



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Pregrado

## “Regulación de la autofagia por GLP-1 en células musculares lisas vasculares (VSMC)”

Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de **Ingeniera en Biotecnología Molecular**.

**CONSTANZA BELÉN DE LOURDES NÚÑEZ SOTO**

Director del seminario de título: DR. MARIO CHIONG LAY

Profesor Patrocinante: DR. ÁLVARO GLAVIC MAURER

Septiembre 2017

Santiago - Chile



## **INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. CONSTANZA BELÉN DE LOURDES NÚÑEZ SOTO**

**“REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLP-1 EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES (VSMC)”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## BIOGRAFÍA

### Constanza Belén de Lourdes Núñez Soto



Nací en el hospital clínico de la Universidad de Chile un 9 de Abril de 1992. Soy la menor de tres hermanos y única nieta de la familia. Realicé mis estudios de enseñanza básica y media en un colegio de la comuna El Bosque. Desde pequeña siempre me ha gustado bailar, lo que me llevó a ser parte del BaFoChi a los 9 años. El folclor siguió siendo parte de mi vida durante toda mi etapa escolar, pero también me desempeñé en el área de los deportes. A los 10 años comencé a ser parte de los Halcones Tantauco, equipo de cheerleader donde llegué a ser capitana. Otro deporte muy importante en mi vida es el fútbol. Mi gusto por el deporte más lindo del mundo no se basó solo en jugarlo, sino en ser hinchita fanática del Club Universidad de Chile. Además, siempre me han gustado las artes escénicas, faceta que pude desarrollar en el colegio y también en la universidad en el taller de Teatro y gracias al curso que realicé en el Teatro Camino de Héctor Noguera. Por otro lado, me encanta viajar. Mochilear y conocer diferentes lugares del norte y sur de Chile se ha vuelto una costumbre de mis veranos.

En cuanto a la ciencia, este gusto nació en primero medio gracias a las enseñanzas de mis profesores de biología, química y física. Esto me llevó a optar por la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. En primer año, realicé una pasantía en el área de la microbiología, pero en tercer año, descubrí que mi interés está enfocado a la biomedicina, lo que me llevó a trabajar en el Laboratorio de Metabolismo y Remodelado Vascular, donde realicé una unidad de investigación y mi tesis.

Pienso que el equilibrio es primordial en la vida. Por lo que a pesar de que la ciencia es muy importante para mí, pretendo seguir recorriendo el mundo y explotando mis otras facetas.

*A mis padres  
A mi hermano  
A mi ita*

*Cuando alguien busca, suele ocurrir que  
sus ojos solo ven aquello que anda buscando,  
Y ya no logra encontrar nada  
Ni se vuelve receptivo a nada  
Porque solo piensa en lo que busca  
Porque tiene un objetivo  
y se halla poseído por él  
Buscar significa tener un objetivo,  
Pero encontrar significa ser libre,  
Estar abierto,  
Carecer de objetivos...*

*Siddharta – Hermann Hesse 1950*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al profe Mario por la oportunidad, por la confianza, por la libertad y por tener más fe en mí que yo misma, incluso cuando pensaba en dejar la ciencia.

A Don Fidel y a la señora Gindra, personas sin las cuales el laboratorio sería un desastre. Gracias a ambos por la amabilidad y la disposición para ayudarme hasta en lo más mínimo.

Quiero agradecer a los chiongcitos, en especial a Ignacio, con quién más discutí mis resultados. A la Feña, Andrea, Nicole, David, Jaime y a todos los que alguna vez lo fueron. Quiero agradecer a todo labsito por hacer las jornadas laborales más llevaderas, por las maratones musicales, las risas y por toda la ayuda, muy especialmente al Apu, a la Maca y a la Carito.

A todo labsote. A las mujeres del laboratorio: Moni, Vale, Cami, a todas, gracias por la ayuda y por los “after lab” que ayudaban a desahogarse y desconectarse. También quiero agradecer a Pablo, quien con mucha paciencia me enseñó a trabajar en el laboratorio cuando no sabía nada de nada y porque ha seguido ayudándome y apoyándome con mis resultados. Al mañoso de Cachorro que me ayudó con los análisis digitales. A César por enseñarme a dibujar en el computador y por el panda de origami de vida eterna que gentilmente me regalaste.

Agradecer enormemente a mis amigas del colegio que estuvieron apoyándome en esta etapa tan difícil, en especial a la Dani, a mi prima y a la Tamara. Más especialmente a Rocío, que es la persona que más me ha escuchado, aconsejado, apañado y que realmente ha estado en las buenas y en las malas.

A mi pololo, gracias Rodo por tu paciencia, compañía, comprensión y cariño durante este tiempo complicado.

Agradecer a quienes compartieron esta etapa conmigo. Mis amigos y compañeros de carrera. Joaco, Nopi, Rama, Dani, Naty, Engel, Galoy, Sebita y a todos. Mención especial para mi tocaya, gracias por quedarte conmigo a estudiar hasta la madrugada y por no dejar que tirara la esponja.

Finalmente, pero los más importantes, a mi familia. A mi mamá por el cariño, la preocupación y por la rica comida. A mi hermano Eduardo, que fue quien más me aguantó, consoló y ayudó, sobre todo con el inglés. A mis padres, porque por ellos estoy terminando esta carrera. Porque gracias a su esfuerzo no partiré mi vida adulta endeudada. Gracias mamá porque sé que en el fondo te la hubieras jugado por apoyarme en mis otras facetas. Gracias papá porque sé que a tu manera solo quieres lo mejor para mí. Gracias a ellos 4 por el amor y la contención durante todos estos años.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares .....	1
1.2. Células Musculares Lisas Vasculares .....	4
1.3. Autofagia.....	5
1.4. Autofagia en VSMC .....	7
1.5. Péptido similar a glucagón 1: GLP-1 .....	8
1.6. Receptor de GLP-1 y su señalización. ....	10
1.7. Proteína quinasa dependiente de AMPc: PKA. ....	11
1.8. PKA y regulación de la autofagia. ....	13
1.9. Modelo de estudio y planteamiento de la hipótesis. ....	14
2. HIPÓTESIS .....	15
3. OBJETIVO GENERAL.....	15
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
5.1. Modelo de estudio y cultivo celular.....	16
5.2. Tratamiento de células .....	16

