	<i>26</i>
Figura 8:	<i>Fosforilación de Akt inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC1.....</i>	<i>27</i>
Figura 9:	<i>Fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC-1.....</i>	<i>28</i>
Figura 10:	<i>Cinéticas de calcio dependientes de IGF-1 no se alteran por la reducción de los niveles de PC-1.....</i>	<i>29</i>
Figura 11:	<i>Fosforilación del receptor de IGF-1 inhibida por el siRNA para Policistina 1 se recupera al inhibir tirosinas fosfatasas.....</i>	<i>31</i>
Figura 12:	<i>Disminución de la fosforilación del receptor de IGF-1 inducida por la reducción de los niveles de policistina 1 se recupera al utilizar un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B.....</i>	<i>32</i>
Figura 13:	<i>Disminución de la fosforilación de Akt dependiente de IGF-1 debida a la reducción de los niveles de policistina-1 se previene con un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B.....</i>	<i>33</i>
Figura 14:	<i>Disminución de la fosforilación de ERK1/2 inducida por el siRNA para policistina se previene al inhibir la proteína tirosina fosfatasa 1B.....</i>	<i>34</i>
Figura 15:	<i>La disminución en los niveles de policistina-1 no afecta los niveles de ROS en cardiomiocitos tratados con IGF-1.....</i>	<i>36</i>
Figura 16:	<i>Fosforilación del receptor de insulina no es afectada por la disminución de los niveles de policistina-1 en cardiomiocitos tratados con insulina.....</i>	<i>38</i>
Figura 17:	<i>Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en la respuesta hipertrófica a IGF-1.....</i>	<i>41</i>
Figura 18:	<i>Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a IGF-1.....</i>	<i>42</i>
Figura 19:	<i>Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en el aumento del área, perímetro celular y grado de sarcomerización en respuesta a IGF-1.....</i>	<i>43</i>
Figura 20:	<i>Modelo propuesto.....</i>	<i>56</i>

FIGURAS ANEXAS

Figura i:	<i>IGF-1 no estimularía translocación de β-catenina al núcleo.....</i>	66
Figura II:	<i>Regulación de la actividad transcripcional dependiente de β-catenina, TCF/LEF.....</i>	67
Figura III:	<i>Efecto de IGF-1 en los niveles de β-catenina.....</i>	68
Figura IV:	<i>Efecto de IGF-1 en la distribución subcelular de β-catenina.....</i>	69
Figura V:	<i>Policistina-1 regularía la localización subcelular de β-catenina en los cardiomiocitos tratados con IGF-1.....</i>	70

RESUMEN

La hipertrofia cardiaca corresponde a una etapa temprana en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Ante un incremento de la demanda de trabajo, el corazón responde aumentando su tamaño (hipertrofia). A nivel celular, esta respuesta se caracteriza por aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, síntesis de proteínas, reorganización del citoesqueleto de actina y reexpresión del programa génico fetal.

El factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1) es un péptido con efectos mitogénicos y citoprotectores. La estimulación con IGF-1 produce hipertrofia cardiaca tanto *in vivo* como *in vitro*. Posterior a la unión del IGF-1 con su receptor, se activan las proteínas quinasas Akt y ERK, las que en el cardiomiocito se asocian con sus efectos hipertroficicos y antiapoptóticos.

Policistina 1 es una proteína que se expresa en distintos tipos celulares, entre ellos los cardiomiocitos. Mutaciones en las policistinas, especialmente en policistina-1, dan cuenta de la enfermedad poliquística renal autosómica dominante. En algunos de estos pacientes se ha observado el desarrollo de hipertrofia cardiaca antes que se altere la función renal. Sin embargo, no está claro cuál es el papel de la policistina-1 en los cardiomiocitos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de policistina-1 en la hipertrofia inducida tanto por IGF-1 como por estrés mecánico. El modelo utilizado fueron cultivos primarios de cardiomiocitos de rata estimulados con estrés mecánico por hiposmolaridad o con IGF-1. Para determinar la participación de policistina-1 se silenció esta proteína con un siRNA específico y se determinaron distintos marcadores de hipertrofia cardiaca como la activación de las vías transduccionales del receptor IGF-1.

Los resultados mostraron que policistina-1 era necesaria para el desarrollo de hipertrofia del

cardiomiocito por ambos estímulos. En el caso de IGF-1, policistina-1 se requirió para la fosforilación del receptor de IGF-1 en respuesta a estimulación con IGF-1 y posterior activación de las proteínas quinasas ERK y Akt, sin observarse modificaciones en el calcio intracelular. El mecanismo por el que ocurre esta regulación involucra a la proteína tirosina fosfatasa 1B. Los efectos del silenciamiento de policistina-1 en la hipertrofia inducida por IGF-1 y en la activación tanto del receptor de IGF-1 como de las quinasas ERK y Akt se previnieron al inhibir esta fosfatasa.

A partir de estos hallazgos se concluye que policistina-1 es un regulador de la hipertrofia tanto por estrés mecánico como por IGF-1 en el cardiomiocito, regulación que depende de la PTP1B y ocurre por regulación de la fosforilación del receptor IGF-1.

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is an early stage in the development of cardiovascular disease. After work overload, the heart responds by increasing its size (hypertrophy). At the cellular level, this response is characterized by increases in the size of cardiomyocytes and synthesis of proteins as well as actin cytoskeleton rearrangement and re-expression of fetal gene program.

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a peptide with mitogenic and cytoprotective effects. Stimulation with IGF-1 induces cardiac hypertrophy both *in vivo* and *in vitro*. IGF-1 binding with its receptor activates Akt and ERK signaling pathways which are associated with pro-hypertrophic and anti-apoptotic effects on the cardiomyocyte.

Polycystin 1 is a protein expressed in different cell types, including cardiomyocytes. Mutations in *polycystin-1* gene cause autosomal dominant polycystic kidney disease. In some patients, cardiac hypertrophy is described before renal function abnormalities are reported. However it is still unclear what is the role of polycystin-1 on cardiomyocyte.

The aim of this work was to study the role of polycystin-1 on cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 and mechanical stress. The experimental model used was primary cultured neonatal rat cardiomyocytes stimulated by mechanical stress (using hyposmolarity) or IGF-1. To determine the involvement of polycystin-1 a specific siRNA was used. Both cardiomyocyte hypertrophy markers and cell signaling pathways of IGF 1 receptor were determined.

The results showed that polycystin-1 was necessary for cardiomyocyte hypertrophy induced by mechanical stress or IGF-1. In the case of IGF-1, polycystin-1 was required for the IGF-1R phosphorylation in response to stimulation with IGF-1 and subsequent activation of ERK and Akt kinases. However changes in intracellular calcium were not observed. The mechanism by which this

process takes place involving the regulation of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). The inhibition of PTP1B prevents the effects of silencing polycystin-1 on cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 and also prevents activation of IGF-1R, Akt and ERK.

We conclude that polycystin- 1 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy triggered by mechanical stress or IGF-1. This regulation requires the activity of PTP1B and regulation of IGF-1 receptor phosphorylation.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por:

- Beca CONICYT de Doctorado Nacional, periodo 2010-2014.
- Beca CONICYT de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral 24121238, periodo 2012-2014.
- Beca CONICYT para Asistencia a Congresos Nacionales, año 2012 y 2014.

Proyectos Dr. Sergio Lavandero

- Proyectos FONDAP 15130011
- Proyecto FONDECYT 1161156

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

Publicaciones

- **Fernández C**, Torrealba N, Altamirano F, Garrido V, Vasquez-Trincado C, Quilaqueo M, Lopez-Crisosto C, Ocaranza MP, Chiong M, Pedrozo Z, Lavandero S. Polycystin-1 is required for IGF-1 induced cardiomyocyte hypertrophy. Manuscrito en revisión. BBA – Molecular Basis of Disease, 2018.
- Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras A, **Fernández C**, Jiang N, Luo X, Caplan MJ, Somlo S, Rothermel BA, Gillette TG, Lavandero S, Hill JA. Polycystin-1 is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-type Ca²⁺ channel protein stability. *Circulation*. 131:2131-42, 2015.
- Pedrozo Z, Torrealba N, **Fernández C**, Gatica D, Toro B, Quiroga C, Rodriguez AE, Sanchez G, Gillette TG, Hill JA, Donoso P, Lavandero S. Cardiomyocyte ryanodine receptor degradation by chaperone-mediated autophagy. *Cardiovasc Res*98:277-85, 2013.

Presentaciones en congresos

- **Fernández C**, Cartes-Saavedra B, Garrido V, Torrealba N, Pedrozo Z, Lavandero S. “Polycystin-1 regulates IGF-1-induced cardiomyocyte hypertrophy and IGF-1 receptor signaling”. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, 22 al 25 de Septiembre de 2015.
- **Fernández C**, Torrealba N, Pedrozo Z, Lavandero S. “Polycystin-1 is necessary for cardiomyocyte hypertrophy stimulated by IGF-1”. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, 30 de Septiembre al 4 de Octubre 2014.

- **Fernández C**, Pedrozo Z, Hill JA, Lavandero S. “Polycystin-1 modulates mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy” XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile Puerto Varas, Chile, 2-5 de Octubre 2012.

1. INTRODUCCIÓN

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en Chile y en el mundo. Uno de los principales factores de riesgo cardiovascular es la hipertensión arterial, en estos pacientes la hipertrofia asociada a la hipertensión arterial aumenta significativamente el riesgo de experimentar infarto agudo del miocardio, insuficiencia cardiaca, muerte súbita y otras patologías cardiovasculares (Gosse, 2005; Ruilope y Schmieder, 2008). La terapia farmacológica empleada está orientada a tratar la hipertensión arterial y algunos de los fármacos utilizados traen asociado el beneficio clínico de revertir la hipertrofia cardiaca (Finckenberg y Mervaaaja, 2010). Sin embargo, no se han desarrollado hasta ahora fármacos dirigidos directamente contra vías o receptores que regulen la aparición y el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, en parte, debido al desconocimiento de los factores que regulan esta patología. Por esta razón, es necesario estudiar los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de hipertrofia cardiaca.

Hipertrofia cardiaca

El corazón está compuesto principalmente por dos tipos celulares, los fibroblastos y los cardiomiocitos. Los primeros proliferan, otorgan el tejido de soporte a los cardiomiocitos al sintetizar proteínas de la matriz extracelular, en tanto los cardiomiocitos son las células que le otorgan la propiedad contráctil al corazón. A diferencia de los fibroblastos, una vez que se diferencian durante los primeros días después del nacimiento, su capacidad proliferativa es escasa (Weber *et al.*, 1993).

Ante un incremento de la demanda de trabajo, el corazón responde aumentando su tamaño. A nivel celular, esta respuesta se caracteriza por aumentos en el número de los fibroblastos

(hiperplasia) y en el tamaño de los cardiomiocitos (hipertrofia). En una primera etapa, la hipertrofia es una respuesta adaptativa frente a la sobrecarga de trabajo, sin embargo si esta última es crónica, la hipertrofia cardíaca transita al desarrollo de insuficiencia cardíaca (Bernardo *et al.*, 2010). La hipertrofia cardíaca se clasifica en fisiológica y patológica. La primera corresponde al crecimiento normal del corazón en condiciones de aumento de la demanda de trabajo, como el embarazo o el ejercicio físico, y se caracteriza por presentar función contráctil normal y ser reversible (Heineke y Molkentin, 2006; Bernardo *et al.*, 2010). Por otra parte, la de tipo patológica depende de estímulos mecánicos y factores neurohumorales, entre ellos angiotensina II, catecolaminas y endotelina-1, entre otros, que se generan en estados como el infarto del miocardio (Loennechen *et al.*, 2001) y la hipertensión arterial (Ebensperger *et al.*, 1998). En una primera etapa no existe disfunción contráctil, lo que se conoce como hipertrofia adaptativa, sin embargo y con posterioridad se presentan alteraciones en la función cardíaca de manera irreversible (Bernardo *et al.*, 2010). A nivel celular, el aumento en el tamaño de los cardiomiocitos implica un aumento en la síntesis de las proteínas, reexpresión de genes que codifican para proteínas expresadas en la etapa fetal como el péptido natriurético auricular (ANP) y la isoforma beta de la cadena pesada de la miosina (β -MHC), aumento en el número y organización de los sarcómeros y la acumulación de proteínas miofibrilares (Foncea *et al.*, 1997). Los estímulos prohipertróficos, ya sea el estrés biomecánico, factores de crecimiento o agentes neurohumorales, activan receptores de membrana, entre los que se encuentran receptores acoplados a proteína G, especialmente acoplados a Gq, receptores tirosina quinasa e integrinas, los que a su vez activan distintas vías transduccionales, entre ellas la vía de la fosfolipasa C/DAG/ Ca^{2+} , la vía de las MAP quinastas, calcineurina/NFAT y mTOR, entre otras (Heineke y Molkentin, 2006). La hipertrofia cardíaca se induce entonces como una consecuencia de la estimulación del miocardio tanto por factores de crecimiento, factores neurohumorales

como por estímulos mecánicos.

Factor de crecimiento análogo a insulina tipo I (IGF-1)

El IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos relacionado estructuralmente con la insulina (Contreras *et al.*, 2006). Este péptido tiene efectos mitogénicos y citoprotectores y es sintetizado en forma endocrina principalmente por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento. Sin embargo se ha mostrado la existencia de sistemas locales de producción/liberación autocrina/paracrina de IGF-1 (Yakar *et al.*, 1999), encontrándose uno de ellos en el corazón, órgano en el cual el IGF-1 tiene efectos prohipertróficos y antiapoptóticos (Fazio *et al.*, 2000). El receptor de IGF-1 (IGF-1R) posee gran similitud estructural con el receptor de insulina y pertenece a la familia de los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (Ibarra *et al.*, 2004). Este receptor está formado por dos subunidades α extracelulares, en donde está el dominio de unión a ligando, y dos subunidades β intracelulares con actividad tirosina quinasa (Contreras *et al.*, 2006). Después de la unión del IGF-1 a su receptor, el mismo se autofosforila en distintos residuos de tirosina, lo que permite la interacción con diferentes proteínas que poseen dominios SH2, activando las vías intracelulares PI3K/Akt y Ras-MEK-ERKs (Foncea *et al.*, 1997; Ibarra *et al.*, 2004), las que en el cardiomiocito se asocian con sus efectos hipertroficoy antiapoptóticos (Contreras *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha descrito que el IGF-1 estimula los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el cardiomiocito. Interesantemente este efecto depende de la activación de una proteína G heterotrimérica en el cardiomiocito tanto a través de las subunidades α_i como $\beta\gamma$ (Ibarra *et al.*, 2004). El tratamiento con toxina pertussis (inhibidor de α_i) impide la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1, pero no la de Akt, en tanto un péptido secuestrador de las subunidades $\beta\gamma$ impide el aumento de Ca^{2+} intracelular estimulado por IP_3 (Ibarra *et al.*, 2004). El conjunto de

estos datos indican que existen distintos mecanismos de señalización mediados por IGF-1 a través de su receptor.

IGF-1 e hipertrofia cardiaca

La estimulación con IGF-1 produce hipertrofia cardiaca tanto *in vivo* (Duerr *et al.*, 1995) como *in vitro* (Ito *et al.*, 1993) y aunque generalmente la presencia de este factor se asocia con hipertrofia fisiológica también se ha observado su aumento en condiciones patológicas, mostrado por una correlación positiva entre los niveles circulantes de IGF-1 y la presión sanguínea (Ren *et al.*, 1999). Por otra parte, diferentes modelos de hipertrofia cardiaca revelan el aumento de los niveles del mRNA y de la proteína IGF-1 a nivel del corazón y no necesariamente a nivel sistémico (Ebensperger *et al.*, 1998; Honso *et al.*, 2009). Además se ha propuesto que el IGF-1 participaría en el periodo inicial del desarrollo de la hipertrofia cardiaca producida por estímulos patológicos, ya que mientras pacientes con hipertrofia compensada presentaron aumento de la producción local de IGF-1, pacientes con hipertrofia y disfunción contráctil presentaron disminución o ausencia de producción local de este factor y un aumento de los niveles de angiotensina II (Serneri *et al.*, 1999).

Todas las vías transduccionales, descritas anteriormente, activadas a través del receptor de IGF-1 están relacionadas con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Contreras *et al.*, 2006). A estos antecedentes debe sumarse el trabajo publicado por Muñoz *et al.* 2009, quienes describieron que IGF-1 lleva a la activación transcripcional dependiente de MEF2C en el cardiomiocito, evento clave en el desarrollo de la hipertrofia (Muñoz *et al.*, 2009)

Respecto a la fosfatasa encargada de desfosforilar al IGF-1R se ha propuesto a la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y así terminar con su señalización (Arroba *et al.*, 2013; Buckley *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2013). Esta fosfatasa también desfosforila al receptor de Insulina y a otros receptores

de la familia tirosina quinasa (Feldhammer *et al*, 2013). Se ha descrito un rol importante para esta proteína tanto en enfermedades metabólicas (como resistencia a la insulina) (Gomez *et al*, 2012; Agouni *et al*, 2014), como en patologías cardiovasculares como disfunción endotelial e insuficiencia cardiaca (Gogiraju *et al*, 2016; Thiebaut *et al*, 2016). La inhibición de la actividad de esta fosfatasa, así como la disminución de sus niveles proteicos a través del uso de siRNA, previenen tanto de los problemas metabólicos (Gomez *et al*, 2012; Agouni *et al*, 2014), como de la disfunción endotelial y de la insuficiencia cardiaca inducida por sobrecarga de presión (Gogiraju *et al*, 2016). El papel de la PTP1B en el desarrollo de hipertrofia cardiaca aún no se ha estudiado.

Contribución del estrés mecánico en el desarrollo de hipertrofia cardiaca

El estrés mecánico es una de las señales que promueve el crecimiento en un corazón con sobrecarga hemodinámica. El estiramiento de los cardiomiocitos aislados estimula el aumento de la síntesis de proteínas, la expresión de marcadores de hipertrofia y el aumento en el área celular, en tanto que a nivel intracelular se activan diversas vías transduccionales como MAP quinasas, PI3K-Akt y calcineurina/NFAT, entre otras (Ruwhof y van der Laarse, 2000).

Aún no se ha establecido con claridad cuál es la molécula que sensa el estrés mecánico en el cardiomiocito. Sin embargo se ha propuesto como candidatos al receptor de angiotensina II subtipo 1 (AT1), a las integrinas y a otras proteínas de la membrana plasmática del cardiomiocito (Ruwhof y van der Laarse, 2000). De igual manera, tampoco está claro si el estrés mecánico es una señal que por sí misma induce hipertrofia o si lo hace a través de la liberación de factores neurohumorales.

Si bien se ha mostrado que el estrés mecánico estimula la liberación de angiotensina II desde los

cardiomiocitos y los fibroblastos y que este péptido al activar sus receptores AT1 induce cascadas de señalización que llevan a la hipertrofia cardiaca (Sadoshima *et al.*, 1993), también se ha observado que la activación de los receptores AT1 por estrés mecánico puede ser independiente de la presencia de angiotensina II (Zhou *et al.*, 2010). Se ha descrito que la señalización del receptor AT1 durante el estrés mecánico es independiente de la liberación de angiotensina II pero dependiente de β -arrestina (Rakesh K *et al.*, 2010).

Por otro lado, estudios en cardiomiocitos adultos de conejo hipertrofiados con estrés mecánico, mostraron que no es necesaria la activación de los receptores AT1, ya que al utilizar un antagonista no se impide la hipertrofia del cardiomiocito (Blaauw *et al.*, 2010); además, cardiomiocitos aislados del ratón knock out para el receptor AT1 también se hipertrofian en respuesta a estrés mecánico (Kudoh *et al.*, 1998). Estos datos sugieren que otro receptor, diferente al receptor AT1, podría regular la generación de hipertrofia por estrés mecánico, actuando como un mecanosensor.

El mecanismo más utilizado para generar estrés mecánico en cardiomiocitos aislados consiste en cultivar los cardiomiocitos sobre una membrana deformable, la que se somete a estiramiento en forma automatizada (Komuro *et al.*, 1989; Sunters *et al.*, 2010; Blaauw *et al.*, 2010). Sin embargo, un método alternativo es el tratamiento de los cardiomiocitos con una solución hiposmótica, lo cual produciría estiramiento del sarcolema. Esta última forma de generación de estrés mecánico se ha utilizado para estudiar los cambios en la actividad de canales de la membrana plasmática (Hayabuchi *et al.*, 2011). Rakesh *et al.* 2010 mostraron que el tratamiento con solución hiposmótica es equivalente al estiramiento mecánico (Rakesh *et al.*, 2010).

Policistinas

Las policistinas (policistina-1 y policistina-2) son proteínas que se expresan en diversos tipos celulares, entre ellos cardiomiocitos, células epiteliales y músculo liso vascular. Forman parte de la estructura de los cilios primarios y además se encuentran formando parte de las uniones adherentes, adhesiones focales, desmosomas y vesículas apicales. Las policistinas actúan como mecanosensores o quimiosensores en los cilios primarios, transduciendo las señales extracelulares en aumentos de Ca^{2+} intracelulares (Dalagiorgou *et al.*, 2010).