5.3. Preparación de extractos celulares totales.....	17
5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas .....	17
5.5. Western blot.....	18
5.6. Transducción adenoviral.....	19
5.7. Análisis digital de imágenes .....	19
5.8. Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS .....	21
6.1. Inducción de la autofagia en VSMC.....	21
6.2. GLP-1 inhibe la autofagia basal y la autofagia inducida en VSMC.....	27
6.3. GLP-1 previene la autofagia vía PKA en VSMC .....	32
6.4. La inhibición de la autofagia por GLP-1 vía GLP-1R/cAMP/PKA no ocurre por fosforilación de LC3 .....	38
7. DISCUSIÓN .....	40
8. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	47
9. BIBLIOGRAFÍA .....	48
10. ANEXOS .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación placa ateroma. ....	2
Figura 2. Capas de los vasos sanguíneos. ....	3
Figura 3. Fenotipos de las células musculares lisas vasculares. ....	5
Figura 4. Etapas del proceso autofágico. ....	7
Figura 5. Efectos fisiológicos de la activación de GLP-1R. ....	11
Figura 6. Vía de señalización canónica de PKA. ....	12
Figura 7. Cinética de inducción de autofagia en células privadas de suero. ....	21
Figura 8. Cinética de inducción de autofagia y detención del flujo autofágico en células privadas de suero. ....	22
Figura 9. Cinética inducción de autofagia en células no privadas de suero. ....	23
Figura 10. Cinética de inducción de autofagia y detención del flujo autofágico en células no privadas de suero. ....	24
Figura 11. Cinética de inducción de autofagia y evaluación de formación de vesículas. ....	25
Figura 12. Cinética de detención del flujo autofágico y evaluación de formación de vesículas. ....	26
Figura 13. Autofagia basal versus autofagia inducida. ....	27
Figura 14. GLP-1 inhibe la acumulación de LC3 II. ....	28
Figura 15. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas en la autofagia basal. ....	30
Figura 16. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas en la autofagia inducida. ....	31
Figura 17. GLP-1 inhibe el flujo autofágico vía PKA en la autofagia basal. ....	33
Figura 18. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas vía PKA en la autofagia basal. ....	34
Figura 19. GLP-1 inhibe el flujo autofágico vía PKA en la autofagia por privación de glucosa. ....	35
Figura 20. GLP-1 no disminuye la formación de autofagosomas en condiciones de privación de glucosa. ....	37
Figura 21. GLP-1 no induce la fosforilación de LC3 por PKA en VSMC. ....	39
Figura 22. Inducción de autofagia en células privadas de suero. ....	56
Figura 23. Efecto de TNF- $\alpha$ sobre los marcadores de autofagia en las células A7r5. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	: $\alpha$ -actina de músculo liso
AC	: Adenilil ciclasa
AMPc	: Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	: proteína quinasa dependiente de AMP
ANOVA	: Análisis de varianza
ATP	: Adenosín trifosfato
CQ	: Cloroquina
CREB	: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
DM	: Diabetes mellitus
DMEM	: Dulbecco Eagle modificado
DPP-4	: Dipeptidil peptidasa 4
EDTA	: Etilendiaminotetracetato
FBS	: Suero fetal bovino
GAPDH	: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	: Proteína fluorescente verde
GIP	: Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa
GLP-1	: Péptido similar a glucagón-1
GLP-1R	: Receptor de GLP-1
H-89	: (E)-N-(2-(3-(4-bromofenil)alilamino)etil)-isoquinolina-5-sulfonamida)
IgG	: Inmunoglobulina G
LC3	: Proteína asociada a microtúbulo 1A/1B-cadena liviana 3
MEC	: Matriz extracelular
MOI	: Multiplicidad de infección
mTOR	: Proteína blanco de la rapamicina de mamífero
p-LC3	: LC3 fosforilado en la serina 12
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	: Estructura preautofagosomal

PBS	: Amortiguador fosfato salino
PDGF-BB	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB
PE	: Fosfatidiletanolamina
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III
PI3P	: Fosfatidilinositol-3-fosfato
PKA	: Proteína kinasa A
PKAC	: Subunidad catalítica de la PKA
PKAR	: Subunidad regulatoria de la PKA
PVDF	: Fluoruro de polivinilideno
RE	: Retículo endoplásmico
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar medio
TBS	: Amortiguador Tris-borato salino
TNF- $\alpha$	: Factor de necrosis tumoral $\alpha$
ULK	: Quinasa similar a Unc51
VSMC	: Células musculares lisas vasculares

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo. Desregulaciones en el flujo autofágico y en la desdiferenciación de células musculares lisas vasculares (VSMC) se han asociado con diferentes enfermedades cardiovasculares. En la aterosclerosis, una de las patologías cardiovasculares más importante, las VSMC desempeñan un papel fundamental cuando cambian su fenotipo desde uno contráctil y quiescente a otro proliferativo, migratorio y sintético. Se ha descrito que el cambio fenotípico de las VSMC es un proceso dependiente de autofagia. Por lo tanto, encontrar nuevos mecanismos que regulen este cambio fenotípico es fundamental para generar nuevas alternativas para tratar las enfermedades cardiovasculares. Dentro de esta búsqueda, el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), una hormona de la familia de las incretinas, surge como un potencial inhibidor de este proceso. Nuestro laboratorio ha descrito que esta incretina, al unirse a su receptor, activa a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA). Se ha descrito a la PKA como un regulador negativo de la autofagia, ya que fosforila e inhibe a la proteína asociada a microtúbulo 1A/1B cadena liviana 3B, conocida también como LC3, una proteína autofágica esencial que también se usa como marcadora de la autofagia. Además, tanto en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 como en pacientes sanos, se ha comprobado la acción beneficiosa de GLP-1 sobre la aterosclerosis.

Por estos antecedentes, proponemos que GLP-1 inhibe la autofagia a través de la fosforilación de LC3 por PKA en VSMC.

La línea celular de aorta de rata, A7r5, se cultivó en condiciones basales en medio completo suplementado con 10% suero fetal bovino. La autofagia se indujo con un medio de cultivo carente de glucosa, el RPMI 1640. Además, las células A7r5 se estimularon con GLP-1 y/o H-89 [(E)-N-(2-(3-(4-bromofenil)alilamino)etil)-isoquinolin-5-sulfonamida], inhibidor de PKA. La autofagia se evaluó midiendo los niveles proteicos de LC3 I y LC3 II por western blot y por la formación de autofagosomas. Los autofagosomas se visualizaron mediante la transducción de VSMC con un adenovirus que sobreexpresa

LC3 acoplada a la proteína fluorescente verde con una multiplicidad de infección de 180 y microscopía confocal. El flujo autofágico se determinó usando cloroquina.