Relación entre policistinas e hipertrofia cardíaca

La enfermedad poliquistica renal (ADPKD) es una de tipo autosómica dominante originada por mutaciones somáticas que derivan en la pérdida homocigota de cualquiera de los dos genes que codifican para las policistinas. Sin embargo, la mayoría de los casos de ADPKD son por mutaciones en el gen que codifica para la proteína policistina-1. Esta enfermedad tiene una incidencia de 1:400 a 1:1.000 en la población en general (Harris y Torres., 2009). La ADPKD se caracteriza por la formación bilateral de quistes renales, lo que conlleva a deterioro de la función renal (Harris y Torres., 2009). En estos pacientes además se presentan síntomas extra renales, como hipertensión arterial, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Chapman *et al.*, 2010). El desarrollo de hipertrofia cardíaca habitualmente se asocia en estos pacientes a la presencia de daño renal e hipertensión arterial, pero se ha observado el desarrollo de hipertrofia en pacientes jóvenes que aún no presentan estas sintomatologías y en los que tampoco se observa mayor activación del sistema renina-angiotensina (Chapman *et al.*, 1997); por lo que las policistinas podrían tener una acción directa en el cardiomiocito y en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca.

Policistina-1

Policistina-1 (PC-1) es proteína de membrana plasmática formada por 4.303 aminoácidos y codificada por el gen PKD1. Policistina-1 es un receptor acoplado a proteína G atípico (Delmas *et al.*, 2002) compuesto de 11 dominios transmembrana, un gran dominio N-terminal extracelular que puede ser cortado y que participa en interacciones célula-célula y célula-matriz (Dalagiorgouet *et al.*, 2010) y un C-terminal citoplasmático de aproximadamente 200 aminoácidos que también puede ser escindido y así regular diversas vías intracelulares (Chauvet *et al.*, 2004), entre ellas la vía β -catenina (Kim *et al.*, 1999; Lal *et al.*, 2008), JAK-STAT (Talbot *et al.*, 2011), AP-1 (Arnould *et al.*, 1998) y mTOR (Shillingford *et al.*, 2006; Dere *et al.*, 2010), entre otras.

Policistina-1 interactúa con policistina-2 a través de una interacción cola-cola, formando un complejo que regula la entrada de Ca^{2+} inducida por un estímulo mecánico (Dalagiorgouet *et al.*, 2010). Además, las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica acoplada a policistina-1 regulan a policistina-2 (Delmas *et al.*, 2002). Por otra parte, policistina-1 también se activa fuera del complejo con policistina-2, actuando como un mecanosensor, recibiendo señales desde los cilios primarios, las que se traducirían en respuestas celulares que regulan la proliferación, adhesión, diferenciación y morfología celular. Se ha postulado que el dominio N-terminal de esta proteína podría ser el sensor a estos estímulos extracelulares (Qian *et al.*, 2005).

Policistinas e IGF-1

Células de epitelio renal de pacientes con ADPKD que presentan disminución o ausencia de policistina-1, no así de policistina-2, presentan aumentada la sensibilidad a IGF-1 (Parker *et al.*, 2007) y lo mismo ocurre con células de quistes de epitelio biliar intrahepático de ratones deficientes para policistina-2 (Spirli *et al.*, 2010). Estos antecedentes sugieren una probable regulación entre las policistinas e IGF-1.

Hipertrofia cardiaca y β -catenina

Se ha mostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que la vía β -catenina es una de las vías que regulan la aparición de la hipertrofia cardiaca (Haq *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007). Beta-catenina forma parte de la señalización canónica de la vía Wnt. En condiciones basales β -catenina se encuentra en el citoplasma formando un complejo multiproteico con las proteínas APC, axina y GSK3 β , esta última fosforila a β -catenina y promueve su degradación proteosomal, por lo tanto la inhibición de GSK3 β tiene como consecuencia la estabilización de β -catenina en el citoplasma y su posterior migración al núcleo y activación transcripcional dependiente del factor TCF/LEF. Cuando el ligando Wnt se une a su receptor de membrana Frizzled, esto activa al regulador positivo de esta vía, Disheveled 1, llevando a la fosforilación e inhibición de GSK3 β con la consecuente estabilización de β -catenina (Bergman *et al.*, 2010).

Estímulos prohipertróficos fosforilan a GSK3 β en serina 9, lo que tiene un efecto inhibitorio en la actividad de esta quinasa (Haq *et al.*, 2003). El aumento en la presión intraventricular por constricción aórtica transversa (TAC) como un estímulo hipertrófico, rápidamente aumenta la fosforilación de GSK3 β *in vivo* y la inhibición de GSK3 β con litio tiene un efecto aditivo en la hipertrofia producida por sobrecarga de presión (Tateishi *et al.*, 2010). Además, β -catenina funciona como un regulador positivo de la hipertrofia en cardiomiocitos tratados con fenilefrina y su disminución atenúa la hipertrofia; el promotor del gen del péptido natriurético auricular (ANP) tiene sitios de unión para el factor transcripcional LEF1 y el tratamiento con fenilefrina aumenta el reclutamiento de β -catenina al promotor de ANP (Zhang *et al.*, 2009). Por último, la interrupción de la vía Wnt en un modelo knock out para el regulador positivo de la vía Wnt, Disheveled 1, atenúa la hipertrofia producida por sobrecarga de presión mediante un mecanismo que involucra a GSK3 β y β -catenina (van de Schans *et al.*, 2007).

Policistina-1 y β -catenina

La evidencia de la literatura sobre la regulación que ejerce policistina-1 sobre β -catenina es controversial. Mientras Kim *et al.* 1998 indican que la sobreexpresión del fragmento C-terminal de policistina-1 estabiliza a β -catenina en el citoplasma, permitiendo su migración al núcleo y activación transcripcional de sus genes blanco (Kim *et al.*, 1998), Lal *et al.* 2008 indican que el fragmento C-terminal de policistina-1 regula negativamente a β -catenina, uniéndose a ella en el núcleo e impidiendo que ocurra activación transcripcional (Lal *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha observado policistina-1 y β -catenina forman parte de un complejo multiproteico en la membrana plasmática y en sitios de unión célula-célula junto a E-cadherina y β -catenina (Huan *et al.*, 1999).

A este antecedente se suma que en muestras de quistes de pacientes con ADPKD que tienen mutaciones en policistina-1, la vía Wnt está activada (Lal *et al.*, 2008). Estas evidencias indican que existiría una regulación entre policistina-1 y el funcionamiento de la vía Wnt.

IGF-1 y β -catenina

Tanto en osteoblastos (Sunters *et al.*, 2009) como en una línea celulares de hepatocito (Desbois-Mouthon *et al.*, 2001) se ha descrito que la activación del receptor de IGF-1 inhibe a GSK3 β a través de la vía PI3K-Akt, lo que conlleva a la acumulación de β -catenina en el citoplasma y aumento de su actividad transcripcional dependiente de TCF/LEF.

Con respecto a la hipertrofia cardiaca, la estimulación de los cardiomiocitos con IGF-1 inhibe a GSK3 β por fosforilación en serina 9 a través de la vía de PI3K-Akt. La sobreexpresión de una forma no fosforilable de GSK3 β inhibió los efectos prohipertróficos de IGF-1, por lo que GSK3 β sería un regulador negativo de la hipertrofia inducida por IGF-1 (Seimi *et al.*, 2004). No hay información respecto a qué ocurre con β -catenina posterior a la activación del receptor de IGF-1 en el cardiomiocito.

De los antecedentes descritos anteriormente se desprenden las siguientes preguntas:

- Es policistina-1 un regulador de la hipertrofia del cardiomiocito?
- ¿Media policistina-1 la hipertrofia inducida por estímulos neuroendocrinos, como IGF-1?
- Si es así, ¿Cuál es el mecanismo involucrado?

2. HIPÓTESIS

Policistina-1 media la hipertrofia del cardiomiocito inducida por el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1).

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar si policistina-1 participa en la hipertrofia del cardiomiocito inducida por el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1).

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Objetivo específico 1:** *Estudiar si policistina-1 participa en la hipertrofia del cardiomiocito de rata inducida por IGF-1 o estrés mecánico.*
- **Objetivo específico 2:** *Determinar cómo policistina-1 regula la activación de la red transduccional Akt, ERK y Calcio activada por IGF-1.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo primario de cardiomiocitos de rata

Los cardiomiocitos se obtuvieron desde corazones de ratas neonatas de 2 a 3 días de edad siguiendo el protocolo descrito por Galvez et al., 2001. Brevemente, los corazones se aislaron, las aurículas removidas, se disgregaron mecánicamente los ventrículos y se sometieron a digestiones sucesivas con colagenasa tipo II y pancreatina. Las células aisladas se pre plaquearon por 2 h a 37 °C para remover los fibroblastos. Posteriormente, los cardiomiocitos se recolectaron y resuspendieron en medio de mantención (MM) (DME:M199, 4:1) suero fetal bovino (SFB) 5% y suero fetal caprino (SFC) 10%. Se sembraron según las necesidades experimentales en MM 5% SFB-10% SFC, en presencia de 5-bromo-2'-deoxiuridina, sobre placas de cultivo cubiertas con gelatina (2% p/v). Los cardiomiocitos se mantuvieron en incubadores termorregulados, a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% aire al menos por 24 h en medio con suero antes de exponerlos a cualquier estímulo.

5.2. Estímulos hipertróficos

Después de 24 h posteriores al sembrado, las células se lavaron y se dejaron por 24 h con medio de mantención en ausencia de suero fetal. Transcurrido este tiempo los cardiomiocitos se estimularon con IGF-1 10 nM (IGF-1 recombinante humano donado por el Dr. C. George-Nascimento, Austral Biologicals, San Ramon, CA), entre 0 y 48 h, dependiendo del experimento, basados en nuestros trabajos previos (Foncea *et al.*, 1997; Lavandero *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2004). También se utilizaron como estímulos hipertróficos Norepinefrina (NE, concentración 10 µM, Sigma, número de catálogo A7257) o soluciones hiposmóticas (SH, 30 y 50%) (Medio de mantención diluido con agua bidestilada)

5.3. Silenciamiento de PC-1

Los cardiomiocitos, posterior al lavado, se transfectaron con 140 nM de siRNA, disuelto en agua libre de RNasas, contra policistina-1 (Sigma, número catálogo SASI_Rn01_00193562) o con un siRNA control (Sigma, número catálogo SIC001) por toda la noche en medio Opti-MEM (Invitrogen, número catálogo 31985070), como vehículo de transfección se utilizó oligofectamina (Invitrogen, número catálogo 12252011, 0,003% por 12 a 14 h). Posteriormente se cambió el medio de transfección por medio de mantención y 24 h después se realizaron los estímulos. Para disminuir los niveles proteicos de policistina-1 y así poder estudiar su rol en la hipertrofia del cardiomiocito se utilizó un siRNA específico para esta proteína. A las 24 h post transfección ya se apreció una disminución de los niveles proteicos de aproximadamente un 50% que se mantuvo a las 48 h post-transfección (Figura 1).

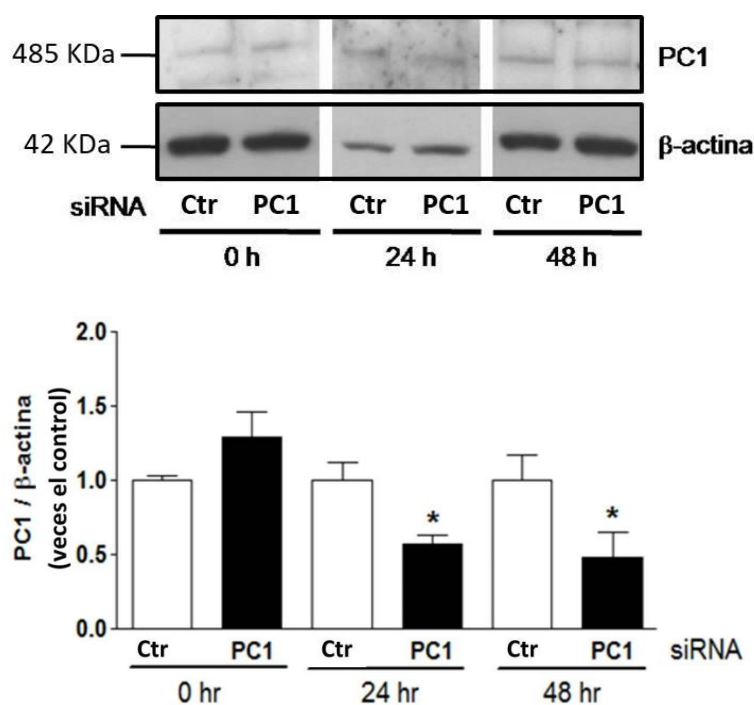


Figura 1: siRNA específico para Policistina-1 disminuye los niveles proteicos de esta proteína. Niveles proteicos de policistina-1 determinados por Western blot. * $p < 0,05$ vs siCtrl. $n = 3$.

5.4. Extracción de proteínas

Los cardiomiocitos se lisaron con tampón de lisis RIPA, se centrifugaron a 10.000 x g por 10 min a 4°C, se rescataron los sobrenadantes siguiendo el protocolo descrito por Foncea et al. 1997. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU) y se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20°C. (Bradford, 1976)

5.5. Western blot

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, las muestras se mezclaron con tampón de carga 4X y se hirvieron por 3 min, y se cargaron alrededor de 30 µg de extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 4% y el separador al 7%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante (100 V) en tampón de electroforesis. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,20 µm a 0,35 A por 90 min en tampón de transferencia. Una vez transferidas, la membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (TBS 1X; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios a una dilución 1:1.000 (Policistina-1), 1:3.000 (β-MHC), 1:1.000 pAkt y Akt total, 1:1.000 pERKs y ERK total, 1:5.000 GAPDH, en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1%; leche descremada 5% p/v) toda la noche a 4°C con agitación suave. Luego, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1%, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, según corresponda, en un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0,1%. Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot ECL y se

revelaron en un equipo automatizado Diversity. Después de realizar los ensayos de Western blot, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) para desprender los anticuerpos.

5.6. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para todos los experimentos en que se realizó citometría de flujo, se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Se utilizó la sonda 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR) (excitación: 488 nm, emisión: 515 nm), preincubada por 30 min y peróxido de hidrógeno 100 μ M, como control (15 min antes de la determinación). Una vez finalizados los tratamientos y la carga de la sonda respectiva, se removió el medio y las células se soltaron utilizando 300 μ L de una solución de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS durante 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min de tripsinización, la reacción se detuvo utilizando SFB en una proporción 1:10. Posteriormente, las células ya cargadas se traspasaron a tubos BD para citometría y su fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo FACS – SCAN (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, EEUU).

5.7. Incorporación de leucina

Los cardiomiocitos de rata neonata se cultivaron como se describió anteriormente. Al medio de cultivo se adicionó [³H-Leucina] (1 mCi/mL, Perkin-Elmer). Después del tratamiento los cardiomiocitos se lavaron tres veces con PBS frío y se incubaron con ácido tricloroacético 10% por 30 min a 4 °C, posteriormente se lavaron tres veces con etanol 95% frío. Las células se lisaron en 1 mL de NaOH por 6 h a 37 °C en agitación. Los lisados se neutralizaron con 1 mL de HCl 0,5 N y el contenido total de cada pocillo se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman) (Pedrozo *et al.*, 2015)

5.8. Ensayo de gen reportero

Los cardiomiocitos se transfectaron con 0,5 µg de plasmidios pTOP-FLASH (reportero para Tcf/Lef) pFOP-FLASH (sitios de unión para Tcf/Lef mutados) estos plasmidios fueron donados por el Dr. Hans Clevers (Hubrecht Laboratory, Uppsala, Holanda) (Torres *et al.*, 2007) y como control de transfección se utilizó el plasmidio pRL TK (reportero timidina quinasa acoplado a luciferasa-renilla). Los cardiomiocitos se transfectaron por 6 h, posteriormente se mantuvieron en medio de mantención por 24 h antes de los estímulos y se estimularon con IGF-1 10 nM o fenilefrina 100 µM por 24 h. La actividad luciferasa se determinó utilizando el kit comercial Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). La emisión de luz se midió en un luminómetro (Synergy 2, BioTek) a temperatura ambiente.

5.9. Inmunofluorescencia indirecta

Posterior al cultivo, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2 %). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h. Posteriormente, para determinar la distribución subcelular de β -catenina, las células se incubaron con los anticuerpos anti: β -catenina (dilución 1:100), en PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y protegidas de la luz con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti IgG de ratón (dilución 1:300) y Hoechst (dilución 1:1.000) para visualizar los núcleos; las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje. Luego, se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX 81 DSU objetivo 40X con cámara XM10. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU).

5.10. Determinación del área y perímetro celular

Para determinar el área celular, los cardiomiocitos se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2 %). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS (filtrado) durante 1 h. Las células se trataron con la sonda faloidina-rodamina (dilución 1:500) y Hoechst (dilución 1:1.000) para visualizar los núcleos. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX 81 DSU objetivo 40X con cámara XM10. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Image J (NIH, EEUU).

5.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos corresponder al promedio \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes (salvo se indique lo contrario). Los resultados se comparan utilizando ANOVA con post test Bonferroni, a menos que se especifique otro post test. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Objetivo específico 1. Determinar si Policistina-1 participa en la hipertrofia del cardiomiocito de rata inducida por IGF-1 o por estrés mecánico.

6.1.1. Policistina-1 es necesaria para el aumento del marcador de hipertrofia β -MHC inducido por IGF-1

Para determinar el papel de PC-1 en la hipertrofia inducida por IGF-1, los cardiomiocitos se estimularon con IGF-1 (10 nM) por 48 h y se analizaron distintos marcadores de hipertrofia como los niveles de la isoforma beta de la cadena pesada de la miosina (β -MHC), parámetros morfológicos, como área y perímetro celular, y el porcentaje de células que presentan el citoesqueleto de actina organizado en sarcómeros. Los niveles de la proteína β -MHC se determinaron por Western blot. Como se muestra en la Figura 2, el aumento de β -MHC inducido por IGF-1 está disminuido en los cardiomiocitos tratados con el siRNA PC-1.

6.1.2. Policistina-1 se requiere para el aumento en el área y perímetro celular inducido por IGF-1.

El tamaño celular inducido por IGF-1 se ve reflejado en un incremento en el perímetro y en el área de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos se trataron con IGF-1 10 nM por 48 h y tiñó el citoesqueleto de actina con la sonda fluorescente faloidina-rodamina, se determinó el área y perímetro celular usando el programa ImageJ, cuantificando la extensión de la marca fluorescente. En los cardiomiocitos tratados con IGF-1 y cuya PC-1 se encuentra silenciada no se observó dicho aumento en el área ni perímetro celular (Figura 3).

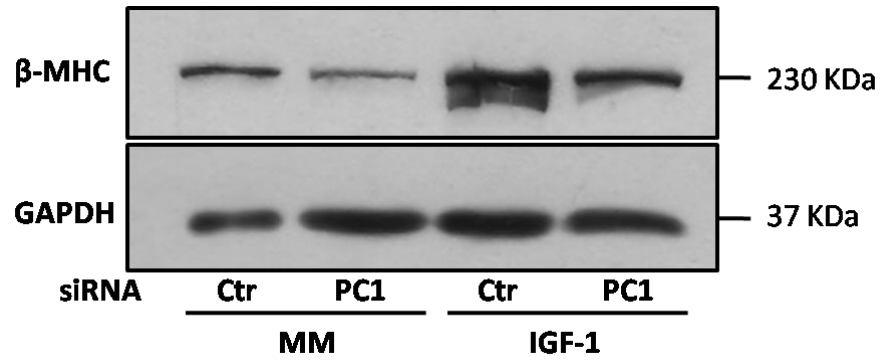
6.1.3. Policistina-1 se requiere para el aumento en la sarcomerización inducido por IGF-1

La reorganización del citoesqueleto de actina en sarcómeros es otra característica que presentan

los cardiomiocitos al desarrollar hipertrofia. Se determinó la presencia de estructuras sarcoméricas y el porcentaje de cardiomiocitos que presentaban esta reorganización en imágenes de células cardíacas teñidas con faloidina-rodamina. Una forma de visualizar la reorganización del citoesqueleto de actina es la organización a lo largo de un sarcómero mediante una línea y determinar su fluorescencia. La presencia de sarcómeros se aprecia al encontrarse con oscilaciones regulares de la fluorescencia, como ocurre en las células tratadas con IGF-1 en presencia del siRNA control (Figura 4A); si no hay sarcómeros no se observa este patrón regular en distribución de la fluorescencia, como se observa en los cardiomiocitos tratados con el siRNA para PC-1 y estimulados con IGF-1 (Figura 4B). El tratamiento con IGF-1 (10 nM) por 48 h indujo la aparición de estructuras sarcoméricas en un 75% de los cardiomiocitos, en presencia del siRNA control. En el caso de los cardiomiocitos tratados con el siRNA contra PC-1, la presencia de sarcómeros se atenuó significativamente (27% de las células observadas) (Figura 4C)

Los resultados descritos muestran que tanto el marcador bioquímico de hipertrofia, β -MHC, como los marcadores morfológicos, el área y perímetro celular, y el grado de sarcomerización, muestran que PC-1 es necesaria para que se desarrolle hipertrofia en los cardiomiocitos en respuesta a IGF-1.