Nuestros resultados sugieren que GLP-1 disminuye el flujo autofágico en condiciones basales y de privación de glucosa. Además, GLP-1 disminuyó el número de autofagosomas por célula en la autofagia basal, pero no durante la privación de glucosa. Asimismo, se determinó que PKA participaría en los efectos generados por GLP-1 en la autofagia basal, pero no en la autofagia inducida por privación de glucosa. Finalmente, GLP-1 no aumenta la fosforilación de LC3. Este resultado sugiere que la inhibición de la autofagia por GLP-1 mediante PKA no ocurría por fosforilación de LC3.

Por lo tanto, el efecto de GLP-1 en la inhibición de la autofagia en VSMC vía PKA, se suma a los antecedentes que postulan a GLP-1 como un promisorio regulador de la aterosclerosis y de otras enfermedades cardiovasculares.

## ABSTRACT

### **Autophagy regulation by GLP-1 in vascular smooth muscle cells (VSMC)**

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. Dereglulation in both autophagic flux and vascular smooth muscle cell (VSMC) dedifferentiation have been associated with different cardiovascular diseases. In atherosclerosis, one of the most important cardiovascular pathology, VSMC play a critical role when they change from a contractile and quiescent phenotype to a proliferative, migratory and synthetic phenotype. It was described that this phenotypic change is an autophagy-dependent process. Hence, finding new mechanisms to regulate this phenotypic change is critical to generate new alternatives to treat cardiovascular diseases. In this investigation, glucagon like peptide 1 (GLP-1) arises as a potential inhibitor of this process. Our laboratory has described that this incretin, upon binding to its receptor, activates the cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA). PKA was described as a negative autophagy regulator, because it phosphorylates and inhibits the microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, also known as LC3, an essential autophagic protein also used as an autophagy marker. Besides, in both diabetic patients and healthy patients, the beneficial effects of GLP-1 on atherosclerosis has been demonstrated.

Taking the above in consideration, we proposed that GLP-1 inhibits autophagy through a PKA induced LC3 phosphorylation in VSMC.

The aortic VSMC cell line A7r5 were cultivated in basal condition with complete culture medium + 10% fetal bovine serum. Autophagy was induced with a glucose deprived culture medium, RPMI 1640. Also, A7r5 cells were stimulated with GLP-1, and/or H-89 [(E)-N-(2-(3-(4-bromophenyl)alylamino)ethyl)-isoquinoline-5-sulfonamide], a PKA inhibitor. Autophagy was assessed by LC3 I and LC3 II levels using by western blot and by autophagosome formation. Autophagosomes were visualized by adenoviral transduction of LC3 coupled to green fluorescent protein using a

multiplicity of infection of 180 and confocal microscopy. Autophagic flux was evaluated using chloroquine.

Our results suggest that GLP-1 inhibits autophagic flux under basal and glucose deprivation conditions. In addition, GLP-1 decreased the number of autophagosomes per cell in basal autophagy, but not in glucose deprivation-induced autophagy. Moreover, a PKA participation was demonstrated in the GLP-1-dependent effects on basal autophagy, but not on glucose deprivation-induced autophagy. Finally, GLP-1 did not increase LC3 phosphorylation. This result suggest that the GLP-1-dependent autophagy inhibition would not occur through LC3 phosphorylation.

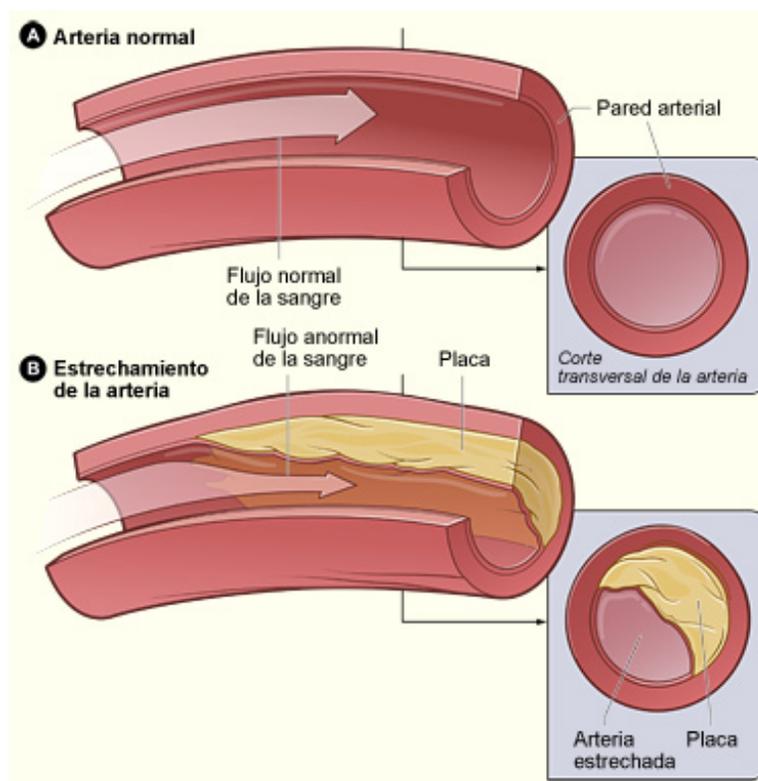
Therefore, the GLP-1 effect on autophagy inhibition in VSMC via PKA adds to the background information which suggests GLP-1 as a promising regulator of atherosclerosis and other cardiovascular diseases.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en Chile y en el mundo (Mendis y col., 2011; Benjamin y col., 2017). Estas enfermedades abarcan las patologías del corazón, enfermedades vasculares del cerebro y patología de los vasos sanguíneos. En Chile, el año 2012 el 27,53% de las muertes fueron causadas por enfermedades del sistema circulatorio (MINSAL, 2014). A nivel mundial, en el año 2008, hubo más de 17 millones de muertes debido a enfermedades cardiovasculares, de las cuales 3 millones correspondieron a personas menores de 60 años, muertes que, según la Organización Mundial de la Salud, serían totalmente prevenibles (Mendis y col., 2011). La OMS, además, señaló recientemente que en el año 2015, 54% de las muertes de todo el mundo se ocasionaron por 10 principales causas, siendo la enfermedad cardíaca isquémica y el accidente cerebro vascular las principales responsables de estos decesos (World Health Organization, 2017).