A



B

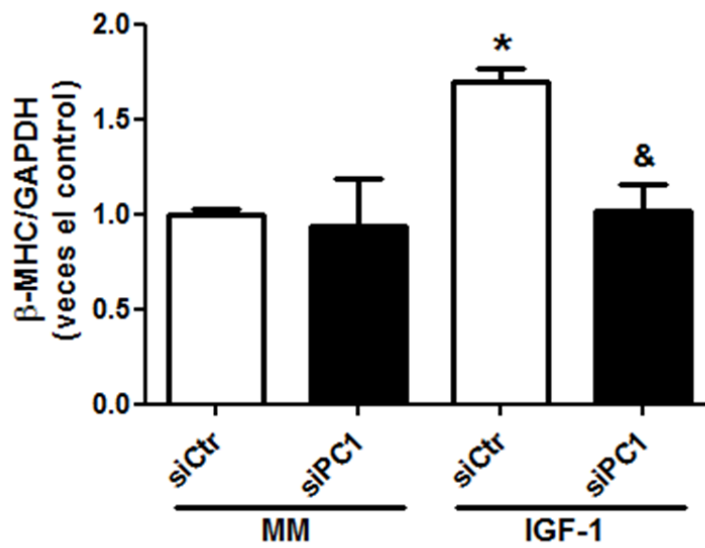


Figura 2: Disminución en los niveles de PC-1 inhibe el aumento de β -MHC dependiente de IGF-1. A: Western blot para β -MHC de cardiomiocitos estimulados con IGF-1 10 nM por 48 h. B: Cuantificación de los niveles de β -MHC. siCtr: siRNA control. siPC1: sRNA contra PC-1. MM: Medio de mantención. * $p < 0,05$ vs siCtr MM, & $p < 0,05$ vs siCtr IGF-1. $n=4$. Los datos corresponden al promedio \pm SEM.

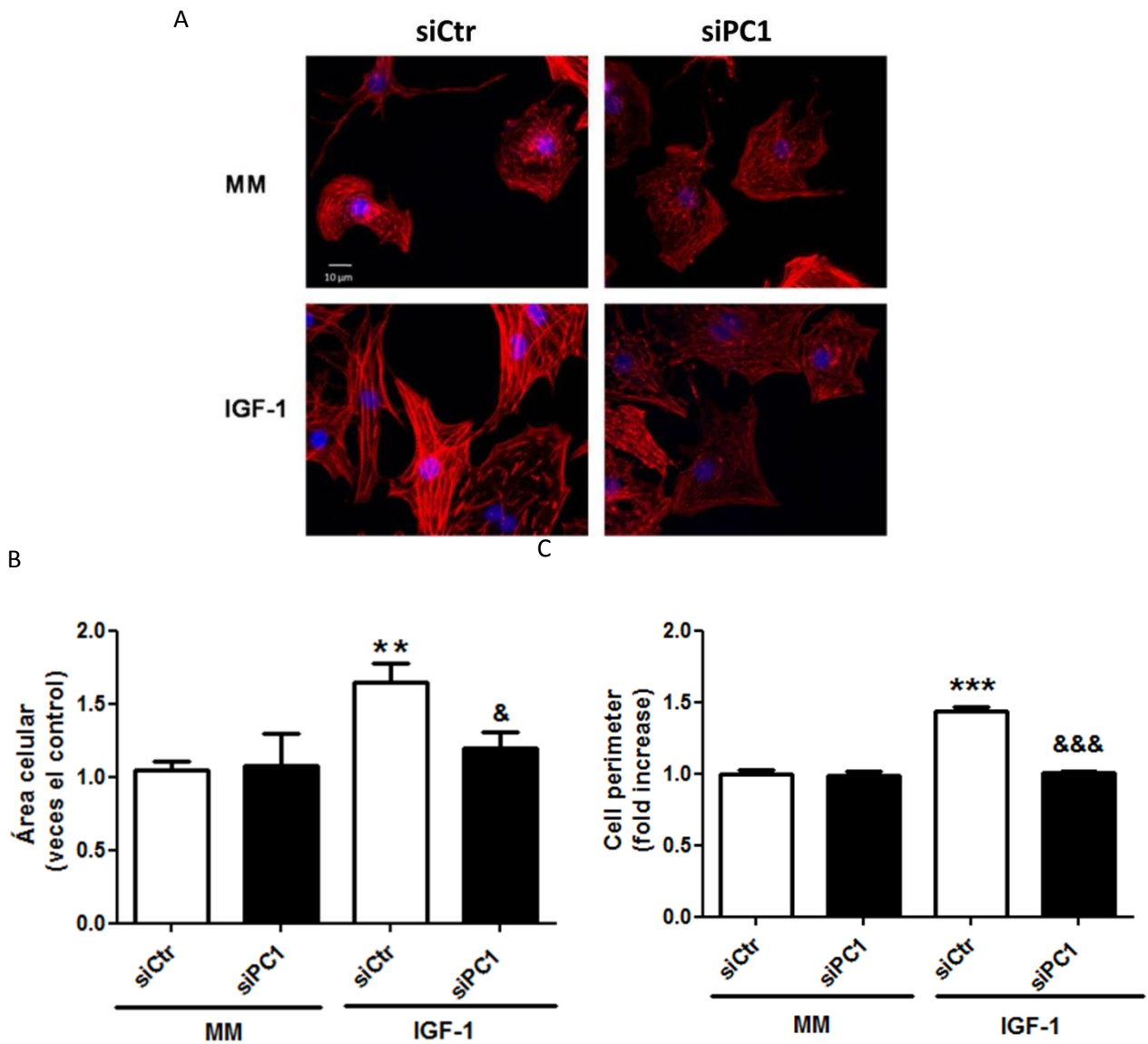


Figura 3: Disminución en los niveles de PC-1 inhibe el aumento en el área y perímetro celular dependientes de IGF-1. A: Tinción del citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina de cardiomiocitos tratados con IGF-1 (10 nM) por 48 h. Rojo: faloidina-rodamina. Azul: Hoechst. B: Cuantificación del área celular. C: Cuantificación del perímetro celular. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA contra policistina-1. MM: medio de mantenimiento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs siCtr MM, & $p < 0,05$; &&& $p < 0,001$ vs siCtr IGF-1. $n = 3$. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

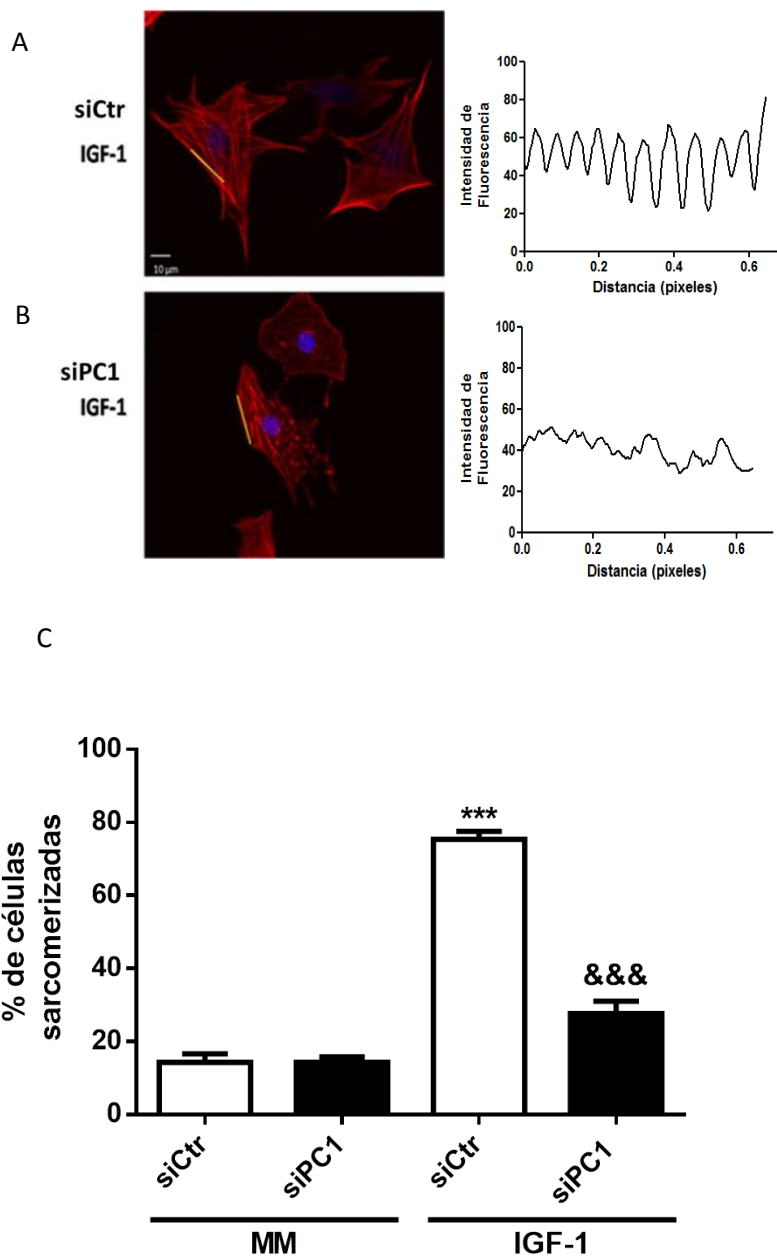


Figura 4: PC-1 se requiere para el aumento en la sarcomerización dependiente de IGF-1.

A: Tinción del citoesqueleto de actina con falloidina-rodamina y visualización de los sarcómeros trazando una línea y determinación del patrón de fluorescencia a lo largo de esta línea en presencia del siRNA control (A) y contra policistina-1 (B) en cardiomiocitos estimulados con IGF-1. C: Cuantificación de células que presentan reorganizado el citoesqueleto de actina en sarcómeros. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. MM: medio de mantenimiento. *** $p < 0,001$ vs siCtr MM; &&& $p < 0,001$ vs siCtr IGF-1. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. $n = 3$.

6.1.4. Disminución en los niveles de policistina-1 con un siRNA específico previene el aumento del marcador de hipertrofia β -MHC inducido por hiposmolaridad.

Los cardiomiocitos se trataron con las soluciones hiposmóticas 30 y 50% y se determinaron los niveles de la proteína β -MHC por Western blot. El tratamiento con las soluciones hiposmóticas aumentó el contenido de este marcador de hipertrofia cuando se utilizó el siRNA control (siCtr), pero este aumento que no se observó al utilizar el siRNA para Policistina-1 (Figura 5)

6.1.5. Policistina-1 regula el aumento en la incorporación de leucina inducido por estrés mecánico por hiposmolaridad.

Otra forma de determinar la hipertrófia es a través de la incorporación de leucina tritiada, que da cuenta del aumento en la síntesis de proteínas. Se midió la incorporación de Leucina tritiada, como marcador de la síntesis de proteínas e hipertrofia, en los cardiomiocitos posterior al estrés hiposmótico. El tratamiento con las soluciones hiposmóticas aumenta significativamente la incorporación de leucina tritiada, lo mismo ocurre con norepinefrina, utilizada como control positivo para el desarrollo de hipertrofia. Las células tratadas con el siRNA contra PC-1 no presentan dicho aumento. (Figura 6)

Estos resultados (Figuras 5 y 6) muestran que policistina-1 es necesaria para el desarrollo de hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por estrés mecánico, determinado tanto por el contenido proteico del marcador de hipertrofia β -MHC como por el aumento en la síntesis de proteínas (incorporación de leucina).

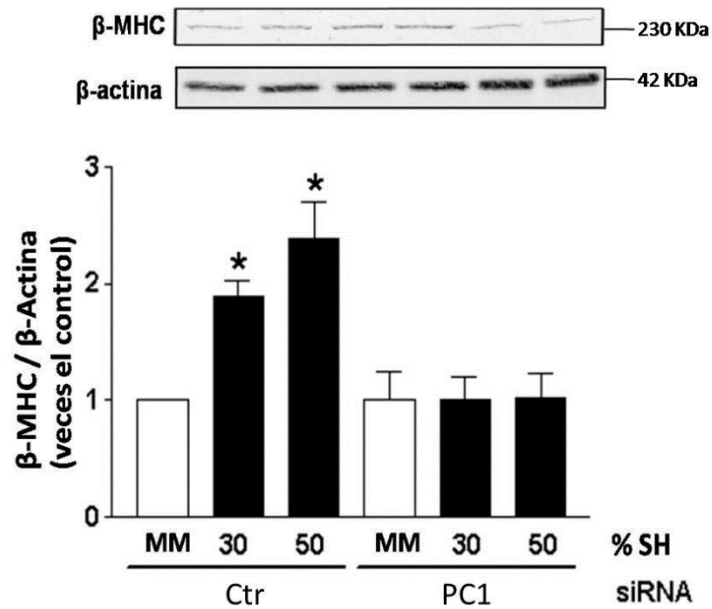


Figura 5: siRNA para Policistina-1 previene el aumento de β -MHC inducido por hiposmolaridad. Los cardiomiocitos se trataron con siRNA para policistina-1 y luego se incubaron con las soluciones hiposmóticas al 30 ó 50% por 48 h. Los niveles de la proteína β -MHC se determinaron por Western blot. siCtr: siRNA control. PC1: siRNA contra policistina-1. MM: medio de mantención. * $p < 0,05$ vs MM. $n \geq 3$.

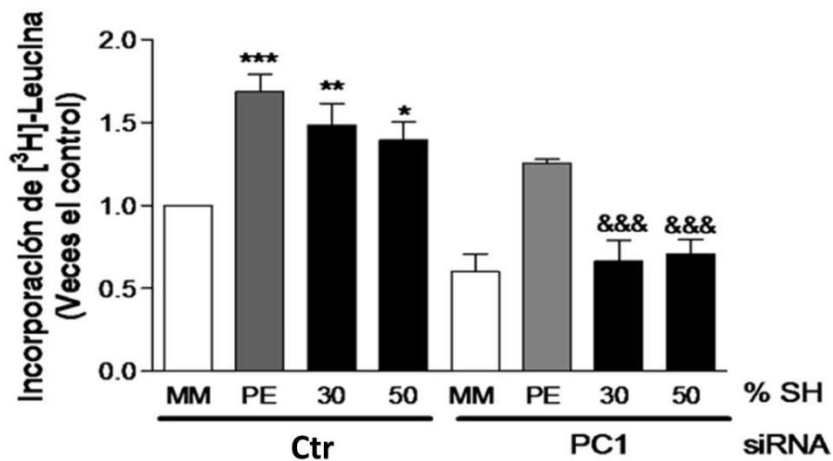


Figura 6: Policistina-1 regula el aumento en la incorporación de leucina inducido por estrés mecánico. Los cardiomiocitos se trataron con siRNA para policistina-1 y luego se incubaron con las soluciones hiposmóticas al 30 y 50% por 48 h en un medio con leucina tritiada. siCtr: siRNA control. PC1: siRNA contra policistina-1. PE: fenilefrina (50 μ M). MM: medio de mantención. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs MM. &&& $p < 0,001$ vs & siCtr. $n \geq 3$.

6.2. Objetivo específico 2: Determinar cómo PC-1 regula la activación de la red transduccional Akt, ERK y Calcio activada por IGF-1.

6.2.1 La disminución de los niveles de PC-1 atenúa la fosforilación del receptor de IGF-1 dependiente de IGF-1.

Dado que río abajo del receptor de IGF-1 se activan las proteínas quinasas ERK y Akt, y además se producen aumentos intracelulares de Ca^{2+} (Ibarra *et al.*, 2004, Ibarra *et al.*, 2013), se planteó la interrogante si alguna de estas vías transduccionales podría estar regulada por PC-1, por lo que se estudiaron cada una de ellas. Para dilucidar el mecanismo por el cual PC-1 puede regular la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por IGF-1, en primer lugar se estudió la fosforilación de la subunidad β del IGF-1R, ya que este es el primer evento en la cascada de señalización del IGF-1 (Foncea *et al.*, 1997). La Figura 7 muestra el resultado de la evaluación de los niveles de las formas fosforilada y total de la subunidad beta del IGF1R por análisis de Western blot. IGF-1 produjo una rápida fosforilación del receptor de IGF-1, la que fue atenuada cuando están disminuidos los niveles de PC-1 (Figura 7B). Sin embargo esto ocurre sin afectar los niveles totales de la subunidad β del IGF-1R (Figura 7C).

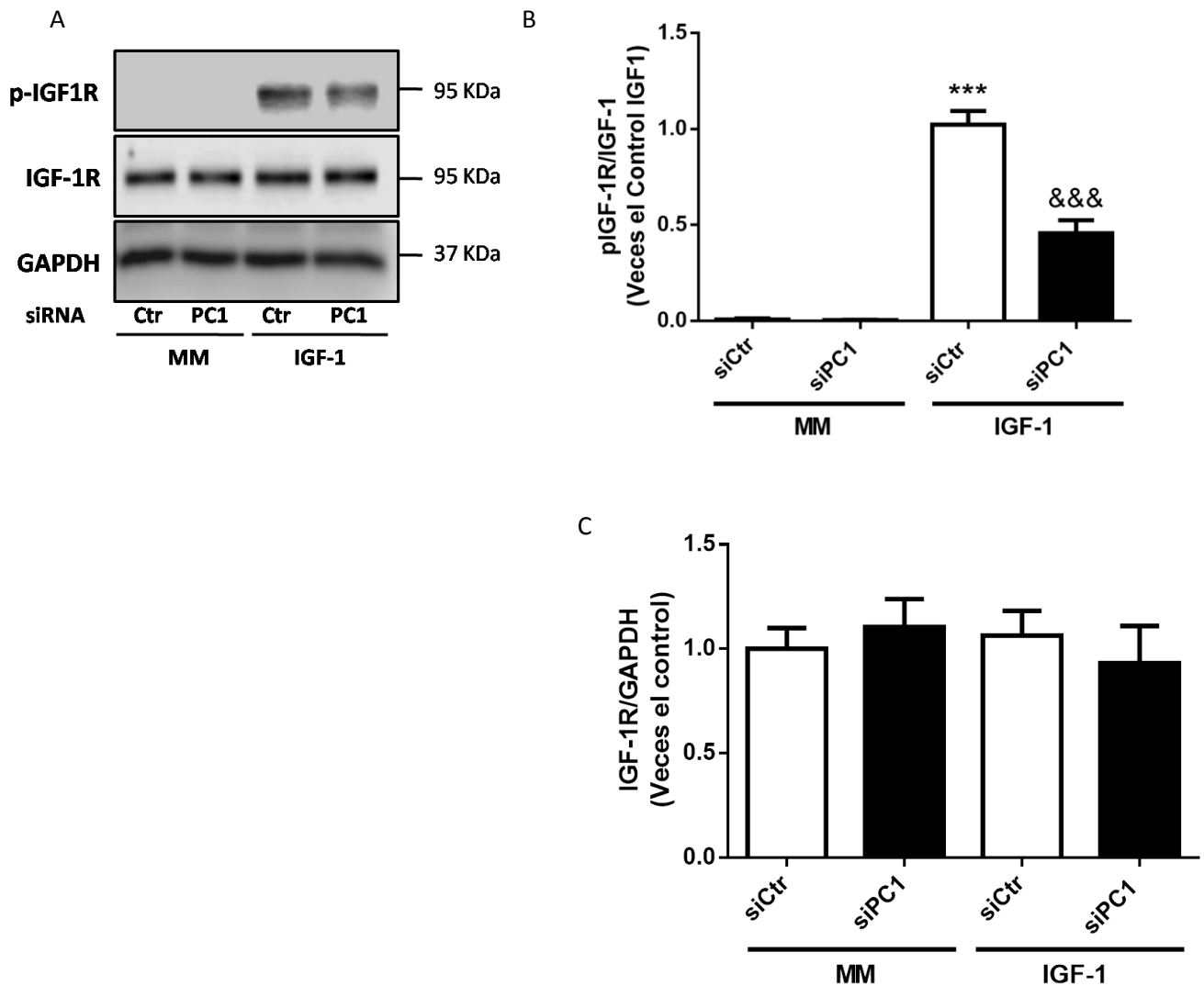


Figura 7: Disminución de los niveles de PC-1 atenúa la fosforilación del receptor de IGF-1 dependiente de IGF-1. A: Análisis de Western blots para la subunidad β del IGF-1R fosforilada y total y para GAPDH. Cuantificación de los niveles de la forma fosforilada (panel B) y total (panel C) de subunidad β del IGF-1R. MM: medio de mantención. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA contra PC1. *** $p < 0,001$ vs siCtr MM, & $p < 0,05$ vs siCtr IGF-1. $n = 6$. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.2. La fosforilación de Akt inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC1.

El IGF-1R activa distintas vías transduccionales, entre ellas se encuentran Akt y ERK, las que dependen de la actividad tirosina quinasa del receptor y aumentos de calcio intracelular

dependientes de IP_3 , que depende del acoplamiento a una proteína $G\alpha_i$. Con el fin de determinar cuál o cuáles de estas vías se ven afectadas al disminuir los niveles de policistina-1 se estudiaron cada una de ellas. Akt requiere de dos fosforilaciones para su completo estado de activación, la primera ocurre en la treonina 308 y la segunda en serina 473. Con esta segunda fosforilación, Akt se encuentra completamente activa. Para determinar si la fosforilación de Akt en la serina 473 se afecta en los cardiomiocitos que tienen disminuídos los niveles de PC-1 se realizaron Western blots para evaluar los niveles de las formas fosforilada y total de Akt. El tratamiento con IGF-1 (10 nM) por 5 min induce la fosforilación de Akt, tal como está descrito en literatura, mientras que su fosforilación se atenúa tras los 5 min de estimulación con IGF-1 en los cardiomiocitos con menores niveles de PC-1 (Figura 8).

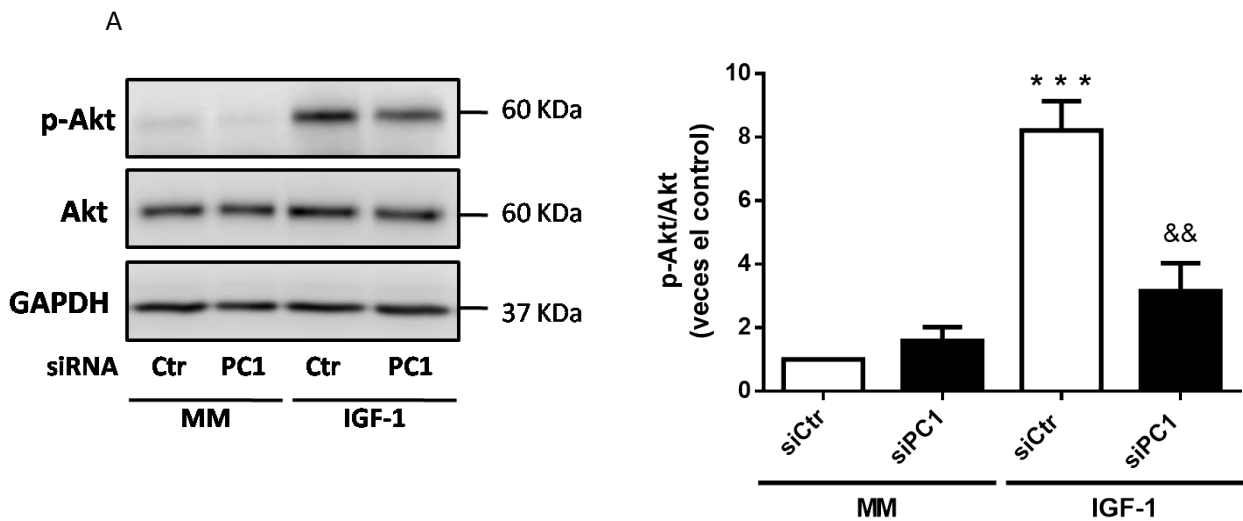


Figura 8: Fosforilación de Akt inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC1. A: Western blots contra Akt fosforilada en serina 473, Akt total y GAPDH. B: Cuantificación de los niveles de fosfo-Akt (S473). MM: medio de mantención. siCtrl: siRNA control. siPC1: siRNA contra policistina-1. *** $p < 0,001$ vs siCtrl MM, && $p < 0,01$ vs siCtrl IGF-1. $n = 6$. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.3. La fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de policistina-1.

La vía ERK es otra de las vías transduccionales que se activan río abajo del receptor de IGF-1. Se

determinaron los niveles de ERK1/2 fosforiladas después de estimular con IGF-1 (10 nM) por 5 min. El tratamiento con IGF-1 produjo un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2, efecto que es atenuado significativamente al estar disminuidos los niveles de PC-1 (Figura 9).

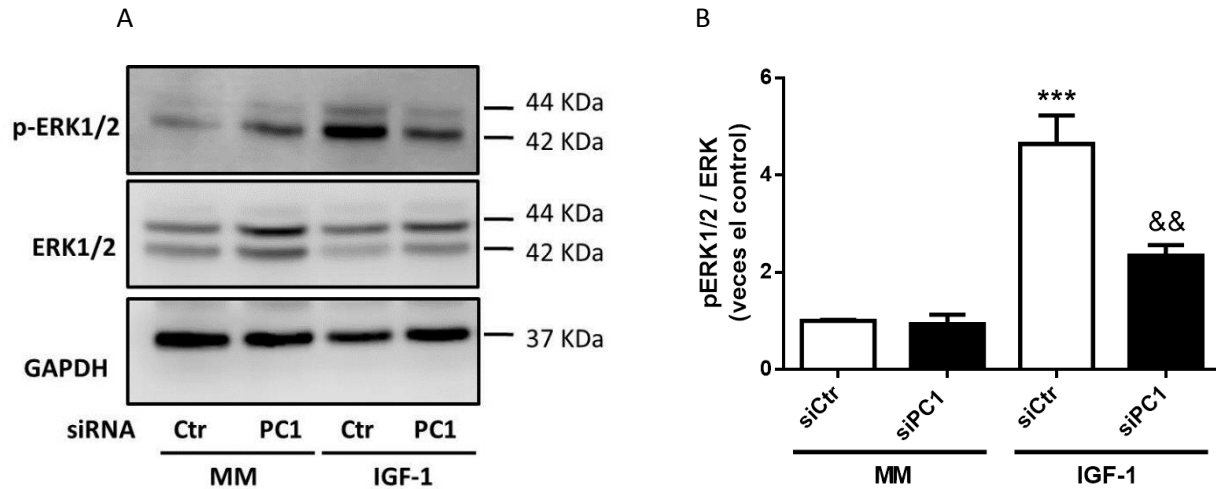


Figura 9: Fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-1 se atenúa al disminuir los niveles de PC-1. A: Western blots para las formas ERK 1/2 fosforiladas y totales y GAPDH. B: Cuantificación de los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2. MM: medio de mantención. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. *** $p < 0,001$ vs siCtr MM, && $p < 0,01$ vs siCtr IGF-1. $n = 4$. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.4. Las cinéticas de calcio dependientes de IGF-1 no se modifican por la reducción de los niveles proteicos de policistina-1.

El IGF-1R en el cardiomiocito se ha descrito con un receptor con actividad tirosina quinasa híbrido (Ibarra et al., 2004) que además de señalar por la vía tirosina quinasa se acopla a una proteína $G\alpha_i$, produciéndose rápidos aumentos de calcio intracelulares dependientes de IP3. Se realizaron cinéticas de calcio con la sonda Fluo3-AM en medio con calcio extracelular (Figura 10). IGF-1 produjo rápidos aumentos de calcio tanto en núcleo (Figura 10A) como en citoplasma (Figura 10B). No se observan diferencias en las cinéticas de calcio al comparar la células con el siRNA control (siCtr) con las que tienen disminuidos los niveles de PC-1 (siPC1), como control positivo se utilizó histamina. Se muestra una cinética representativa

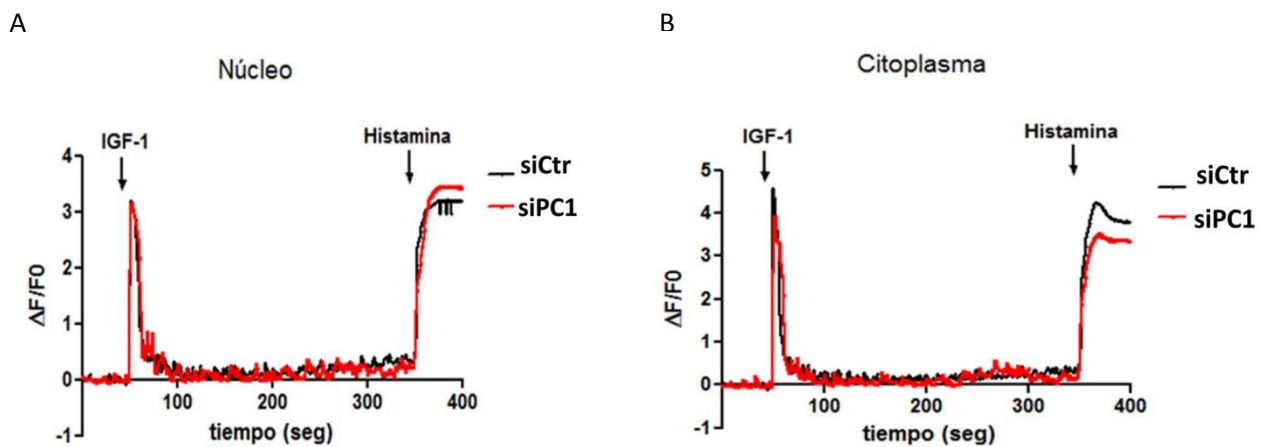


Figura 10: Cinéticas de calcio dependientes de IGF-1 no se alteran por la reducción de los niveles de PC-1. Las cinéticas de calcio se determinaron con la sonda Fluo-3AM. A: Núcleo. B: Citoplasma. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. n = 3.

6.2.5. La reducción de la fosforilación del receptor de IGF-1 estimulada por la disminución de los niveles proteicos de policistina 1 se previene al inhibir proteínas tirosina fosfatasas

Dado que la ausencia de PC-1 produce una menor fosforilación del IGF-1R, se buscó determinar cómo policistina-1 se relaciona con la fosforilación del receptor de IGF-1. Para ello se estudió el efecto de distintos inhibidores de fosfatasas. Se utilizó phos stop, inhibidor general de fosfatasas, ortovanadato de sodio para inhibir sólo tirosina fosfatasas y fluoruro de sodio para inhibir serina/treonina fosfatasas. La Figura 11A muestra un Western blot representativo para el IGF-1R fosforilado (pIGF1R), receptor de IGF-1 total y GAPDH. Para facilitar la explicación de cuál es el efecto de los distintos inhibidores de fosfatasas se muestran separados en tres gráficos distintos (Figuras 11B-D). Estos resultados muestran que el tratamiento previo con el inhibidor de tirosina fosfatasas, ortovanadato de sodio, recupera los niveles de fosforilación del IGF-1R en los cardiomiocitos que tienen disminuídos los niveles de PC-1 (Figura 11B).

Al inhibir tanto tirosina fosfatasas como serina/treonina fosfatasas (phos stop) se mantienen los niveles de fosforilación del IGF-1R en relación a los cardiomiocitos sin inhibidores de fosfatasas (Figura 11C) y al inhibir las serina/treonina fosfatasas (Fluoruro de sodio) la fosforilación del IGF-1R se observa disminuída en ambas condiciones. (Figura 11D).

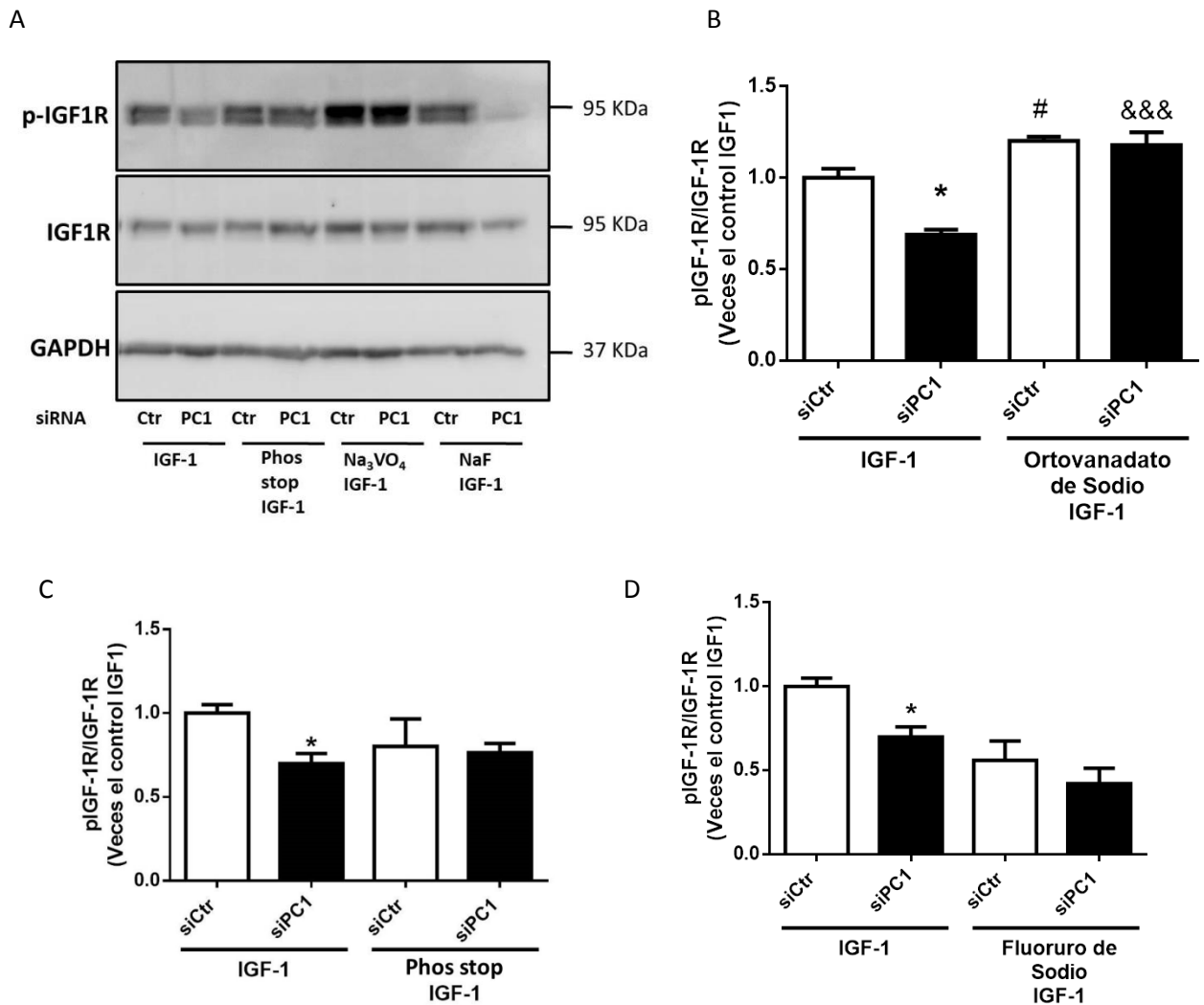


Figura 11: Fosforilación del receptor de IGF-1 inhibida por el siRNA para Policisina 1 se recupera al inhibir tirosinas fosfatasas. A: Western blot representativo para la subunidad β del receptor de IGF-1 fosforilado (pIGF1R), para el receptor total (IGF1R) y GAPDH. Efecto del inhibidor de tirosina fosfatasas ortovanadato de sodio (B), inhibidor general de fosfatasas phos stop (C) y del inhibidor de serina/treonina fosfatasas NaF (D). siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. * $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; # $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; &&& $p < 0,001$ vs siPC1 IGF-1. $n = 5$ Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.6. Disminución de los niveles del receptor de IGF-1 fosforilado inducida por el siRNA para policistina 1 se previene con un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B

Dado que al utilizar el inhibidor general de tirosina fosfatasas, ortovanadato de sodio, se revirtió la disminución en la fosforilación del IGF-1R observada al reducir los niveles de PC-1, se utilizó el inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) CinnGEL-2ME. Al pretratar los cardiomiocitos con CinnGEL-2ME 10 μ M por 1 h y estimular con IGF-1 (10 nM) por 5 min, se revierte la disminución en la fosforilación del receptor de IGF-1 en los cardiomiocitos que tienen disminuídos los niveles de PC-1. (Figura 12)

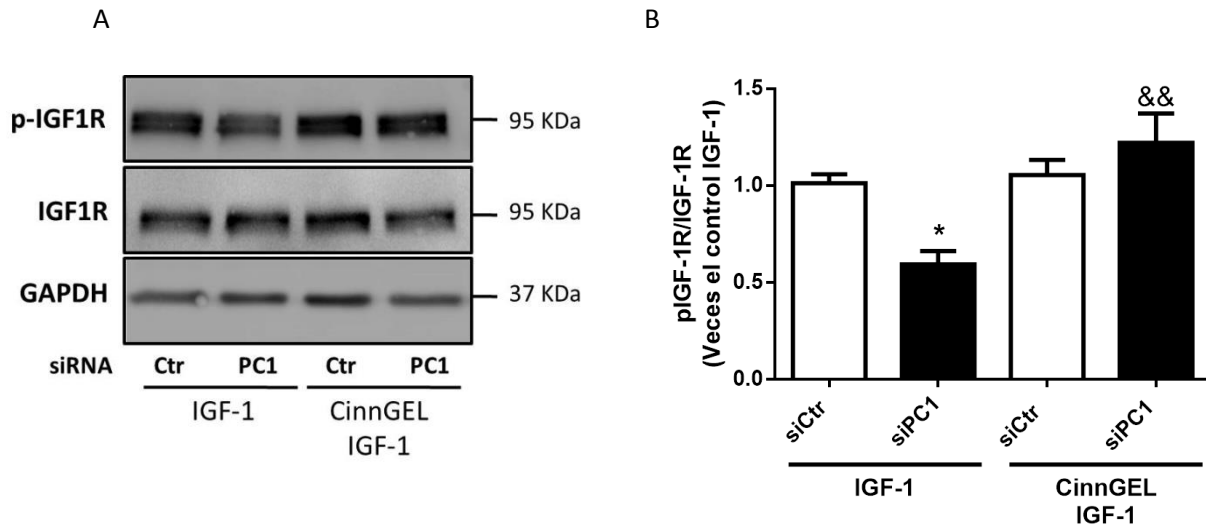


Figura 12: Disminución de la fosforilación del receptor de IGF-1 inducida por la reducción de los niveles de policistina 1 se recupera al utilizar un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B. A: Western blot representativo para la subunidad β del receptor de IGF-1 fosforilado (pIGF1R), para el receptor total (IGF1R) y GAPDH. B: Cuantificación de los western blots. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. * $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; && $p < 0,01$ vs siPC1 IGF-1. $n = 4$ Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.7. Disminución de fosforilación de Akt inducida por la reducción de los niveles de policistina se previene con un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa 1B

Como la disminución en la fosforilación del receptor de IGF-1, al disminuir los niveles de policistina-1, es revertida por el inhibidor de la PTP1B, se estudió si también se revierte el efecto en las vías transduccionales Akt y ERK. Los cardiomiocitos se pretrataron con CinnGEL-2ME 10 μ M por 1 h y estimulados con IGF-1 (10 nM) por 5 min, la disminución en la fosforilación de Akt en Ser473, que se observaba al disminuir los niveles de policistina-1, se recupera al inhibir la proteína tirosina fosfatasa 1B con el inhibidor específico CinnGEL-2ME (Figura 13)

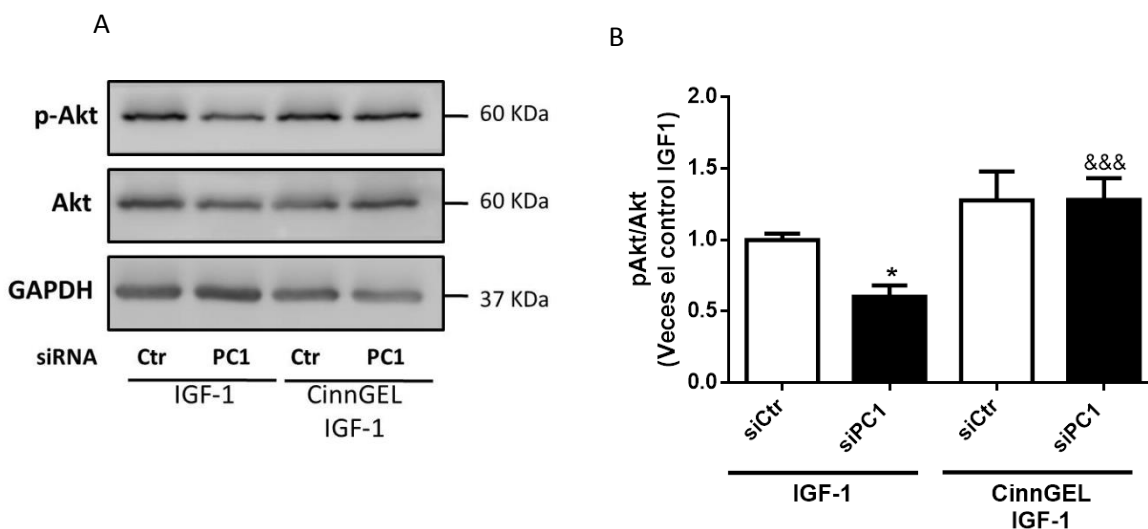


Figura 13: Disminución de la fosforilación de Akt dependiente de IGF-1 debida a la reducción de los niveles de policistina-1 se previene con un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B. A: Western blots contra Akt fosforilada en serina 473, Akt total y GAPDH. B: Cuantificación de los niveles de Akt fosforilado (S473). siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA contra policistina-1. * $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; *** $p < 0,001$ vs siPC1 IGF-1. n = 4. Los datos se muestran como promedio \pm SEM

6.2.8. Disminución en la fosforilación de ERK1/2 dependiente IGF-1 observada al reducir los niveles proteicos de policistina-1 se previene con un inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B.

Los cardiomiocitos se pretrataron con CinnGEL-2ME 10 μ M por 1 h y estimularon con IGF-1 (10 nM) por 5 min. A similitud de lo que ocurre con Akt, la fosforilación de ERK1/2, que se encontraba disminuida en los cardiomiocitos en los que se silenció policistina-1, se previene en presencia del inhibidor específico de la proteína tirosina fosfatasa 1B (Figura 14)

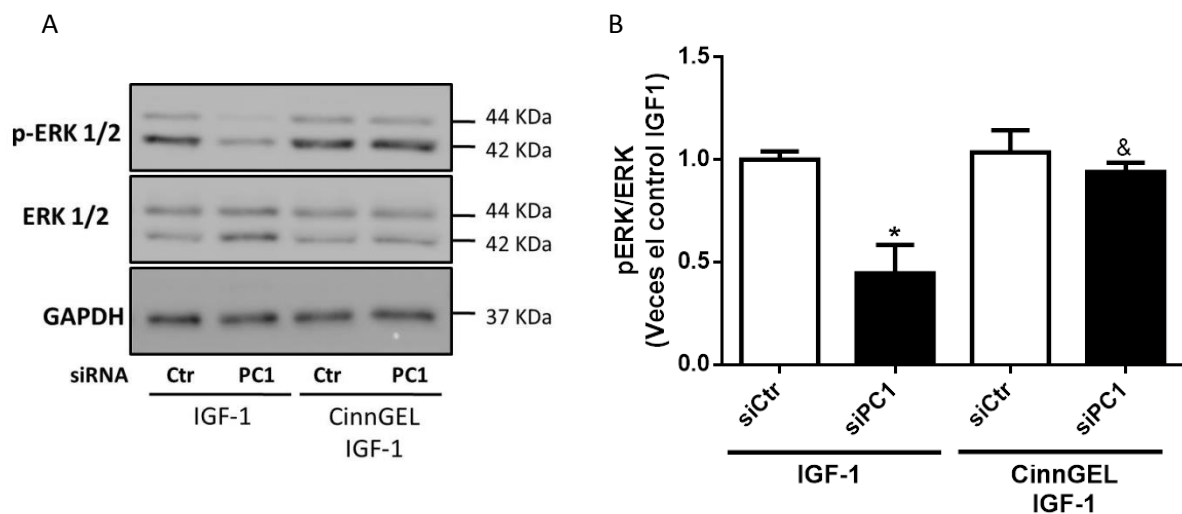


Figura 14: Disminución de la fosforilación de ERK1/2 inducida por el siRNA para policistina se previene al inhibir la proteína tirosina fosfatasa 1B. A: Western blots para las formas ERK1/2 fosforiladas y totales y GAPDH. B: Cuantificación de los niveles de las formas fosforiladas de ERK1/2. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA contra policistina-1. * $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; & $p < 0,05$ vs siPC1 IGF-1. N = 4. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.9. Efecto del siRNA contra policistina-1 en los niveles de ROS de cardiomiocitos tratados con IGF-1.