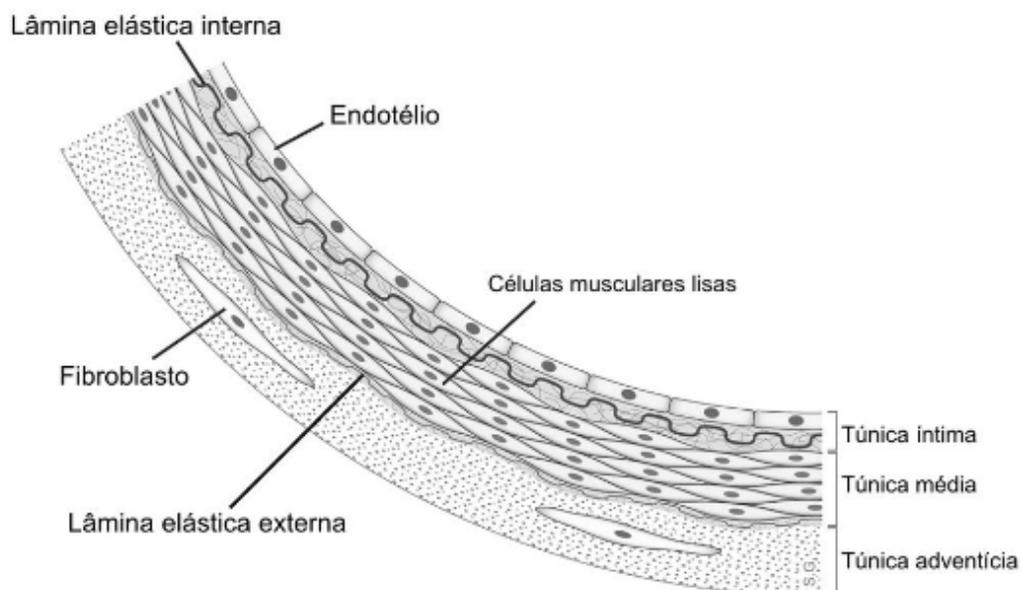
Dentro de este tipo de enfermedades podemos encontrar las derivadas de la aterosclerosis, tal como la enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedades de la aorta y arterias. Sin embargo, también existen otras patologías no ateroscleróticas, tales como las cardiopatías congénitas, enfermedad cardíaca reumática y arritmias cardíacas (Mendis y col., 2011). La aterosclerosis es una patología de los vasos sanguíneos que se desarrolla durante años. Ocurre cuando material graso y colesterol se depositan en el lumen de los vasos sanguíneos de tamaño medio y grande (arterias), generando una placa que disminuye el lumen de los vasos sanguíneos dificultando el paso de la sangre (Figura 1). Dicha placa puede romperse provocando un coágulo de sangre, el cual puede generar un ataque al corazón, si se produce en una arteria coronaria; o un derrame cerebral, si ocurre en el cerebro (Mendis y col., 2011; NHLBI, 2016).



**Figura 1. Formación placa ateroma.**

En **A)** se presenta una arteria con flujo normal de sangre. La imagen del recuadro muestra el corte transversal de una arteria normal. En **B)** se presenta una arteria con flujo anormal de sangre debido al depósito de placa. En el recuadro se observa el corte transversal (Imagen reproducida de National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) (2016)).

Los vasos sanguíneos están formados por 3 capas o tunicas: íntima, media y adventicia (Figura 2). Estas tunicas están claramente definidas en vasos grandes como las arterias (Rudijanto, 2007). La túnica íntima posee una monocapa continua de endotelio, posicionado en la membrana basal, en contacto directo con el flujo sanguíneo, y está separada de la capa media por la membrana elástica interna (Rudijanto, 2007). La capa media está compuesta principalmente de células musculares lisas vasculares (VSMC, por sus siglas en inglés *Vascular Smooth Muscle Cell*) contráctiles, macrófagos y fibroblastos (Zalewski y col., 2002). Esta capa posee colágeno de tipo I y III y una variedad de glicoproteínas (Newby, 2002). Finalmente, la capa más externa o adventicia, está compuesta por tejido conectivo con fibras nerviosas, pequeños vasos sanguíneos y grasa libre en la matriz intersticial (Wight, 1995).



**Figura 2. Capas de los vasos sanguíneos.**

Los vasos sanguíneos están compuestos por 3 capas o túnicas principales: íntima, media y adventicia. La primera está compuesta principalmente de endotelio, en la capa media se destaca la gran presencia de VSMC, y la capa externa o adventicia está compuesta sustancialmente por tejido conectivo (Imagen reproducida de Wikimedia-Commons (2007)).

La aterosclerosis se desarrolla a través de la lesión de las células del endotelio, por diversas causas como diabetes mellitus (DM), hipertensión o dislipidemia (Rudijanto, 2007). Una vez inducida esta lesión en el endotelio, se desencadenan una serie de procesos: se reclutan macrófagos (Rudijanto, 2007), aumenta la permeabilidad a los lípidos y se forman células espumosas (Morel y col., 1983; Khoo y col., 1992; Griendling & Alexander, 1997), y se reclutan linfocitos T y plaquetas (Davies & Hagen, 1994; Schachter, 1997). Luego, las células endoteliales, las células inflamatorias y las plaquetas comienzan a secretar diversos mediadores, tales como factores de crecimiento y citoquinas, que generan efectos principalmente en las VSMC (Liaw y col., 1994; Libby y col., 1997; Schachter, 1997; Schwartz, 1997). Las células de la musculatura lisa, como consecuencia, sufren un cambio fenotípico y pasan desde un estado quiescente y contráctil a un estado sintético, proliferativo y migratorio (Schaper & Ito, 1996; Wolf y col., 1998). Este nuevo fenotipo les permite moverse desde la capa media hacia la capa íntima, donde se entremezclan en la zona de la lesión (Liaw y col., 1994; Rudijanto, 2007). En ese lugar

comienzan a sintetizar y secretar componentes de la matriz extracelular (MEC), como por ejemplo colágeno (Frid y col., 1997; Gittenberger-de Groot y col., 1999). Todo este proceso culmina en la formación de un depósito de placa (Figura 1B). La apoptosis de las VSMC puede promover la ruptura de la placa (Newby y col., 1999), pudiendo generar un derrame cerebral o un ataque cardiaco, como se mencionó anteriormente (Mendis y col., 2011; NHLBI, 2016).