Dado que en los resultados anteriores muestran que la PTP1B está siendo regulada por policistina-1,

es necesario indagar en el mecanismo por el cual se estaría ejerciendo esta regulación. En relación a la regulación de la actividad de la PTP1B, ésta aún es controversial. Se postula que esta fosfatasa estaría constitutivamente activa y que las especies reactivas del oxígeno (ROS) oxidan las cisteínas reactivas inhibiendo su actividad (Bakke *et al.*, 2015). Se han descritos fosforilaciones en serina y tirosina, las que pueden aumentar o disminuir su actividad dependiendo de tipo celular, por lo que aún no está establecido si hay una relación general entre estas modificaciones post-traduccionales y la actividad de la PTP1B (Yip *et al.*, 2010). En primer lugar se estudiaron los niveles intracelulares de ROS a través de la sonda dihidrorodamina. Los cardiomiocitos se trataron con el siRNA para policistina-1 y 24 h post-transfección se estimularon con IGF-1 10 nM por 5 min y los niveles de ROS se determinaron por medio de la sonda dihidrorodamina por citometría de flujo. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno y como control negativo se utilizó N-acetilcisteína. La Figura 15 muestra que no se observaron cambios en los niveles de ROS en los cardiomiocitos que tenían disminuídos los niveles de policistina-1, ni basalmente ni posteriormente a la estimulación con IGF-1.

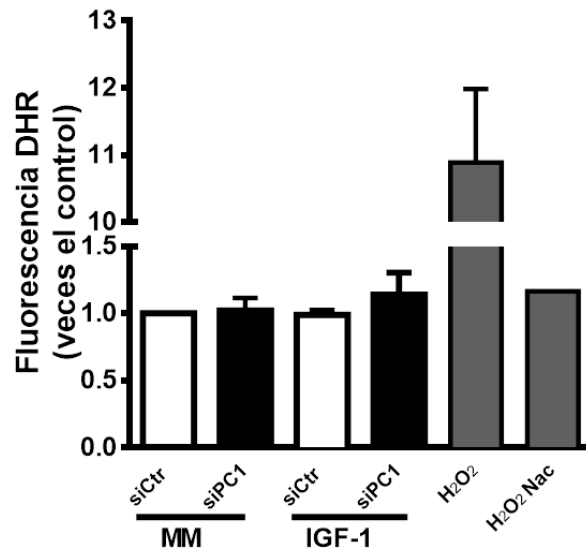


Figura 15: Disminución en los niveles de policistina-1 no afecta los niveles de ROS en cardiomiocitos tratados con IGF-1. Niveles de ROS determinados con la sonda dihidrorodamina. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA parapolicistina-1. n = 3 para las condiciones con MM, IGF-1 y H₂O₂ y n = 1 para H₂O₂ Nac. Los datos se muestran como promedio ± SEM

6.2.10. Selectividad del efecto de PTP1B en la acción de policistina-1 en el cardiomiocito tratado con IGF-1.

Dado que no se observaron cambios en los niveles de ROS determinados por la sonda dihidrorodamina, se estudió el estado de fosforilación de otro sustrato de la PTP1B, el receptor de insulina, como una medida indirecta de actividad de esta fosfatasa. Para este fin, los cardiomiocitos se transfectaron con el siRNA para policistina-1, 24 horas post transfección se pretrataron con CinnGEL-2ME 10 μ M por 1 h y se estimularon con insulina 10 nM por 10 min, y la fosforilación del receptor de insulina se determinó por Western blot. La figura 16 muestra que en los cardiomiocitos que tienen disminuidos los niveles de policistina-1 no se observó una disminución en la fosforilación del receptor de insulina, como sí ocurre con el receptor de IGF-1. El tratamiento con el inhibidor de la PTP1B, CinnGEL, aumentó los niveles de fosforilación del receptor de insulina, confirmando que este receptor también es sustrato de esta fosfatasa.

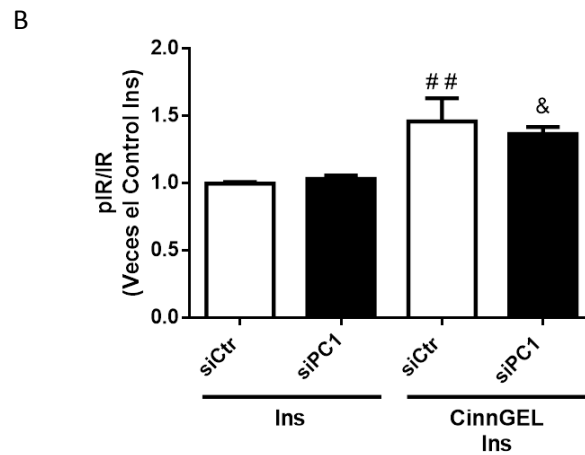
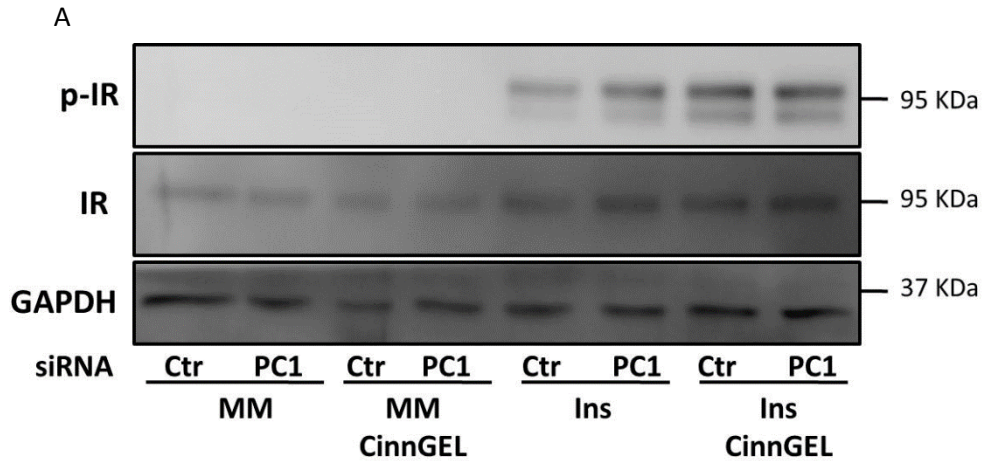


Figura 16: Fosforilación del receptor de insulina no es afectada por la disminución de los niveles de policistina-1 en cardiomiocitos tratados con insulina. A: Western blot representativo para la subunidad β del receptor de insulina fosforilado (pIR), para el receptor total (IR) y GAPDH. B: Cuantificación de los Western blots. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. ^{##}p < 0,01 vs siCtr Ins; [&]p < 0,05 vs siPC1 Ins-1. n = 3. Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

6.2.11. Efecto de la inhibición de PTP1B en la respuesta hipertrófica a IGF-1 en cardiomiocitos con niveles reducidos de policistina-1.

Como se observó anteriormente, la inhibición de PTP1B previno los efectos del silenciamiento de policistina-1, recuperando los niveles de fosforilación del IGF-1R y de las quinasas ERK y Akt dependientes de IGF-1 (Figuras 12-14). La pregunta que surgió a continuación fue si la inhibición de PTP1B prevenía la atenuación de la hipertrofia del cardiomiocito dependiente IGF-1 observada al silenciar policistina-1 (Figuras 2-4). Para este fin, los cardiomiocitos se transfectaron con el siRNA para policistina-1, pretrataron con CinnGEL-2Me μM por 1 h y estimularon con IGF-1 (10 nM) por 48 h. Luego se determinaron los niveles de mRNA de dos marcadores de hipertrofia, el péptido natriurético de cerebro (BNP) y el péptido natriurético auricular (ANP); y de los parámetros morfológicos área, perímetro celular, y porcentaje de células que presentaban sarcómeros. La Figura 17 muestra que los niveles del mRNA de BNP aumentan en los cardiomiocitos tratados con siRNA control y estimulados con IGF-1, aumento que no se observa en las células que tenían disminuida policistina-1, lo que es congruente con lo mostrado en las Figuras 2 a 4. Sin embargo, los cardiomiocitos tratados con el inhibidor de PTP1B CinnGEL-2Me, tanto en los tratados con el siRNA control como en aquellos con niveles proteicos disminuidos de policistina-1, este marcador de hipertrofia está aumentado. Lo mismo se observa respecto al perímetro, área celular y porcentaje de células con sarcómeros (Figura 19), registrándose un aumento en todos los parámetros en los cardiomiocitos estimulados con IGF-1 y tratados con el siRNA control, aumento que es prevenido en los cardiomiocitos con niveles disminuidos de policistina-1, tal como se observa en la figura 3. En los cardiomiocitos tratados con el inhibidor de PTP1B, y que presentan los niveles de PC1 disminuidos, este efecto desaparece y tanto el perímetro como el área celular aumentan en la misma medida que en los cardiomiocitos tratados con el siRNA control. Al observar la reorganización del citoesqueleto de actina en sarcómeros (Figura 18), y cuantificación de las células que presentan

sarcómeros (Figura 19C), el efecto observado es el mismo, al igual que en la Figura 4, al estimular con IGF-1 se observa una reestructuración del citoesqueleto de actina en los cardiomiocitos tratados con el siRNA control, mientras que los cardiomiocitos con los niveles disminuídos de policistina-1 tienen el mismo patrón que los no estimulados con IGF-1. Al inhibir la PTP1B se observa esta reorganización del citoesqueleto de actina en los cardiomiocitos deficientes en policistina-1, al igual que en los tratados con el siRNA control.

De estas evidencias (Figuras 17 -19) se concluye que la inhibición de PTP1B previene el efecto del silenciamiento de policistina-1 sobre la hipertrofia del cardiomiocito gatillada por IGF-1. Los niveles de otro marcador de hipertrofia, el mRNA del péptido natriurético auricular (ANP) no se modificaron (Figura 17B) en ninguna de las condiciones determinadas. Este resultado es coincidente con resultados del laboratorio con un gen reportero para ANP, en los que no se observó aumento de la actividad de este reportero en cardiomiocitos tratados con IGF-1 (tesis doctoral C. Pennanen)

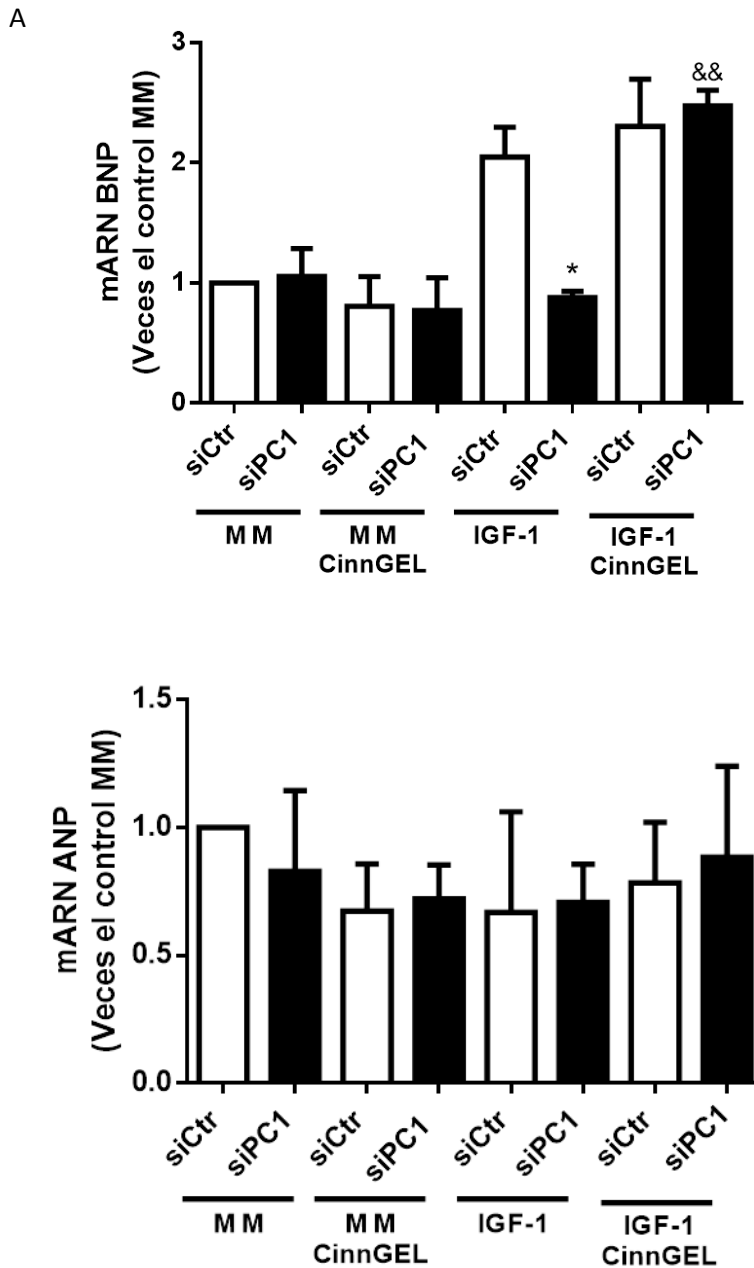


Figura 17: Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en la respuesta hipertrofica a IGF-1. A: niveles de mRNA de BNP determinados por qPCR. B: de mRNA de ANP determinados por qPCR. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. * $p < 0,01$ vs siCtr IGF1; && $p < 0,01$ vs siPC1 IGF-1. $n = 4$. Los datos se muestran como promedio \pm SEM

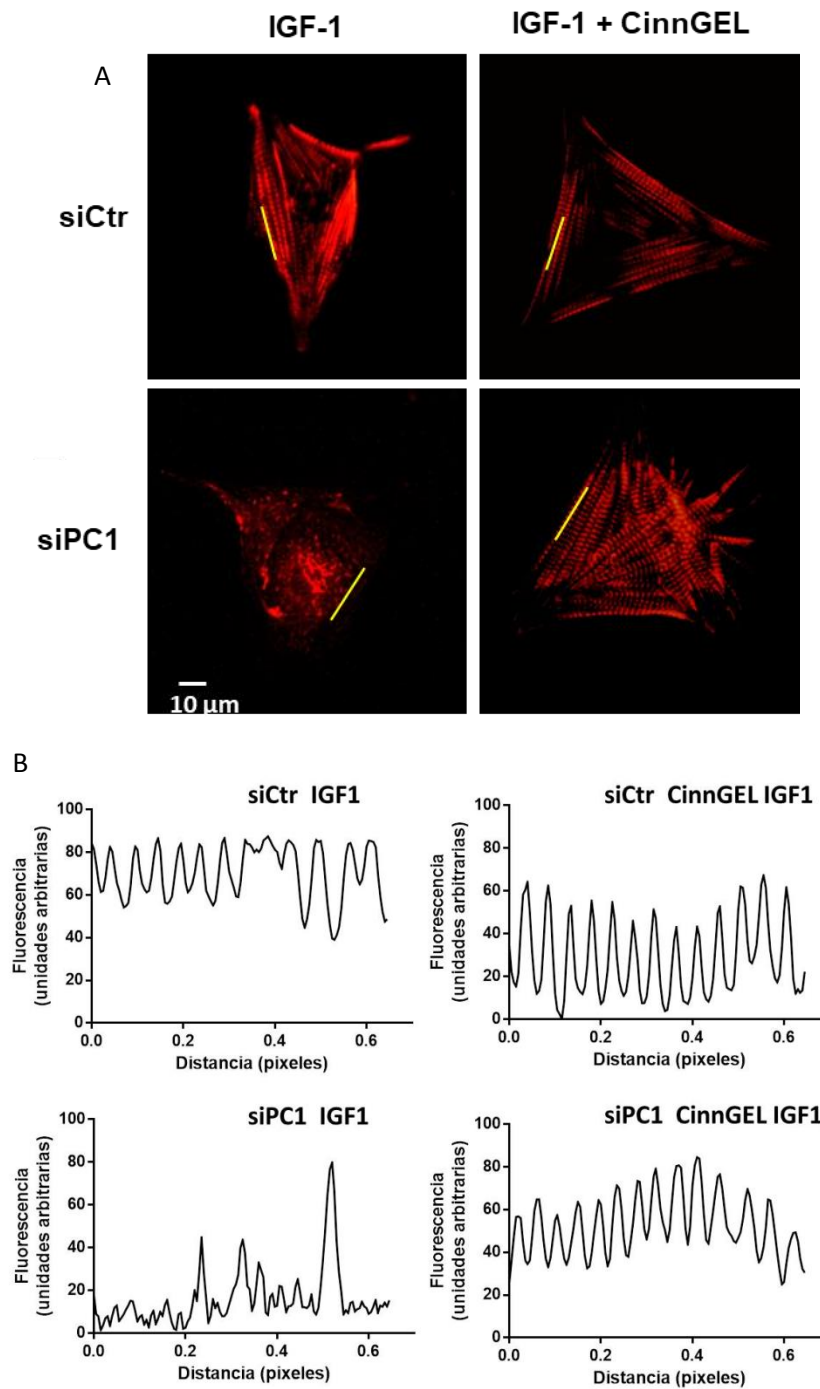


Figura 18: Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a IGF-1. A: Tinción del citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina de cardiomiocitos tratados con IGF-1 (10 nM) por 48 h y visualización de los sarcómeros trazando una línea (línea amarilla). B: Determinación del patrón de fluorescencia a lo largo de esta línea en las distintas condiciones experimentales. Se muestran imágenes representativas. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA para PC-1. n = 4

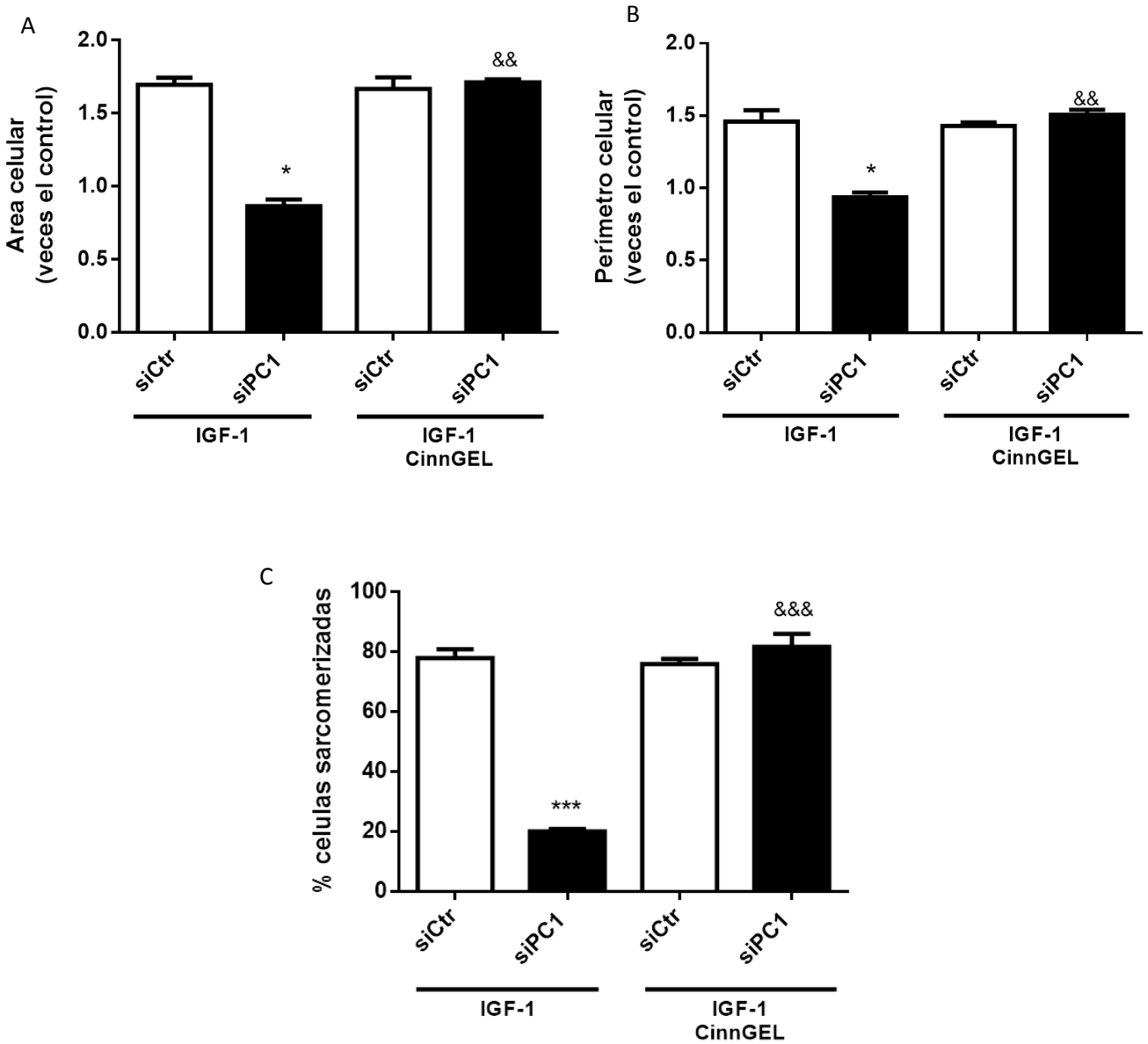


Figura 19: Inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B recupera el efecto del silenciamiento de PC1 en el aumento del área, perímetro celular y grado de sarcomerización en respuesta a IGF-1
 A: Cuantificación del área celular. B: Cuantificación del perímetro celular. C: Cuantificación de células que presentan reorganizado el citoesqueleto de actina en sarcómeros. siCtr: siRNA control. siPC1: siRNA contra policistina-1. MM: medio de mantenimiento. **p < 0,01; ***p < 0,001 vs siCtr MM, &p < 0,05; &&p < 0,01; &&&p < 0,001 vs siCtr IGF-1. n = 4. Los datos se muestran como promedio ± SEM.