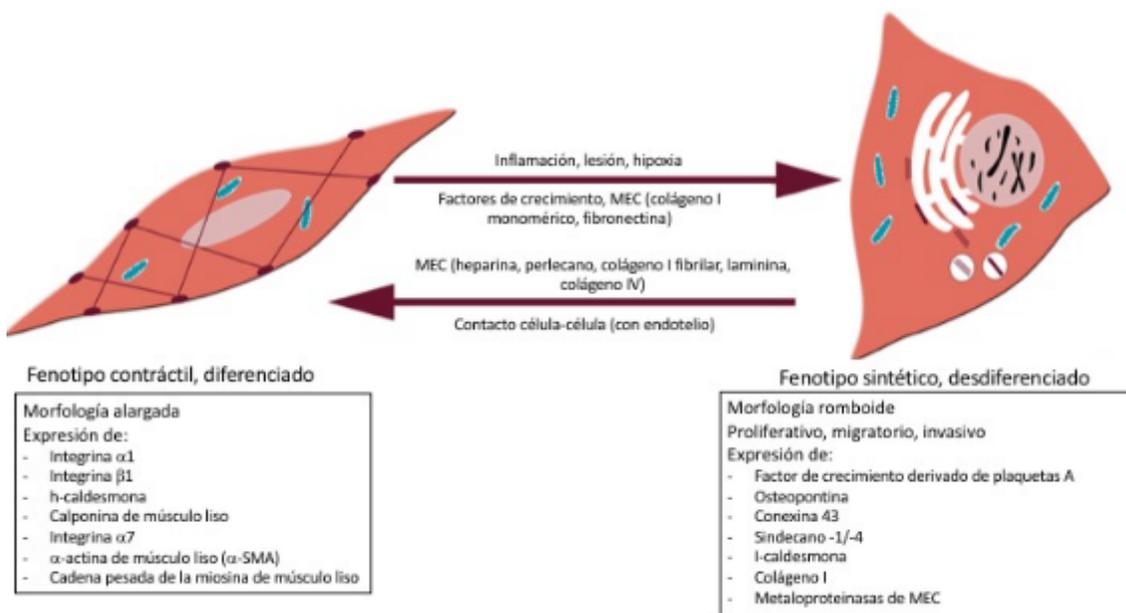
Estos antecedentes dejan de manifiesto la importancia que tiene este tipo de células, VSMC, en el desarrollo de la aterosclerosis, en la ruptura del depósito de placa y, en consecuencia, en la generación de otras enfermedades cardiovasculares.

## **1.2. Células Musculares Lisas Vasculares**

Las VSMC son ampliamente utilizadas para el estudio de patologías como aterosclerosis, hipertensión y aneurisma (Petri y col., 2015; Su y col., 2015; Liu y col., 2016). Esto debido a que son el principal componente de la túnica media de las arterias y, al tener la capacidad de contraerse, controlan el diámetro de los vasos sanguíneos, así como el flujo de la sangre y la presión (Rzucidlo y col., 2007; Cecchetti y col., 2011). Estas células existen en diferentes fenotipos. El primero, corresponde al fenotipo diferenciado, quiescente o contráctil, donde destaca la presencia de proteínas como  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la cadena pesada de la miosina, h-caldesmona y calponina; cuya interacción permite la contracción de estas células (Rzucidlo y col., 2007; Cecchetti y col., 2011) por lo que pueden regular la vasodilatación y vasoconstricción y, consecuentemente, el flujo sanguíneo (Schaper & Ito, 1996; Wolf y col., 1998). El fenotipo desdiferenciado corresponde a células con capacidades sintética, migratoria y proliferativa, presente en lesiones en la capa íntima de los vasos sanguíneos (Schaper & Ito, 1996; Wolf y col., 1998), donde sintetizan y reparan componentes de la MEC que estructuran la pared vascular (Cecchetti y col., 2011). El fenotipo contráctil de las VSMC se desdiferencia en respuesta a varios factores fisiológicos y patológicos (Owens y col., 2004), tales como estímulos mecánicos, especies reactivas de oxígeno (ROS), MEC, interacción con el endotelio, entre otros variados factores (Campbell & Campbell,

1985; Cecchetti y col., 2011). En la figura 3 se pueden observar las características de ambos fenotipos.

Existe suficiente evidencia que sugiere que la autofagia está activada en VSMC en contextos patológicos vasculares y es importante para la plasticidad y supervivencia de estas células (Salabei & Hill, 2013).



**Figura 3. Fenotipos de las células musculares lisas vasculares.**

A la izquierda, se observa el fenotipo diferenciado de las VSMC y el recuadro inferior muestra las proteínas características de este fenotipo. A la derecha, se muestra el fenotipo desdiferenciado de las VSMC y el recuadro inferior presenta las proteínas marcadoras de este fenotipo. En las flechas centrales se nombran algunos estímulos que pueden generar el cambio de un fenotipo a otro (Imagen obtenida de Saleh Al-Shehabi y col. (2016)).

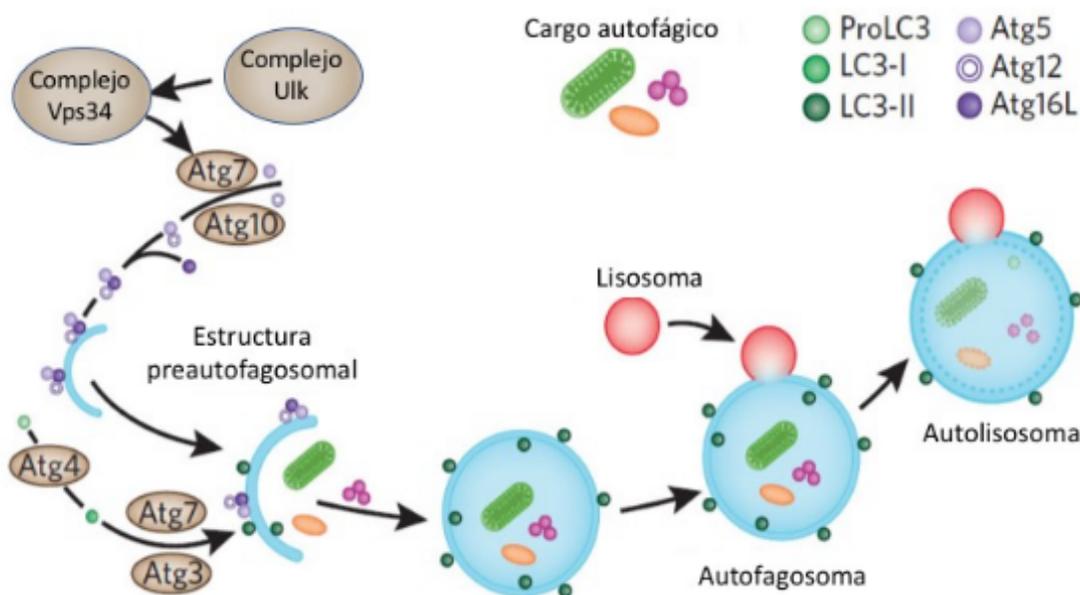
### 1.3. Autofagia

Un proceso celular que se ha relacionado con diversos fenómenos sistémicos, tales como el envejecimiento, la inmunidad innata y en la progresión del cáncer, es la autofagia (Levine & Klionsky, 2004; Klionsky, 2007). La autofagia es el proceso catabólico intracelular que media la degradación lisosomal de contenido citosólico, material extracelular, proteínas de la membrana plasmática y organelos (Klionsky, 2007). Es un proceso utilizado para la renovación celular, permitiendo el reciclaje del contenido citoplasmático y es uno de los principales sistemas de degradación en eucariontes

(Klionsky, 2007). Existen 3 tipos de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Ravikumar y col., 2010; Chen & Klionsky, 2011; Mizushima & Komatsu, 2011; Singh & Cuervo, 2011; Choi y col., 2013). Sin embargo, cuando se hable de autofagia, se hará referencia a la macroautofagia que es el proceso de interés de este trabajo.

La autofagia es altamente inducible y controlable. Se induce a través de inanición, estrés oxidativo o alguna infección, estímulos que activan vías de señalización y proteínas reguladoras que participan en las diferentes etapas de la formación de la membrana autofagosomal (He, C. & Klionsky, 2009). Los autofagosomas son las estructuras que se generan por la activación de este proceso. Por lo general, se forman cerca del retículo endoplásmico (RE) y la doble membrana puede derivar de este organelo, de mitocondrias, del aparato de Golgi o de la membrana plasmática (Rubinsztein y col., 2012). Para dar inicio al proceso, se requiere la activación de proteínas centrales relacionadas con la autofagia, denominadas ATG. En mamíferos, la autofagia se inicia activando al complejo proteico denominado quinasa similar a Unc51 (ULK). La privación de energía, por ejemplo, es un estímulo que inactiva a la proteína blanco de la rapamicina de mamífero (mTOR), conocido inhibidor autofágico, permitiendo la activación del complejo ULK (Ravikumar y col., 2010; Bernard & Klionsky, 2013) y la estimulación del complejo fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (PI3K) / BECLIN-1, el cual sirve para generar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) requerido para la etapa de nucleación. La elongación y maduración requieren de los sistemas de conjugación ATG5-ATG12 y de la proteína asociada a microtúbulos 1 cadena liviana 3 (LC3). Estas colaboran para la conjugación de LC3 a fosfatidiletanolamina (PE) y fijar LC3 a la membrana autofagosomal. El complejo ATG12-ATG15-ATG16L participa en el elongamiento de la membrana y ATG4 escinde pro-LC3 para generar LC3-I, el cual expone un sitio de conjugación de PE en el extremo carboxilo terminal. Las acciones secuenciales de ATG7 y ATG3 generan la forma lipídada LC3-II, proteína que está asociada a la maduración de la estructura fagosomal (Kabeya y col., 2000; He, H. y col., 2003). Finalmente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, generando el autolisosoma, donde el cargo es degradado por acción de hidrolasas ácidas lisosómicas y el contenido puede ser reciclado (Klionsky, 2007). Cabe destacar que LC3-

II es típicamente usado como un indicador de que el proceso autofágico está activo (Kabeya y col., 2000; He, H. y col., 2003). Mediante análisis de inmunofluorescencia (donde se observa como punto) y western blot (~16 KDa), es posible detectar este marcador (Salabei & Hill, 2013).



**Figura 4. Etapas del proceso autofágico.**

El complejo ULK es el encargado de iniciar la autofagia. Esto activa al complejo Vps34 y a las PI3K de clase III. Luego, la participación del complejo Atg5-Atg12-Atg16L y el procesamiento de LC3 hasta su lipidación (LC3-II) elongan la doble membrana hasta envolver todo el cargo. Un paso clave en este proceso es la fusión del lisosoma con el autofagosoma generando el autolisosoma, vesícula donde gracias a la acción de hidrolasas ácidas, la carga es degradada y reciclada. (Imagen obtenida de Fleming y col. (2011)).

#### 1.4. Autofagia en VSMC

Como se mencionó anteriormente, el cambio fenotípico de las VSMC está relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades vasculares, como la aterosclerosis. Un proceso que está implicado en este cambio, es la autofagia (Salabei & Hill, 2013). Un estudio de 1961 demostró que había actividad autofágica en las VSMC de lesiones ateroscleróticas (Geer y col., 1961). Gracias a la microscopía electrónica, existe enorme evidencia de que se produce la autofagia en VSMC en contextos ateroscleróticos y en hipertensión (Parker & Odland, 1966; Wolinsky y col., 1973; Kockx y col., 1998).

Posterior a una lesión, las VSMC sufren un proceso de dediferenciación, cambiando su fenotipo a uno que les otorga la capacidad de migrar y, de esta forma, contribuyen a la formación de la capa neointima en enfermedades como aterosclerosis y restenosis (Thomas y col., 1976; Clowes y col., 1983). Por otra parte, nuestro grupo probó en la línea celular de VSMC A7r5 que el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) disminuía los niveles de las proteínas contráctiles  $\alpha$ -SMA, SM22 y calponina e inducía la migración, características clásicas de un cambio fenotípico, con la coincidente inducción de la autofagia (Norambuena, 2015). Estos datos nos permiten sugerir que la autofagia estaría implicada en el cambio de fenotipo de las VSMC asociado a enfermedades cardiovasculares.

### **1.5. Péptido similar a glucagón 1: GLP-1**

La DM es una enfermedad crónica que consiste en una incapacidad del cuerpo para controlar los niveles de azúcar en la sangre (MedlinePlus, 2017). Afecta aproximadamente a 135 millones de personas en el mundo y representa una quinta parte de los gastos de atención en salud. Se genera por un daño que perjudica la producción o la respuesta a la insulina, la principal hormona encargada de controlar la glicemia (Modi, 2007). Los pacientes que padecen esta enfermedad tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y, a pesar de que puedan ser tratados óptimamente, sigue habiendo una incidencia sustancial de que sufran complicaciones vasculares, por lo que continúa la búsqueda de tratamientos más efectivos (Grieve y col., 2009). Dentro de esta indagación, encontramos al péptido similar a glucagón 1, GLP-1, una hormona que constituye la base de una terapia aprobada para controlar la hiperglicemia en la DM tipo 2 (Kendall y col., 2005). Debido a las acciones de estimulación de secreción de insulina, el rápido descenso de la glucosa en la sangre y la atenuación del aumento de la concentración de glucosa postprandial, vale decir, el aumento de la glucosa después de la ingesta de alimentos, es que se ha impulsado el uso de GLP-1 como tratamiento para la diabetes (Holz & Chepurny, 2003).

GLP-1 y el polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) son conocidas como incretinas (intestinal secretion insulin) y consisten en hormonas liberadas por el

intestino en respuesta a nutrientes que poseen la capacidad de estimular la secreción de insulina en concentraciones fisiológicamente relevantes (Creutzfeldt, W., 1979). Particularmente, GLP-1 posee un efecto potente en la liberación de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas (Hargrove y col., 1995), mientras que inhibe la liberación de glucagón en las células  $\alpha$  pancreáticas (Creutzfeldt, W. O. y col., 1996). Además de relacionarse con el control de los niveles de glucosa en la sangre, tiene variadas funciones en el organismo (Ranganath, 2008).