7. DISCUSIÓN

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que el IGF-1 posee efectos pro-hipertrofos y anti-apoptóticos en el cardiomiocito (Troncoso *et al.*, 2014). Policistina-1 es una proteína conocida por su acción mecanosensora en las células de epitelio renal y recientemente describimos su rol mecanosensor en el cardiomiocito (Pedrozo *et al.*, 2015). Sin embargo hasta la fecha no se ha descrito una relación entre policistina-1 y los efectos generados por IGF-1.

En esta tesis se propuso como hipótesis de trabajo que policistina-1 media la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1. Los principales resultados muestran que efectivamente policistina-1 es necesaria para el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito en respuesta a IGF-1, regulando la fosforilación del receptor de IGF-1 y la activación de las proteínas quinasas río debajo de este receptor: Akt y ERK, a través de un mecanismo que involucra a la proteína tirosina fosfatasa 1B.

7.1. Participación de policistina-1 en la hipertrofia inducida por IGF-1

El IGF-1 es conocido por inducir hipertrofia fisiológica. Esta corresponde al aumento de tamaño del corazón en condiciones no patológicas de aumento de la demanda de trabajo, como el embarazo o el ejercicio físico regular en atletas de alto rendimiento (Bernardo *et al.*, 2010). La hipertrofia fisiológica *in vivo* se caracteriza por la ausencia de disfunción contráctil y remodelado cardíaco (no se observa fibrosis ni muerte del tejido cardíaco) (Bernardo *et al.*, 2010). En estudios a nivel celular, la hipertrofia patológica se asocia con un cambio en el metabolismo de los cardiomiocitos, (Iemitsu *et al.*, 2003) y con cambios en su expresión génica mientras que la de tipo patológica se asocia con alteraciones en la proteínas contráctiles (α y β -MHC) y aumento en la expresión de genes fetales (ANP, BNP y SKA) (Bernardo *et al.*, 2010).

En este trabajo se presenta que policistina-1 media la respuesta hipertrófica a IGF-1 (Figuras 2-4). El desarrollo de hipertrofia inducido por IGF-1 se determinó por el aumento en los niveles proteicos del marcador de hipertrofia β -MHC (Figura 2), por el aumento los parámetros morfológicos como área y perímetro celular (Figura 3), y la reorganización del citoesqueleto de actina en estructuras sarcoméricas (Figura 4). Estos resultados son concordantes por lo descrito tanto por nuestro Laboratorio como por otros grupos de investigación, los que han mostrado que la estimulación de cardiomiocitos con IGF-1, a pesar de que *in vivo* produce hipertrofia fisiológica, *in vitro* produce aumento del área celular, en la síntesis de proteínas, y en la expresión de los marcadores característicos de la hipertrofia patológica (β -MHC, SKA y BNP) (Ito *et al.*, 1993; Lavandero *et al.*, 1998, Carrasco *et al.*, 2014). Estos mismos cambios se observan en el ratón transgénico que sobreexpresa el receptor de IGF-1 (McMullen *et al.*, 2003).

El aumento en todos estos parámetros se previno por el siRNA contra policistina-1. Estos resultados muestran que policistina-1 es necesaria para la respuesta hipertrófica a IGF-1. Este resultado es novedoso dado que no se ha establecido previamente una relación entre policistina-1 e hipertofia inducida por factores neurohumorales, como es el caso del IGF-1, donde no hay estrés mecánico directamente involucrado.

Policistina-1 se ha descrito principalmente en células de epitelio renal, pero también se ha encontrado en diversos tejidos, entre ellos el corazón, y particularmente los cardiomiocitos (Peters *et al.*, 1999) Su función más conocida es la de mecanosensor, cumpliendo un rol en mecanotransducción en el epitelio renal, tejido vascular y osteoblastos; también participa en eventos relacionados tanto con la mantención de la polaridad celular como de las interacciones célula-célula y célula matriz (Piperi y Basdra, 2015). Recientemente nuestro Laboratorio en colaboración con el grupo del Dr Joseph A Hill (UT Southwestern Medical Center, Dallas) describió

su rol como mecanosensor y regulador de la hipertrofia inducida por estrés mecánico en cardiomiocitos (Pedrozo *et al.*, 2015). Policistina-1 se ubica principalmente en la membrana plasmática aunque también se ha sugerido su presencia en el retículo endoplásmico. En células ciliadas también se detecta en los cilios primarios (Chapin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009). Diversos estudios han descrito su interacción con distintas proteínas, algunas de ellas relacionadas con la mantención de la homeostasis del calcio intracelular, como policistina-2 y el receptor de IP3 (Li *et al.*, 2009) y otras relacionadas con los otros eventos celulares en los que participa, como proteínas de interacción con la matriz extracelular o de unión célula-célula (Piperi y Basdra, 2015).

Policistina-1 tiene un rol muy importante en eventos directamente relacionados con la mantención y remodelado del citoesqueleto de actina, como la mantención de la polaridad celular (Xu *et al.*, 2014; Coxam *et al.*, 2014), migración celular (Yao *et al.*, 2014) y proliferación celular (Gargalionis *et al.*, 2014). Si bien hasta ahora no se ha descrito su interacción directa con el receptor de IGF-1 sí se asocia con distintas proteínas de membrana plasmática, proteínas de adhesiones focales como integrinas, vinculina y laproteína quinasa de adhesión focal FAK (Wilson *et al.*, 1999; Geng *et al.*, 2000). En este sentido policistina-1 regula tanto la estabilidad de microtúbulos como el citoesqueleto de actina, controlando la formación de adhesiones focales y la adhesión a sustrato en células derivadas de epitelio renal, (Castelli *et al.*, 2015). En cardiomiocitos también se describe su presencia de adhesiones focales (Samarel *et al.*, 2005) pero no se ha estudiado su rol en la formación o mantención de las adhesiones focales en este tipo celular, ni su papel en la hipertrofia inducida por IGF-1. Un evento clave en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocitos es la reorganización del citoesqueleto de actina en estructuras sarcoméricas, hasta ahora no se había descrito una relación entre policistina-1 y este fenómeno. El presente trabajo muestra que así como policistina-1 es necesaria para el desarrollo de adhesiones focales descrito anteriormente como también se requiere para la reorganización del citoesqueleto de actina inducida por IGF-1 (Figura 4).

Por otra parte, el tratamiento con IGF-1 genera un aumento de tamaño de los cardiomiocitos (Figura 3). Un trabajo de nuestro laboratorio mostró que este aumento es dependiente de la actividad tirosina quinasa de este receptor (Carrasco *et al.*, 2014); esto es concordante con lo encontrado en este trabajo, en que en presencia del siRNA contra policistina-1 se observa una disminución en los niveles de fosforilación del receptor de IGF-1 en respuesta a IGF-1 (Figura 7).

7.2. Participación de policistina-1 en la hipertrofia inducida por estrés mecánico por hiposmolaridad

En este trabajo se muestra que policistina-1 es necesaria para el desarrollo de hipertrofia estimulado por estrés mecánico por hiposmolaridad (Figuras 5 y 6). Se observa que tanto el aumento del marcador de hipertrofia β -MHC como el aumento de la síntesis de proteínas (medido como la incorporación de leucina tritiada) son dependientes de policistina-1. El estrés mecánico es uno de los factores principales que gatillan el desarrollo de hipertrofia cardíaca en respuesta a sobrecarga hemodinámica (Ruwohof y van der Laarse, 2000) y cardiomiocitos aislados sometidos a estiramiento mecánico desarrollan hipertrofia (Van Wamel *et al.*, 2000). Sin embargo, aún no está dilucidado cuál es el mecanosensor en los cardiomiocitos. Diversas proteínas como integrinas, el receptor de angiotensina II AT1, entre otras, han sido propuestas como mecanosensores, sin dilucidarse aún cuál o cuáles de ellas estarían cumpliendo esta función en el cardiomiocito. Policistina-1 es conocida por su función de mecanosensor en diversos tipos celulares, especialmente en células de epitelio renal. Se ha descrito su presencia en los cardiomiocitos, sin dilucidarse su función, sino hasta el trabajo de nuestro laboratorio, publicado recientemente por Pedrozo y colaboradores (2015), en el que se describe el rol mecanosensor de policistina-1 en los cardiomiocitos, donde al utilizar un siRNA contra policistina-1 bloquea el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos aislados sometidos a estrés mecánico (estiramiento mecánico) y por estrés osmótico (datos de esta tesis incluidos en esa

publicación). Este papel de policistina-1 como regulador de la hipertrofia cardiaca es corroborado en ratones knock out para policistina-1 en corazón, los que no desarrollan hipertrofia cardiaca en respuesta a constricción aórtica transversa (Pedrozo *et al.*, 2015).

Hasta ahora, considerando este trabajo y el de Pedrozo y colaboradores, policistina-1 tendría un rol regulando la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida tanto por IGF-1 como por estrés mecánico, en el caso del estrés mecánico, el mecanismo es distinto al descrito en esta tesis para la hipertrofia inducida por IGF-1, en el caso de la hipertrofia por estrés mecánico, policistina-1 cumple su rol mecanosensor regulando los niveles del canal de calcio de tipo L (Pedrozo *et al.*, 2015) mientras que en el caso del IGF-1 no se observan alteraciones en el calcio intracelular, sí en los niveles de fosforilación del receptor y de las proteínas quinasas que se activan posterior a la activación del receptor de IGF-1, ésto estaría mediado por la fosfatasa PTP1B. En el trabajo de Pedrozo y colaboradores, además del estrés mecánico utilizó fenilefrina como estímulo para inducir hipertrofia en los cardiomiocitos, y en este caso no se observó efecto en la hipertofia al silenciar policistina-1, por tanto no regula la hipertrofia inducida por fenilefrina (Pedrozo *et al.*, 2015). Fenilefrina es conocido por inducir hipertrofia patológica, el mecanismo por el cual se produce la hipertrofia en este caso es distinto al estrés mecánico y al IGF-1, fenilefrina activa su receptor, que es acoplado a proteína G, activando distintas vías transduccionales, entre ellas las ERKs, calmodulina quinasa y calcineurina (Bernardo *et al.*, 2010). Que policistina-1 regule o no la hipertrofia de los cardiomiocitos parece depender directamente del mecanismo involucrado en la generación de esta hipertrofia, en el caso del estrés mecánico, regulando el canal de calcio de tipo L, cuyo funcionamiento es fundamental para el desarrollo de hipertrofia por estrés mecánico, y para el IGF-1, regulando la fosforilación del receptor, mediado por la PTP1B; es necesario probar otros estímulos hipertróficos, como endotelina-1 o angiotensina II, los que también son conocidos inductores de hipertrofia en los cardiomiocitos, para así dilucidar si policistina-1 pudiese ser un

regulador general de la hipertofia o sólo lo hace en estímulos como el estrés mecánico e hipertrofia inducida por factores de crecimiento como el IGF-1, y si esto tiene relación con la ubicación de policistina-1, que en el caso del IGF-1 podría estar protegiéndolo de la acción de la PTP1B o con su actividad.

7.3. Regulación de la fosforilación del receptor de IGF-1, Akt y ERK1/2 por policistina-1

Con respecto al mecanismo por el cual policistina-1 estaría atenuando la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos a la estimulación con IGF-1, observamos que, al utilizar el siRNA contra policistina-1 tanto el receptor de IGF-1 como las quinasas Akt y ERK se encuentran menos fosforilados que la condición control (Figuras 7- 9), sin cambios en los niveles totales del receptor de IGF-1. Hasta ahora no se ha descrito una relación directa entre policistina-1 y el receptor de IGF-11 pero si está reportado que policistina-1 interactúa con otras proteínas de membrana plasmática como integrinas y proteínas de interacción célula-célula (Geng *et al.*, 2000). Hasta la fecha no se ha estudiado si además puede interactuar directamente con el receptor de IGF-1, resultados preliminares de nuestro laboratorio indicarían que en cardiomiocitos neonatos, policistina-1 y el receptor de IGF-1 colocalizan (Ibarra *et al*, datos no publicados). Si bien no se ha mostrado una relación entre el receptor de IGF-1 y policistina-1, sí se ha descrito una relación entre el receptor de IGF-1 y otros mecanosensores, las integrinas. Un trabajo reciente de Tahimic *et al.*, (2016) muestra que, en osteoblastos, el IGF-1 se une a un heterocomplejo formado por integrinas y el receptor de IGF-1, y que estas integrinas regulan la actividad del receptor de IGF-1 en respuesta a estrés mecánico y a IGF-1. En este modelo la respuesta a estrés mecánico requiere de la actividad del receptor de IGF-1. Nuestros resultados muestran que, en los cardiomiocitos que tienen disminuídos los niveles de policistina-1, la activación tanto del receptor de IGF-1 como sus vías transduccionales río debajo: ERK y Akt, es necesaria la presencia de policistina-1 (Figuras 7-9). Aún se desconoce si esta regulación es directa o indirecta, pero al igual como es necesaria la presencia

de integrinas en el caso de los osteoblastos, para la activación del receptor de IGF-1 y de las quinasas ERK y Akt en los cardiomiocitos por IGF-1 se requiere de policistina-1.

7.4. Rol de las vías transduccionales activadas por IGF-1 y su receptor en el desarrollo de hipertrofia en los cardiomiocitos

El IGF-1R es un receptor tirosina quinasa atípico, posterior a la unión de su ligando se activa la clásica señalización de los receptores tirosina quinasa, autofosforilación del receptor y activación de las vías PI3K/Akt y ERK, pero además este receptor está acoplado a una proteína $G\alpha_i$ (Luttrell *et al.*, 1995), lo que produce rápidos aumentos de Ca^{2+} intracelulares dependientes de IP₃, en respuesta a la estimulación con IGF-1 (Ibarra *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2013). En base a estos antecedentes se estudiaron los niveles de las formas fosforiladas y totales de Akt y ERK, cuya activación ha sido ampliamente descritas posterior a la activación del receptor de IGF-1 por su ligando, y las señales de calcio en respuesta a IGF-1. En primer lugar, se encontró que PC-1 es necesaria para la fosforilación de Akt inducida por IGF-1. También es ampliamente conocido que la activación de Akt es necesaria para el desarrollo de hipertrofia fisiológica mediada por IGF-1 (Kim *et al.*, 2008), por tanto esta vía podría estar involucrada en la respuesta final observada en los cardiomiocitos que tienen silenciada PC-1, la inhibición de la respuesta hipertrófica a IGF-1. La fosforilación de ERK1/2 también se encontró disminuida en respuesta a IGF-1 en los cardiomiocitos que tienen silenciada PC-1. La actividad de las ERK 1/2 también es fundamental para el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos inducida por IGF-1 (Carrasco *et al.*, 2014). La actividad de las ERKs es requerida tanto para el aumento en el tamaño celular como para el aumento en el marcador de hipertrofia β -MHC (Carrasco *et al.*, 2014), por tanto el hecho de que al silenciar PC-1 no se observe la respuesta hipertrófica posterior a estimular con IGF-1 se podría explicar por la disminución en la fosforilación tanto de las quinasas ERK como Akt.

Dado que la activación de estas dos vías transduccionales es dependiente de la actividad tirosina quinasa del IGF-1R (Carrasco *et al.*, 2014) se estudiaron los niveles de las formas fosforiladas y totales de la subunidad β del IGF1-R, encontrándose que esta fosforilación en respuesta a IGF-1 también se encuentra disminuida en los cardiomiocitos que tienen niveles reducidos de policistina-1 (Figura 7), lo que explica que la fosforilación de las Akt como ERK estén disminuidas en respuesta a IGF-1 (Figuras 8 y 9).

Finalmente, los aumentos de Ca^{2+} intracelulares en respuesta a IGF-1 se han relacionado directamente con la activación de la proteína $\text{G}\alpha_i$ a la que se asocia este receptor (Ibarra *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2013) los experimentos de cinéticas de Ca^{2+} realizados en este trabajo no muestran diferencias entre los cardiomiocitos controles y los que tienen los niveles de PC-1 disminuidos (Figura 10), por lo que esta parte de la vía transduccional no sería regulada por PC-1. Como se mencionó anteriormente, las señales de calcio generadas por IGF-1 son dependientes de la actividad de receptor acoplado a proteína G del IGF-1R, específicamente dependen de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína G_i a la que se acopla este receptor (Ibarra *et al.*, 2004). Los trabajos de nuestro laboratorio que han descrito estas señales de calcio inducidas por IGF-1 en cardiomiocitos, si bien muestran que estas son dependientes de esta subunidad $\beta\gamma$, para que se generen estas señales de calcio también se requiere de la actividad tirosina quinasa del receptor (Ibarra *et al.*, 2004, Carrasco *et al.*, 2014). En este trabajo se muestra que, al disminuir los niveles de policistina-1, el IGF-1R se encuentra menos fosforilado, no se estudió si se ve afectada la parte acoplada a proteína G de este receptor, el hecho de que no se observen cambios en las señales de calcio permite inferir que probablemente la parte acoplada a proteína G, o al menos las subunidades $\beta\gamma$ de esta proteína G no son reguladas por policistina-1. Si bien la actividad tirosina quinasa del receptor también es necesaria para la generación de estas señales de calcio, es posible que la fosforilación que queda al disminuir los niveles de policistina-1 sea suficiente para la generación de estas señales de calcio, dado que si bien

disminuye significativamente la fosforilación del IGF-1R, ésta no llega al nivel basal.

7.5. Participación de la proteína tirosina fosfatasa 1B en la reversión de los efectos del silenciamiento de policistina-1.

En relación al mecanismo por el cual que PC-1 podría estar regulando la fosforilación del IGF-1R, sin alterar su masa, una alternativa es que PC-1 esté regulando a alguna tirosina fosfatasa, y al no estar PC-1 presente esta fosfatasa desfosforile al IGF-1R. Si bien aún no está del todo claro cuál es la fosfatasa que desfosforila al receptor de IGF-1, hay trabajos que muestran que la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) cumpliría esta función (Arroba *et al.*, 2013; Buckley *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2013). PTP1B es una proteína tirosina fosfatasa no receptora que se ha mostrado involucrada en la regulación de patologías cardíacas causados por una dieta alta en grasas (Kandadi *et al.*, 2015), insuficiencia cardíaca (Gomez *et al.*, 2012) y disfunción endotelial (Gogiraju *et al.*, 2016)

Al probar el efecto de inhibidores de fosfatasas en la fosforilación del receptor de IGF-1, se encontró que al inhibir tirosinas fosfatasas (utilizando ortovanadato de sodio) se revierte el efecto de la ausencia de PC-1 en la disminución de la fosforilación del IGF-1R (Figura 11), lo que indicaría que hay una proteína tirosina fosfatasa involucrada en este efecto. Dado que la PTP1B se ha descrito como una fosfatasa del IGF-1R se probó un péptido inhibidor específico de esta fosfatasa, el CinnGEL-2Me. Los resultados con este inhibidor muestran que se revierte el efecto de la ausencia de PC-1 en la fosforilación del IGF-1R, Akt y ERK (Figuras 12, 13 y 14, respectivamente), y lo que es más interesante, se revierte el efecto en la inhibición de la respuesta hipertrófica que se observa al silenciar policistina-1 (Figuras 17-19). Policistina-1 estaría inhibiendo la acción de la fosfatasa PTP1B y de esta forma regulando la fosforilación del IGF-1R, Akt y ERK y finalmente la hipertrofia de los cardiomiocitos.

Si bien no hay descrita en literatura una relación directa entre PC-1 y la fosfatasa PTP1B, se ha

observado que PC-1 interactúa tanto con receptores tirosina fosfatasa (RPTP) (Boucher *et al.*, 2011) como con la proteína serina/treonina fosfatasa 1 α (PP1 α), siendo una subunidad reguladora de esta última formando la holoenzima y regulando su actividad (Parnell *et al.*, 2012). Si bien ninguno de estos antecedentes involucra a la fosfatasa PTP1B, el hecho de que PC-1 interactúe con receptores tirosina fosfatasa y regule la actividad de una serina/treonina fosfatasa no descarta la posibilidad de que regule a otras fosfatasas como la PTP1B.

7.6. Mecanismo por el cual policistina-1 podría regular a la proteína tirosina fosfatasa 1B

En relación a la regulación de la actividad de la PTP1B, se ha descrito los ROS pueden oxidar a las cisteínas catalíticas de esta enzima y así inhibir su actividad (Bakke *et al.*, 2015). Si policistina-1 estuviese inhibiendo la actividad de esta enzima a través de un aumento en los niveles de ROS, al determinar los niveles de ROS esperaríamos que en los cardiomiocitos que tienen silenciada a policistina-1 se encontraran niveles más bajos que en los que tienen presente a policistina-1, sin embargo, al determinar los niveles de ROS (Figura 15) no se observaron cambios. Esto implica que las ROS en el cardiomiocito no cambian, pero no se pueden descartar cambios locales y discretos, que no son determinados por la técnica utilizada.

Una forma indirecta de medir actividad de esta fosfatasa, es determinar la fosforilación de otro sustrato conocido, en este caso utilizamos el receptor de insulina, que al igual que el IGF-1R es sustrato de esta fosfatasa. Si policistina-1 estuviese regulando la actividad de esta fosfatasa esperaríamos ver este efecto al estimular con insulina y determinar la fosforilación del receptor de insulina por Western blot. La Figura 16 muestra que no se observaron cambios en la fosforilación del receptor de insulina en respuesta a insulina en los cardiomiocitos que tenían disminuídos los niveles de policistina-1, y en inhibidor específico de esta fosfatasa, el CinnGEL, aumentó la fosforilación del receptor de insulina en presencia y ausencia de policistina-1. Esto mostraría que no

se está afectando directamente la actividad de esta fosfatasa, lo que quedaría por buscar es si policistina-1 estaría modificando el acceso que tiene la PTP1B al receptor de IGF-1, de forma que cuando está presente policistina-1 estaría protegiendo al IGF-1R de la acción de la PTP1B, y cuando no está el receptor queda asequible a la fosfatasa.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone el modelo descrito en la Figura 20 donde se muestra que policistina-1 es un regulador tanto de la hipertrofia inducida por estrés mecánico inducido por hiposmolaridad, como de la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos a IGF-1

Policistina-1 es necesaria para la fosforilación del receptor de IGF-1 y activación de las proteínas quinasas río debajo de este receptor, ERK y Akt.

El mecanismo por el cual policistina-1 regula la hipertrofia inducida por IGF-1 y la vía transduccional activada por su receptor involucra a la proteína tirosina fosfatasa 1B, al inhibir esta fosfatasa se revierte el efecto del silenciamiento de policistina-1 tanto en la disminución de la hipertrofia de los cardiomiocitos en respuesta a IGF-1 como el efecto a nivel de vía transduccional del receptor de IGF-1 y de las quinasas ERK y Akt.

En este trabajo no fue posible dilucidar de qué manera policistina-1 está regulando a la proteína tirosina fosfatasa 1B, no se observan cambios en la fosforilación de otro sustrato de esta fosfatasa, el receptor de insulina, por lo que no se estaría modificando la actividad de esta fosfatasa. Tampoco se observaron cambios en la producción de ROS, las que se ha descrito que regulan su actividad. Policistina-1 podría estar regulando el acceso de la PTP1B al receptor de IGF-1, de esta forma, cuando está presente policistina-1 de alguna manera está protegiendo al IGF-1R de la acción de la fosfatasa, y al no estar el receptor queda expuesto a la acción de la PTP1B.

En el futuro, sería muy interesante ahondar en cómo policistina-1 está regulando la acción de la PTP1B, estudiar si está protegiendo al IGF-1R de la actividad de la fosfatasa o si está actuando directamente sobre la fosfatasa ya sea secuestrándola e impidiendo que llegue hasta el IGF-1R o sin es por una modificación directa de la PTP1B. Sería interesante estudiar si estas tres proteínas

colocalizan en los cardiomiocitos, para así poder ir respondiendo esta pregunta. También es sumamente interesante estudiar qué pasa con la parte acoplada a proteína G de éste receptor, si es afectada o no al disminuir los niveles de policistina-1. Finalmente, sería de suma relevancia estudiar el efecto del IGF-1 en animales knock out cardioespecíficos para policistina-1, y corroborar si estos efectos que se ven *in vitro* también se replican *in vivo*, e ir dilucidando la función de policistina-1 en el corazón.

Modelo propuesto

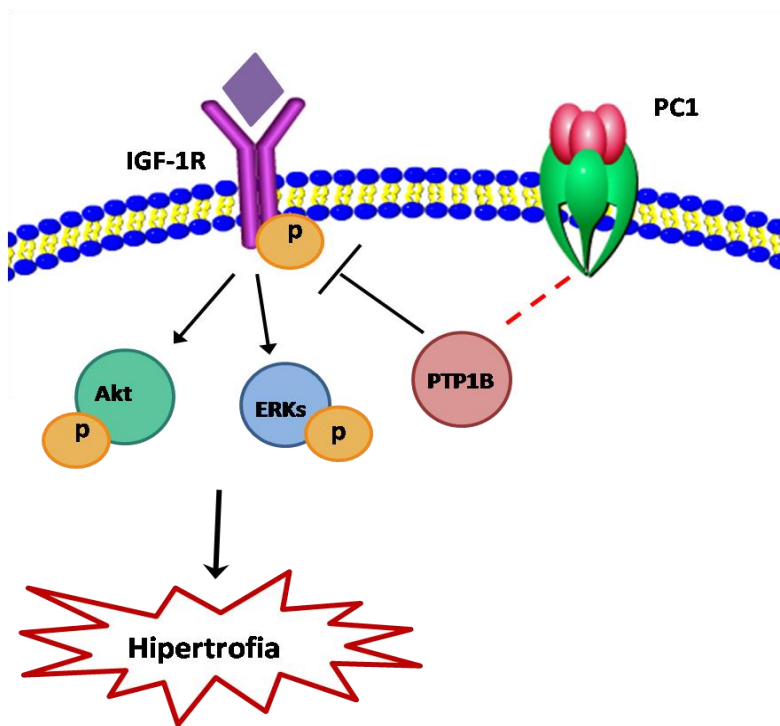


Figura 20: Modelo propuesto. Policistina-1 regula la hipertrofia inducida por IGF-1 a través de la PTP1B, regulando la fosforilación del IGF-1R y de las quinasas ERK y Akt. En este trabajo se muestra que policistina-1 regula la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por IGF-1, regulando la fosforilación del receptor de IGF-1 y la activación de las proteínas quinasas, ERK y Akt. Esto lo hace a través de la fosfatasa PTP1B. En presencia de policistina-1 esta estaría inhibiendo a la PTP1B, ya sea inhibiendo su actividad o impidiendo que llegue a ejercer su acción sobre el IGF-1R. Cuando se disminuyen los niveles de policistina-1 con el siRNA apreciamos que están disminuía la fosforilación del IGF-1R, lo que estaría dado porque policistina-1 no puede ejercer su acción inhibitoria sobre la PTP1B quedando esta libre para poder actuar sobre el IGF-1R.

9. REFERENCIAS

Agouni A, Tual-Chalot S, Chalopin M, Duluc L, Mody N, Martinez MC, *et al* (2014). Hepatic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency protects against obesity-induced endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol* **92**:607-17.

Arnould T, Kim E, Tsiokas L, Jochimsen F, Gruning W, Chang JD *et al* (1998). The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem* **273**: 6013-8.

Arroba AI, Revuelta-Cervantes J, Menes L, Gonzalez-Rodriguez A, Pardo V, de la Villa P *et al* Loss of protein tyrosine phosphatase 1B increases IGF-I receptor tyrosine phosphorylation but does not rescue retinal defects in IRS2-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 4215-25.

Bakke J, Haj FG Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol* **37**: 58-65.

Bergmann MW (2010). WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: lessons learned from cardiac development. *Circ Res* **107**: 1198-208.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* **128**: 191-227.

Blaauw E, van Nieuwenhoven FA, Willemsen P, Delhaas T, Prinzen FW, Snoeckx LH *et al* (2010). Stretch-induced hypertrophy of isolated adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H780-7.

Boucher CA, Ward HH, Case RL, Thurston KS, Li X, Needham A *et al* (2011). Receptor protein tyrosine phosphatases are novel components of a polycystin complex. *Biochim Biophys Acta* **1812**: 1225-38.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Buckley DA, Loughran G, Murphy G, Fennelly C, O'Connor R (2002). Identification of an IGF-1R kinase regulatory phosphatase using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and a GFP tagged IGF-1R in mammalian cells. *Mol Pathol* **55**: 46-54.

Carrasco L, Cea P, Rocco P, Pena-Oyarzun D, Rivera-Mejias P, Sotomayor-Flores C *et al* (2014). Role of heterotrimeric G protein and calcium in cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1. *J Cell Biochem* **115**: 712-20.

Castelli M, De Pascalis C, Distefano G, Ducano N, Oldani A, Lanzetti L *et al* (2015). Regulation of the microtubular cytoskeleton by Polycystin-1 favors focal adhesions turnover to modulate cell adhesion and migration. *BMC Cell Biol* **16**: 15.

Contreras A AP, Díaz J, Chiong M, Munoz JP, Parra V, Ibarra C, Rojas D, Troncoso R, Eisner V, Salas D, Rodriguez A, Carrasco L, Diaz-Araya G, Lavandero S. (2006). IGF-1: Un factor de crecimiento con acciones cardiovasculares pleiotrópicas. *Revista Chilena de Cardiología* **25**: 317 - 330.

Coxam B, Sabine A, Bower NI, Smith KA, Pichol-Thievend C, Skoczylas R *et al* (2014). Pkd1 regulates lymphatic vascular morphogenesis during development. *Cell Rep* **7**: 623-33.

Chapin HC, Rajendran V, Caplan MJ (2010). Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site. *Mol Biol Cell* **21**: 4338-48.

Chapman AB, Johnson AM, Rainguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW (1997). Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **8**: 1292-7.

Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F (2010). Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **17**: 153-63.

Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hiesberger T *et al* (2004). Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* **114**: 1433-43.

Chen X, Shevtsov SP, Hsich E, Cui L, Haq S, Aronovitz M *et al* (2006). The beta-catenin/T-cell factor/lymphocyte enhancer factor signaling pathway is required for normal and stress-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* **26**: 4462-73.

Dalagiorgou G, Basdra EK, Papavassiliou AG (2010). Polycystin-1: function as a mechanosensor. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 1610-3.

Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y *et al* (2002). Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem* **277**: 11276-83.

Dere R, Wilson PD, Sandford RN, Walker CL (2010). Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PLoS One* **5**: e9239.

Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C *et al* (2001). Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. *Oncogene* **20**: 252-9.

Duerr RL, Huang S, Miraliakbar HR, Clark R, Chien KR, Ross J, Jr. (1995). Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J Clin Invest* **95**: 619-27.

Ebensperger R, Acevedo E, Melendez J, Corbalan R, Acevedo M, Sapag-Hagar M *et al* (1998). Selective increase in cardiac IGF-1 in a rat model of ventricular hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 20-4.

Fan G, Lin G, Lucito R, Tonks NK (2013). Protein-tyrosine phosphatase 1B antagonized signaling by insulin-like growth factor-1 receptor and kinase BRK/PTK6 in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **288**: 24923-34.

Fazio S, Palmieri EA, Biondi B, Cittadini A, Sacca L (2000). The role of the GH-IGF-I axis in the regulation of myocardial growth: from experimental models to human evidence. *Eur J Endocrinol* **142**: 211-6.

Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML (2013). PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**:430-45.

Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH *et al* (1997). Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* **272**: 19115-24.

Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X *et al* (2001). A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* **304**: 279-85.

Gargalionis AN, Korkolopoulou P, Farmaki E, Piperi C, Dalagiorgou G, Adamopoulos C *et al* (2014). Polycystin-1 and polycystin-2 are involved in the acquisition of aggressive phenotypes in colorectal cancer. *Int J Cancer* **136**: 1515-27.

Geng L, Burrow CR, Li HP, Wilson PD (2000). Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1535**: 21-35.

Gomez E, Vercauteren M, Kurtz B, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P, Henry JP *et al* (2012). Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. *J Mol Cell Cardiol* **52**: 1257-64.

Gogiraju R, Schroeter MR, Bochenek ML, Hubert A, Münzel T, Hasenfuss G, *et al* (2016) Endothelial deletion of protein tyrosine phosphatase-1B protects against pressure overload-induced heart failure in mice. *Cardiovasc Res.* **111**:204-16.

Gosse P (2005). Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl* **23**: S27-33.

Hagen T, Sethi JK, Foxwell N, Vidal-Puig A (2004). Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochem J* **379**: 471-7.

Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B *et al* (2003). Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4610-5.

Harris PC, Torres VE (2009). Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* **60**: 321-37.

Hayabuchi Y, Nakaya Y, Mawatari K, Inoue M, Sakata M, Kagami S (2011). Cell membrane stretch activates intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in arterial smooth muscle cells. *Heart Vessels* **26**: 91-100.

Heineke J, Molkenin JD (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 589-600.

Hendriksen J, Jansen M, Brown CM, van der Velde H, van Ham M, Galjart N *et al* (2008). Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J Cell Sci* **121**: 1793-802.

Huan Y, van Adelsberg J (1999). Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* **104**: 1459-68.

Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C *et al* (2004). Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* **279**: 7554-65.

Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, Lin Y, Rocco P, Rebellato P *et al* (2013b). Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ Res* **112**: 236-45.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Fujii N, Miyazaki H *et al* (2003). Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. *Hypertens Res* **26**: 829-37.

Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M *et al* (1993). Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* **87**: 1715-21.

Kandadi MR, Panzhinskiy E, Roe ND, Nair S, Hu D, Sun A (2015). Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1852**: 299-309.

Kim E, Arnould T, Sellin LK, Benzing T, Fan MJ, Gruning W *et al* (1999). The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**: 4947-53.

Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C *et al* (2008). Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* **22**: 2531-43.

Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E *et al* (1990). Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* **265**: 3595-8.

Kudoh S, Komuro I, Hiroi Y, Zou Y, Harada K, Sugaya T *et al* (1998). Mechanical stretch induces hypertrophic responses in cardiac myocytes of angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *J Biol Chem* **273**: 24037-43.

Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND *et al* (2008). Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet* **17**: 3105-17.

Lavandero S, Foncea R, Perez V, Sapag-Hagar M (1998). Effect of inhibitors of signal transduction on IGF-1-induced protein synthesis associated with hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *FEBS Lett* **422**: 193-6.

Li Y, Santoso NG, Yu S, Woodward OM, Qian F, Guggino WB (2009). Polycystin-1 interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling with implications for polycystic kidney disease. *J Biol Chem* **284**: 36431-41.

Loennechen JP, Stoylen A, Beisvag V, Wisloff U, Ellingsen O (2001). Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**: H2902-10.

Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ (1995). G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor. *J Biol Chem* **270**: 16495-8.

McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E *et al* (2004). The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) pathway. *J Biol Chem* **279**: 4782-93.

Merrick D, Chapin H, Baggs JE, Yu Z, Somlo S, Sun Z *et al* (2012). The gamma-secretase cleavage product of polycystin-1 regulates TCF and CHOP-mediated transcriptional activation through a p300-dependent mechanism. *Dev Cell* **22**: 197-210.

Munoz JP, Collao A, Chiong M, Maldonado C, Adasme T, Carrasco L *et al* (2009). The transcription factor MEF2C mediates cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **388**: 155-60.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R (1999). E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* **112**: 1237-45.

Parnell SC, Puri S, Wallace DP, Calvet JP (2012). Protein phosphatase-1alpha interacts with and dephosphorylates polycystin-1. *PLoS One* **7**: e36798.

Pedrozo Z, Criollo A, Battiprolu PK, Morales CR, Contreras-Ferrat A, Fernandez C *et al* (2015). Polycystin-1 is a cardiomyocyte mechanosensor that governs L-type Ca²⁺ channel protein stability. *Circulation* **131**: 2131-42.

Pedrozo Z, Sanchez G, Torrealba N, Valenzuela R, Fernandez C, Hidalgo C *et al* (2010). Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* **1802**: 356-62.

Peters DJ, van de Wal A, Spruit L, Saris JJ, Breuning MH, Bruijn JA *et al* (1999). Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J Pathol* **188**: 439-46.

Piperi C, Basdra EK (2015). Polycystins and mechanotransduction: From physiology to disease. *World J Exp Med* **5**: 200-5.

Qian F, Wei W, Germino G, Oberhauser A (2005). The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *J Biol Chem* **280**: 40723-30.

Qu J, Zhou J, Yi XP, Dong B, Zheng H, Miller LM *et al* (2007). Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction. *J Mol Cell Cardiol* **43**: 319-26.

Rakesh K, Yoo B, Kim IM, Salazar N, Kim KS, Rockman HA (2010). beta-Arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Sci Signal* **3**: ra46.

Ren J, Samson WK, Sowers JR (1999). Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* **31**: 2049-61.

Ruilope LM, Schmieder RE (2008). Left ventricular hypertrophy and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens* **21**: 500-8.

Ruwhof C, van der Laarse A (2000). Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* **47**: 23-37.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* **75**: 977-84.

Samarel AM (2005). Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H2291-301.

Seimi SK, Seinosuke K, Tsuyoshi S, Tomomi U, Tetsuaki H, Miki K *et al* (2004). Glycogen synthase kinase-3beta is involved in the process of myocardial hypertrophy stimulated by insulin-like growth factor-1. *Circ J* **68**: 247-53.

Serneri GG, Modesti PA, Boddi M, Cecioni I, Paniccchia R, Coppo M *et al* (1999). Cardiac growth factors in human hypertrophy. Relations with myocardial contractility and wall stress. *Circ Res* **85**: 57-67.

Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH, Low SH, Hedgepeth R, Brown N *et al* (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 5466-71.

Spirli C, Okolicsanyi S, Fiorotto R, Fabris L, Cadamuro M, Lecchi S *et al* (2010). Mammalian target of rapamycin regulates vascular endothelial growth factor-dependent liver cyst growth in polycystin-2-defective mice. *Hepatology* **51**: 1778-88.

Sunters A, Armstrong VJ, Zaman G, Kypta RM, Kawano Y, Lanyon LE *et al* (2010). Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor alpha-mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to Ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor-independent activation of beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **285**: 8743-58.

Tahimic CG, Long RK, Kubota T, Sun MY, Elalieh H, Fong C *et al* (2016). Regulation of ligand and shear stress-induced insulin-like growth factor 1 (IGF1) signaling by the integrin pathway. *J Biol Chem* **291**:8140-9

Talbot JJ, Shillingford JM, Vasanth S, Doerr N, Mukherjee S, Kinter MT *et al* (2011). Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 7985-90.

Tateishi A, Matsushita M, Asai T, Masuda Z, Kuriyama M, Kanki K *et al* (2010). Effect of inhibition of glycogen synthase kinase-3 on cardiac hypertrophy during acute pressure overload. *Gen Thorac Cardiovasc Sur* **58**: 265-70.

Thiebaut PA, Besnier M, Gomez E, Richard V (2016). Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* **101**:50-57.

Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L *et al* (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **27**: 7703-17.

Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S (2014). New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab* **25**: 128-37.

van de Schans VA, van den Borne SW, Strzelecka AE, Janssen BJ, van der Velden JL, Langen RC *et al* (2007). Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**: 473-80.

van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoorn LJ, Schrier PI, van der Laarse A (2000). Rapid effects of stretched myocardial and vascular cells on gene expression of neonatal rat cardiomyocytes with emphasis on autocrine and paracrine mechanisms. *Arch Biochem Biophys* **381**: 67-73.

Weber KT, Brilla CG, Cleland JG, Cohn JN, Hansson L, Heagerty AM *et al* (1993). Cardioreparation and the concept of modulating cardiovascular structure and function. *Blood Press* **2**: 6-21.

Wilson PD, Geng L, Li X, Burrow CR (1999). The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal clusters in adherent renal epithelia. *Lab Invest* **79**: 1311-23.

Xu JX, Lu TS, Li S, Wu Y, Ding L, Denker BM *et al* (2014). Polycystin-1 and Galpha12 regulate the cleavage of E-cadherin in kidney epithelial cells. *Physiol Genomics* **47**: 24-32.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B *et al* (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7324-9.

Yao G, Su X, Nguyen V, Roberts K, Li X, Takakura A *et al* (2014). Polycystin-1 regulates actin cytoskeleton organization and directional cell migration through a novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp complex. *Hum Mol Genet* **23**: 2769-79.

Yip SC, Saha S, Chernoff J (2010). PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci* **35**: 442-9.

Zhang CG, Jia ZQ, Li BH, Zhang H, Liu YN, Chen P *et al* (2009). beta-Catenin/TCF/LEF1 can directly regulate phenylephrine-induced cell hypertrophy and Anf transcription in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 258-62.

Zhou N, Li L, Wu J, Gong H, Niu Y, Sun A *et al* (2010). Mechanical stress-evoked but angiotensin II-independent activation of angiotensin II type 1 receptor induces cardiac hypertrophy through calcineurin pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **397**: 263-9.

ANEXO

Estudio preliminar para establecer si β -catenina es parte de la vía transduccional a través de la cual PC-1 regula la hipertrofia del cardiomiocito inducida por IGF-1.

- a) **Localización subcelular de β -catenina.** En el primer avance de tesis la comisión recomendó seguir utilizando como estímulo sólo IGF-1, por ello los experimentos se realizaron sólo con este estímulo. Para responder a este objetivo se probaron distintas estrategias experimentales, en primer lugar se realizó una inmunofluorescencia indirecta contra β -catenina, realizada en colaboración con el Laboratorio de Dr. Juan Pablo Henríquez, la que se muestra en la Figura I. Para este objetivo, los cardiomiocitos se privaron de suero por 24 h antes de hacer los estímulos y se incubaron con IGF-1 10 ó 100 nM por 1 h. En ambos casos no se observó translocación de β -catenina al núcleo. Sin embargo con la concentración más alta de IGF-1 (100 nM) se observó una marca importante de β catenina en puntos de unión célula célula.