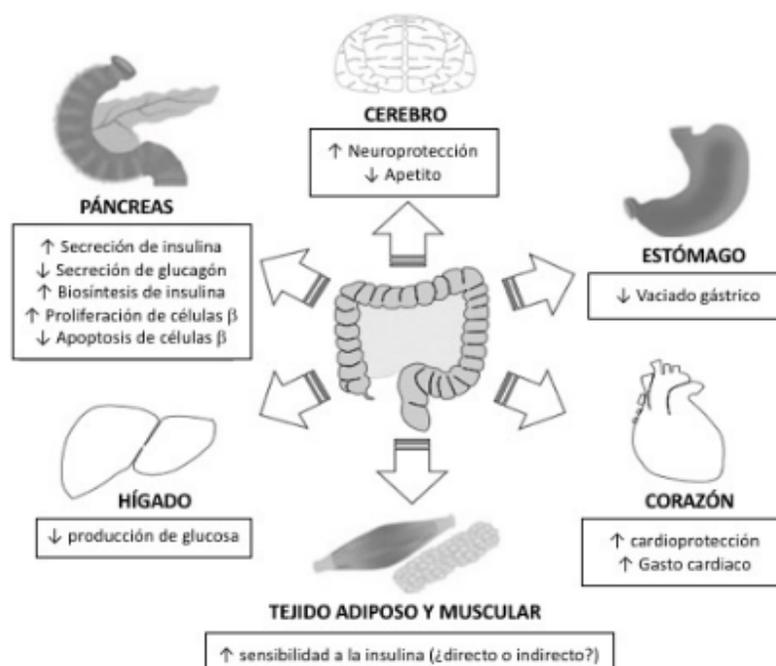
La amida de GLP-1 (7-36) es un polipéptido de 30 aminoácidos transcritos en el gen del proglucagón, localizado en el brazo largo del cromosoma 2 y se expresa en las células pancreáticas y células L intestinales (White & Saunders, 1986). Se procesa diferencialmente debido a la expresión de la enzima pro-hormona convertasa, la cual es tejido específica (Dhanvantari y col., 1996). GLP-1 se encuentra en 2 isotipos equipotentes: la forma menor, GLP-1 (7-37), que representa el 20 % del GLP-1 activo; y la forma principal, GLP-1 (7-36) que se encuentra en un 80% (Orskov y col., 1994). La producción de estas isoformas es el resultado del procesamiento postraduccional que sufre el producto génico del proglucagón, el cual se produce en las células L en el íleon distal y el colon: estas son las principales fuentes endógenas de GLP-1 (Kervran y col., 1987; Eissele y col., 1992). Las células L son células epiteliales endocrinas que parecen responder a las señales locales de nutrientes (Gribble, 2008) y están en contacto con células del tejido nervioso y vascular, por lo que la secreción de GLP-1 puede estar regulada por neurotransmisores y hormonas endocrinas (Grieve y col., 2009). Además, parece existir un umbral calórico para desencadenar la secreción de GLP-1 (Schirra y col., 1996), pues se ha visto que la ingestión enteral de carbohidratos, grasas o proteínas, en porciones equicalóricas, aumentan los niveles plasmáticos de GLP-1 (Elliott y col., 1993).

GLP-1 sufre una rápida eliminación de la circulación producto de una degradación enzimática producida por su inactivador endógeno primario: dipeptidil peptidasa 4 (DDP-4) (Deacon, 2004). DPP-4 elimina un dipéptido del amino terminal de GLP-1 (7-36) y lo transforma en GLP-1 (9-36), el cual es 1000 veces menos afín a su receptor y no presenta actividad insulínica (Knudsen & Pridal, 1996; Deacon y col., 2002; Green y col., 2004). Esta rápida eliminación ha sido evidenciada en el plasma, donde luego de

30 min el 78% de GLP-1 encontrado corresponde a GLP-1 (9-36). Esto influye en su tiempo de vida media, el cual es bastante corto y solo dura aproximadamente 2 min (Deacon y col., 1995).

### **1.6. Receptor de GLP-1 y su señalización.**

El receptor de GLP-1 (GLP-1R) consta de 463 aminoácidos y está acoplado a proteínas G (Thorens, 1992). El GLP-1R se expresa de forma ubicua y se ha detectado en diversos tejidos: islotes pancreáticos (Orskov & Poulsen, 1991), corazón (Wei & Mojsov, 1995), aorta (Green y col., 2008), pulmón (Kanase y col., 1988), glándulas gástricas (Uttenthal & Blazquez, 1990) y partes del sistema nervioso central y periférico (Shimizu y col., 1987; Kanase y col., 1988; Wei & Mojsov, 1995); donde genera variados efectos tal como se muestra en la figura 5. Se ubica en la membrana celular, posee un dominio amino terminal extracelular y 7 dominios transmembrana donde sus agonistas se unen de manera alostérica. Sin embargo, también se ha identificado un sitio de activación no alostérico (Knudsen y col., 2007; Lin & Wang, 2009). Una vez activo, la señalización de GLP-1R se diversifica, pues se ha visto que este receptor estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), lo que activa a otros factores, como por ejemplo la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y Epac (proteína de intercambio directamente activada por AMPc) (Holz, 2004).



**Figura 5. Efectos fisiológicos de la activación de GLP-1R.**

La administración de GLP-1 genera efectos biológicos en una variedad de órganos como el páncreas, cerebro, estómago, corazón, hígado, músculo y en el tejido adiposo (Imagen obtenida de Grieve y col. (2009)).