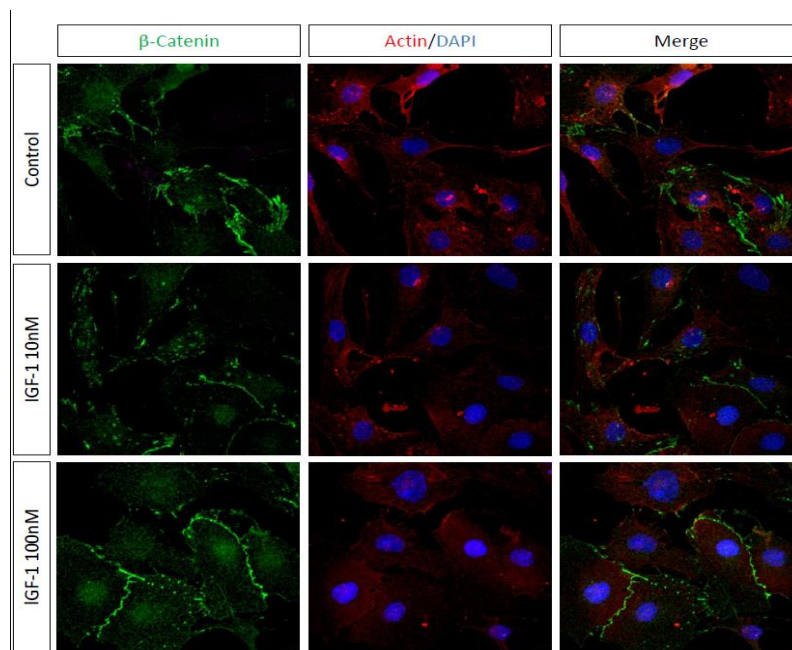


Figura I: IGF-1 no estimularía translocación de β -catenina al núcleo. Inmunocitoquímica para β -catenina. Verde: β -catenina, rojo: actina, azul: DAPI. Control: cardiomiocitos mantenidos en medio de mantención. IGF-1: 10 ó 100 nM por 1 h. n = 1

- b) **Regulación de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF.** Además, se determinó la participación de β -catenina mediante la utilización de un gen reportero de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF. Los cardiomiocitos se cotransfectaron con los plasmidios con los reporteros TOP FLASH o FOP FLASH y Renilla y estimulados con IGF-1 (10 nM por 24 h), fenilefrina (100 μ M por 24 h) o cloruro de litio (10 mM por 14 h), y se midió la actividad enzimática de luciferasa y renilla. A pesar de que fenilefrina y cloruro de litio se utilizaron como controles positivos, en literatura está descrito que ambas condiciones producen aumento de la actividad de este reportero, ninguna de estas condiciones estudiadas produjo un aumento en la actividad del reportero, situación similar se observa con IGF-1 10 nM por 24 h (Figura II)

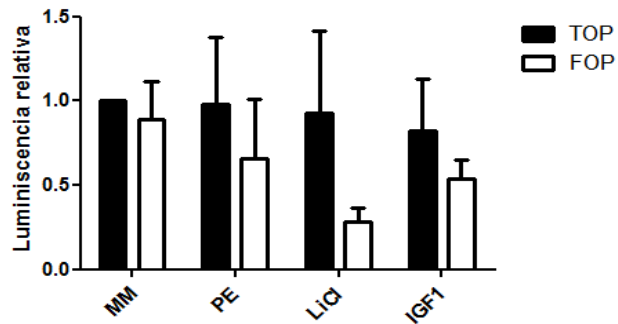


Figura II: Regulación de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF. TOP: plasmidio con las secuencias de unión para TCF/LEF. FOP: plasmidio con las secuencias de unión para TCF/LEF mutadas. Los cardiomiocitos se cotransfectaron con los plasmidios con los reporteros TOP FLASH o FOP FLASH y se midió la actividad luciferasa y renilla. MM: Medio de mantención. PE: fenilefrina 100 μ M, IGF-1 10 nM, LiCl 10 mM. $n \geq 2$

c) Efecto de IGF-1 en los niveles de β -catenina. Como no se observaron cambios por inmunofluorescencia en la translocación de β -catenina, ni en la actividad del reportero, se realizó una curva temporal con IGF-1 (10 nM) para ver cambios en los niveles totales de β -catenina por Western blot, (Figura III) a distintos tiempos. Se probó estimulación con IGF-1 tiempos cortos (5 min hasta 3 h), y tiempos largos (6 -24 -48 h), además se utilizó cloruro de litio (10 mM por 14 h) como control positivo. En ninguno de los tiempos estudiado se observa aumento en la masa total de β -catenina, tampoco se obtuvo diferencias por el uso del control positivo.

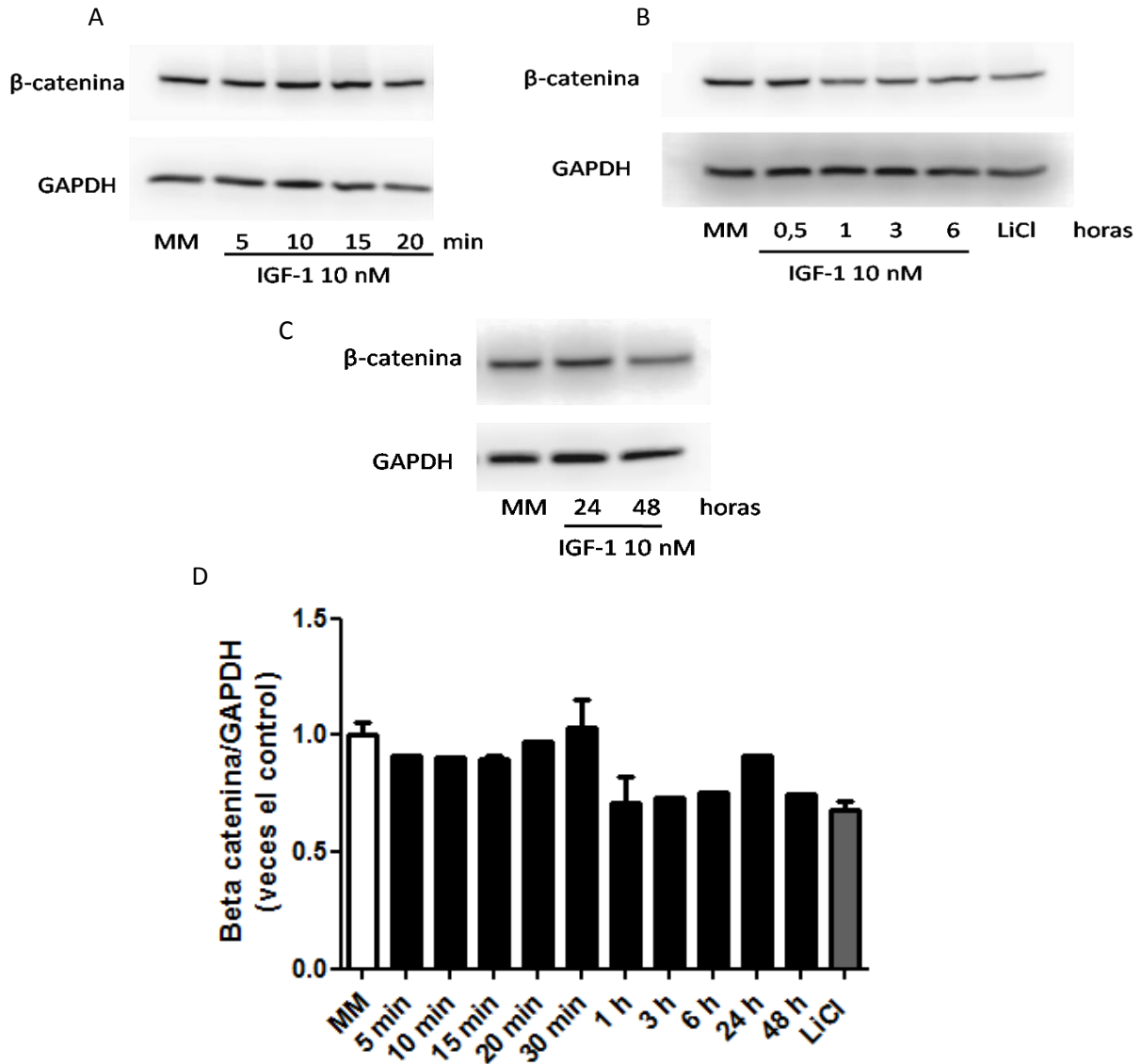


Figura III. Efecto de IGF-1 en los niveles de β -catenina. A: Western blot para β -catenina y GAPDH a tiempos cortos de incubación con IGF-1 10 nM (5, 10, 15 y 20 min). B: Western blot para β -catenina y GAPDH a tiempos más largos de incubación con IGF-1 10 nM (30 min, 1, 3 y 6 h), LiCl 10 mM por 14 h. C: Western blot para β -catenina y GAPDH a tiempos largos de incubación con IGF-1 10 nM (24 y 48 h). D: Cuantificación de los Western blots. $n \geq 2$

d) Efecto de IGF-1 en la distribución subcelular de β -catenina. Dado que en el ensayo de gen reportero no se observó aumento de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF con fenilefrina ni cloruro de litio, aumento que sí está descrito en literatura, se realizó un fraccionamiento subcelular para observar cambios en la localización subcelular de β -catenina. Como marcador de la fracción nuclear se utilizó la proteína Polimerasa II y como marcador de citosol GAPDH. Los estímulos que se utilizaron fueron fenilefrina (100 μ M por 24 h) y cloruro de litio (10 mM por 14 h). Con ninguno de los estímulos utilizados se observó cambios en la distribución subcelular de β -catenina (Figura IV).

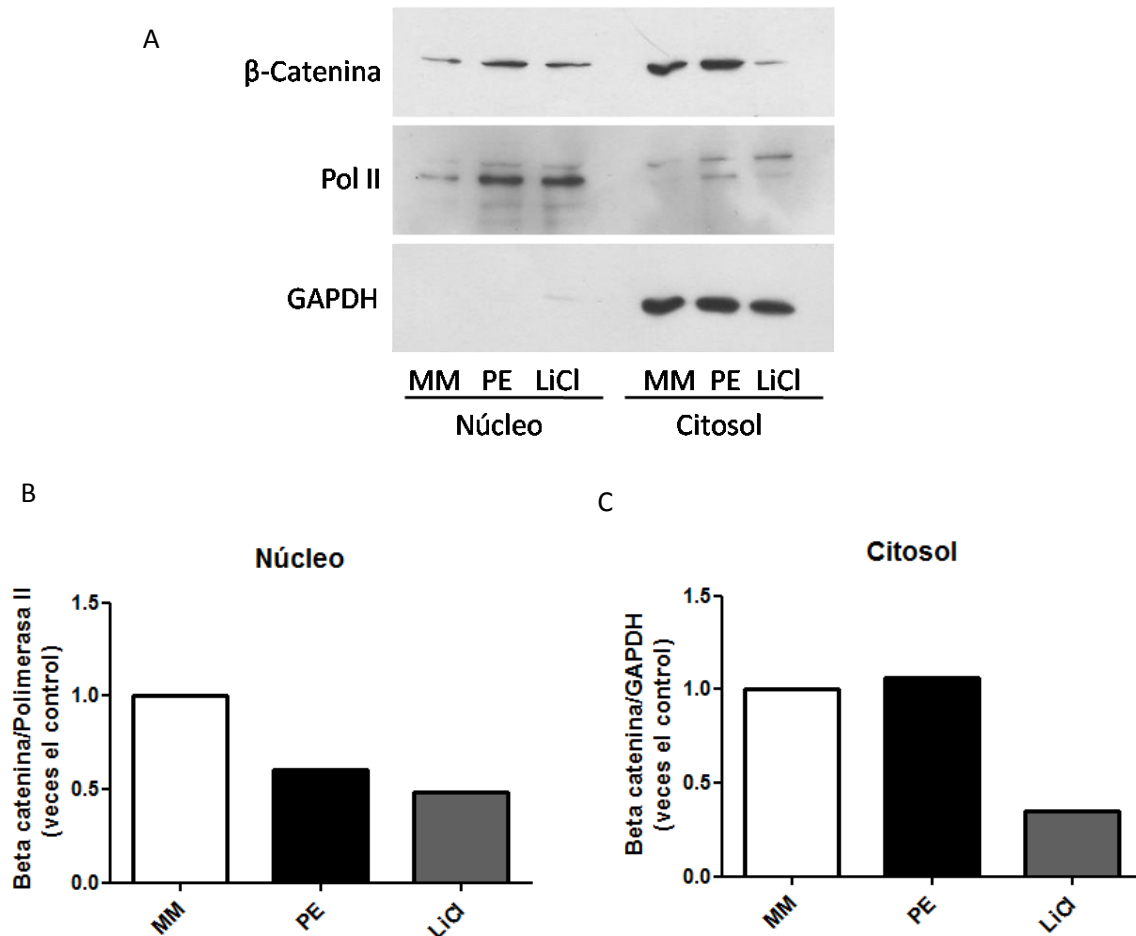


Figura IV: Efecto de IGF-1 en la distribución subcelular de β -catenina. A: Fraccionamiento subcelular, Western blot para el marcador de núcleo Polimerasa II (Pol II), marcador de citosol GAPDH y para β -catenina. B: Cuantificación de los niveles de β -catenina en núcleo. C: Cuantificación de los niveles de β -catenina en citosol. MM: Medio de mantenimiento, PE: fenilefrina 100 μ M por 24 h, LiCl: Cloruro de litio 10 mM por 14 h. n = 1

e) Rol de policistina-1 en la localización subcelular de β -catenina. A pesar de que no se observaron cambios en la localización subcelular de β -catenina, si se observó un aumento de la marca en los bordes de los cardiomiocitos (Figura I). Se realizó una inmunofluorescencia indirecta para β -catenina,

en colaboración con el laboratorio del Dr. Henríquez, en los cardiomiocitos transfectados con el siRNA para policistina-1. Las células se estimularon con IGF-1 10 nM por una hora, se utilizó cloruro de litio como control positivo (10 mM por 14 h). Como se observa en la imagen (Figura V), en los cardiomiocitos en los que se silenció policistina-1, y que fueron estimulados con IGF-1, la señal de β -catenina es muy débil, mientras que en los cardiomiocitos tratados con medio de mantención o LiCl la señal es similar a las que se observa en los que fueron transfectados con el siRNA control.

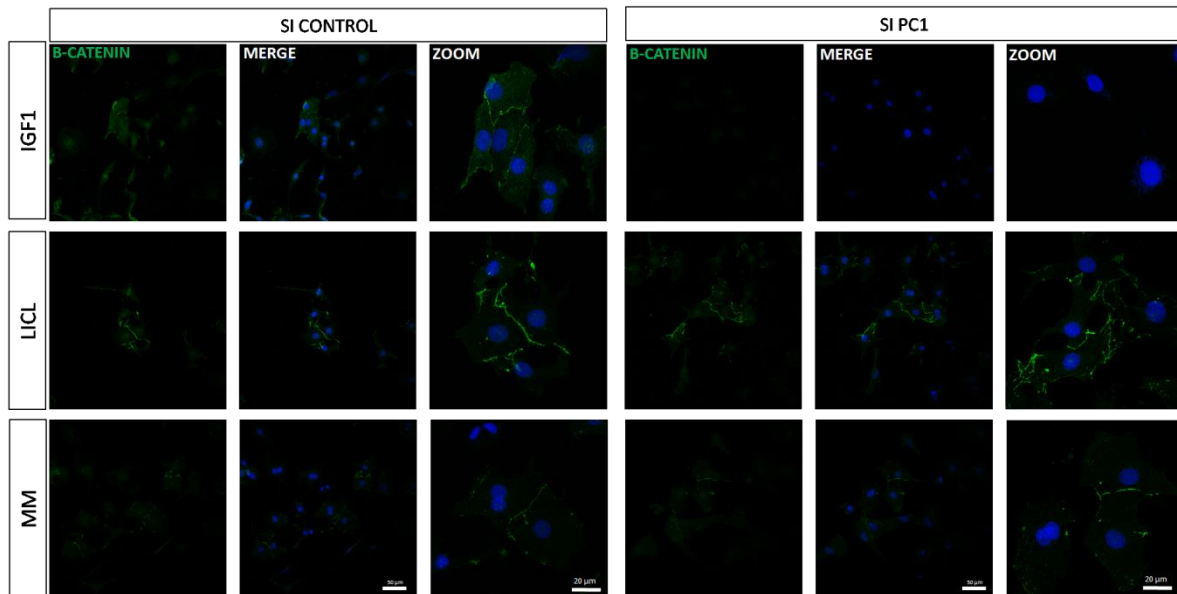


Figura V: Policistina-1 regularía la localización subcelular de β -catenina en los cardiomiocitos tratados con IGF-1. Inmunocitoquímica para β -catenina. Verde: β -catenina, azul: DAPI. MM: medio de mantención. IGF-1: 10 nM por 1 h, LiCl 10 mM por 14 h. n = 1

DISCUSIÓN

Rol de policistina-1 en la localización subcelular de β catenina en cardiomiocitos estimulados con IGF-1

Para determinar si β -catenina era parte de la vía transduccional regulada por PC-1, y de esta forma, se modula la hipertrofia inducida por IGF-1, se probaron tres técnicas, sin resultados positivos. En primer lugar, la inmunofluorescencia contra PC-1 no es concluyente, si bien es un solo experimento no se observa translocación al núcleo evidente de β -catenina en los cardiomiocitos tratados con IGF-1. Al hacer los ensayos de gen reportero, para determinar la actividad transcripcional dependiente de β -catenina-TCF/LEF no se observó un aumento en la actividad de este reportero al tratar los cardiomiocitos con LiCl ni con fenilefrina, aumento que está descrito en la literatura, lo que sugiere que el reportero podría no estar funcionando correctamente, por lo que este ensayo no permite descartar ni confirmar la participación de β -catenina en la vía transduccional que está dando cuenta del desarrollo de la hipertrofia en los cardiomiocitos tratados con IGF-1. Al hacer un fraccionamiento de núcleo y citoplasma, ni en el caso del LiCl ni del tratamiento con fenilefrina se observó un aumento de β -catenina en ninguna de las fracciones estudiadas, si bien este es un solo experimento, sumado a los resultados negativos del ensayo del gen reportero y a que no se observan cambios en la masa total de β -catenina, en ninguno de los tiempos estudiados, y a que sí se observaron efectos en otras vías transduccionales estudiadas, nos llevaron a profundizar en la vía de señalización clásica del receptor de IGF-1.

Con respecto a la localización subcelular de β -catenina los resultados obtenidos por inmunocitoquímica son distintos a los descritos por Zhang y colaboradores, quienes describieron que cardiomiocitos estimulados por 24 h con fenilefrina mostraban translocación al núcleo de β -catenina y aumento de la actividad del reportero para TCF/LEF (Zhang *et al.*, 2009). Nuestros resultados muestran un aumento de la señal de β -catenina en las cercanías de la membrana plasmática posterior al tratamiento con fenilefrina, IGF-1 o solución hiposmótica al 50%. Se ha descrito la existencia de dos reservorios de β -catenina, uno en membrana plasmática formando parte de las uniones adherentes y otro citoplasmático, (Orsulic *et al.*, 1999) este último en condiciones basales está en constante degradación proteosomal tras ser fosforilado previamente por la quinasa GSK3 β . Al acumularse β -catenina en el citoplasma translocaría al núcleo uniéndose a factores transcripcionales de la familia TCF/LEF promoviendo la transcripción dependiente de estos. Por otra parte, se encuentra descrito que tras el estímulo con el ligando Wnt hay acumulación de β -catenina en la membrana plasmática (Hendriksen *et al.*, 2008), sin translocación al núcleo pero con un aumento en la actividad del reportero para TCF/LEF. Nuestros datos sugieren un patrón muy similar a lo descrito por estos autores.

Estas evidencias además de trabajos realizados con β -catenina dirigida al núcleo o a membrana plasmática en los que se observa que la proteína dirigida a membrana plasmática estabiliza a la β -catenina citosólica y aumenta la actividad transcripcional, efecto que no ocurre con la proteína dirigida al núcleo (Hagen *et al.*, 2004), sugieren que los aumentos de β -catenina en la membrana plasmática podrían tener relación con un cambio postraduccionales que la dejaría en un estado competente para señalizar. Si bien nuestros resultados no replican lo descrito en literatura para nuestro tipo celular en relación a la translocación de β -catenina vista por inmunocitoquímica, nuestro control positivo si aumenta la actividad del reportero, en la hipertrofia inducida por IGF-1 si podría estar participando β -catenina, induciéndose su acumulación en las cercanías de la

membrana generándose estas formas competentes de señalización permitiendo el aumento de la actividad del reportero. Es necesario consolidar estos datos y posteriormente indagar en el rol que tendría esta acumulación de β -catenina y su relación con el desarrollo de hipertrofia.

El hecho que en los cardiomiocitos que presentaban silenciada policistina-1, estimulados con IGF-1 (Figura V), la señal de β catenina sea mucho más débil que los cardiomiocitos mantenidos en medio de mantención, es sumamente interesante, ya que indicaría que, en respuesta a IGF-1, policistina-1 estaría regulando a β -catenina. Hasta ahora se había reportado que policistina-1 podía regular principalmente la traslocación al núcleo y actividad transcripcional dependiente de β catenina-TCF Lef, pero no se había descrito que pudiese regular la masa de esta proteína.

Con respecto a β -catenina, podemos concluir que si bien no fue posible comprobar ni descartar su rol o regulación por policistina-1 en la hipertrofia inducida por IGF-1, son necesarios más experimentos para seguir indagando en esta área, aún así, si se confirman los resultados de la inmunofluorescencia indirecta para β -catenina en los cardiomiocitos en los que se silenció policistina-1, en que se observa que en estas células la marca fluorescente para β -catenina es mucho menor que en los controles, es sumamente interesante indagar en cómo está ocurriendo este fenómeno.