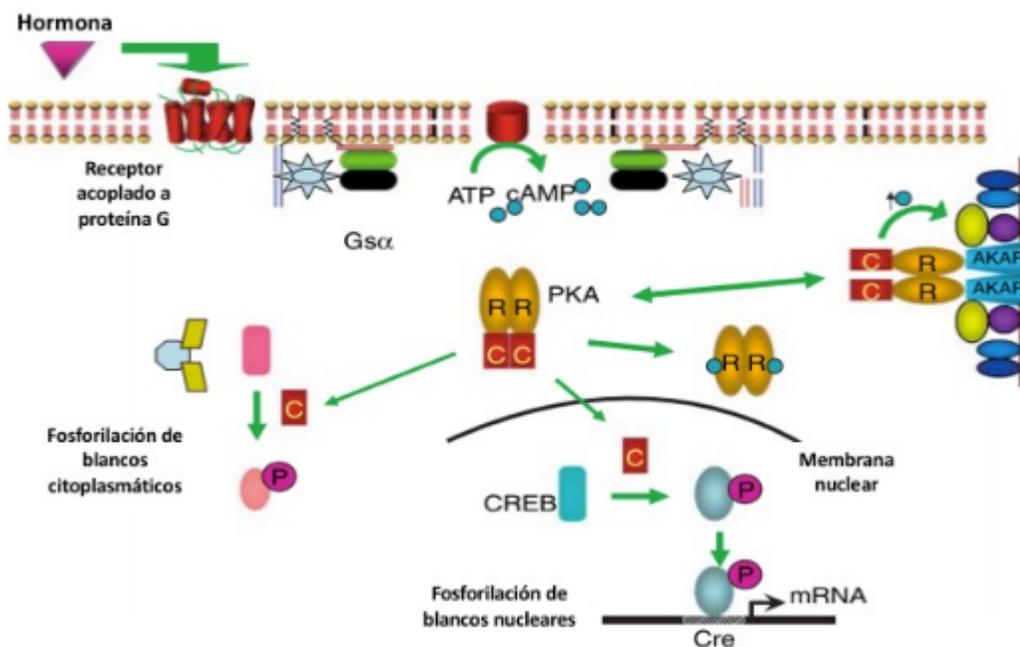
GLP-1R tiene una gran afinidad por su agonista principal, GLP-1. Basta con utilizar baja concentraciones de GLP-1, del orden de nanomolar, para que la unión entre este péptido y su receptor se concrete. Consecuente con esta afinidad, otros péptidos de la superfamilia del glucagón no se unen o se unen deficientemente (Grieve y col., 2009).

### 1.7. Proteína quinasa dependiente de AMPc: PKA.

La PKA es una serina-treonina quinasa que se caracterizó estimulando la membrana celular con epinefrina, compuesto que aumenta los niveles de AMPc (Sutherland & Rall, 1958; Walsh y col., 1968). Abreviadamente, en la señalización canónica de esta proteína (Figura 6), hormonas extracelulares se unen a receptores acoplados a proteínas G, las cuales están involucradas en la comunicación intercelular. Posteriormente, se genera un cambio conformacional en el receptor que desencadena la activación de alguna de estas proteínas G, las que subsecuentemente se disocian. Las proteínas  $G_{\alpha}$  están asociadas a las adenilil ciclasas (ACs), enzimas que catalizan la conversión de adenosín trifosfato

(ATP) a AMPc. Este AMPc producido se une a PKA, disociando la holoenzima inactiva e induciendo la fosforilación de sus blancos río abajo (Kirschner y col., 2009).

PKA es una holoenzima constituida por 4 subunidades: 2 de ellas catalíticamente activas (subunidades PKAC) y 2 que regulan la actividad de la enzima (subunidades PKAR). Cuando las 4 subunidades están unidas, la proteína quinasa se encuentra inactiva. Sin embargo, al aumentar los niveles de AMPc, este se une a las subunidades reguladoras, liberando las subunidades catalíticas (Kirschner y col., 2009). La modulación de PKA induce cambios en la actividad de los sustratos de esta proteína, pero también se generan cambios en la transcripción de genes, pues, por ejemplo, puede fosforilar a la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) (Montminy, 1997; Mayr & Montminy, 2001; Rosenberg y col., 2002).



**Figura 6. Vía de señalización canónica de PKA.**

En este modelo, la señalización es iniciada por una hormona que se une a un receptor transmembrana, activando Gα, que conduce a la producción de AMPc (círculos celestes) por la adenilil-ciclasa. AMPc se une al heterotetrámero PKA, separando los dímeros de las subunidades PKAR de las subunidades PKAC (cuadrados rojos). Las PKAC fosforilan objetivos tanto citoplasmáticos como nucleares (por ejemplo, CREB) (Imagen obtenida de Kirschner y col. (2009)).

### 1.8. PKA y regulación de la autofagia.

En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha demostrado que la autofagia es regulada por PKA (Budovskaya y col., 2004; Budovskaya y col., 2005). Un ejemplo, es la fosforilación directa que realiza sobre Atg13, un regulador de la actividad quinasa de Atg1, lo que controla su localización en la estructura preautofagosomal (PAS, estructura equivalente al fagoforo en mamíferos) (Seglen y col., 1990; Suzuki y col., 2001). Al realizar experimentos con fosfatasas, la señalización de Atg13 se perdía, pero al incubarse con PKA y ATP, esta señalización se restaura. En experimentos *in vivo*, al aumentar la actividad de PKA, aumentó la señalización de Atg13. Estos resultados dan cuenta de que Atg13 es un sustrato de PKA (Budovskaya y col., 2005; Stephan y col., 2009). Además, se ha visto que al inactivar PKA se produce una relocalización de Atg1 desde el citoplasma hacia el PAS y se induce la autofagia, lo cual es precedido por una pérdida en la fosforilación de Atg13, proteína que también se relocaliza en el PAS una vez que se inactiva PKA. Por lo tanto, PKA inhibe la asociación Atg1-PAS (Budovskaya y col., 2005) sugerentemente por la fosforilación de Atg13 (Stephan y col., 2009).

Por otra parte, se ha observado que las principales vías reguladoras que promueven la inducción de la autofagia convergen en la lipidación covalente de LC3. Al igual que ocurre con su homólogo Atg8, LC3 se escinde para liberar una glicina en el carboxilo terminal que es necesaria para la conjugación tras la inducción de la autofagia, lo cual es esencial para la formación del autofagosoma y el reconocimiento del cargo (Pankiv y col., 2007; He, C. & Klionsky, 2009). Cherra y col. (2010), demostraron que PKA fosforila directamente a LC3, tanto en líneas celulares (HeLa y SH-SY5Y) como en neuronas. Al inducir la autofagia con rapamicina, observaron un aumento de vacuolas autofágicas que se vio revertido al cotratarse las células con dibutilil-AMPc. Sin embargo, al inhibir PKA con (E)-N-(2-(3-(4-bromofenil)alilamino)etil)-isoquinolin-5-sulfonamida, abreviado H-89, se vio un aumento en los niveles de LC3-II. Por lo tanto, esto sugiere que PKA inhibe la inducción de la autofagia. En ensayos *in vitro* y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, demostraron que PKA fosforila directamente a LC3 en la serina 12 (Cherra y col., 2010).

Estos trabajos dejan de manifiesto la importancia de la PKA en el control de la autofagia, a través de diferentes proteínas autofágicas y en diferentes etapas de este proceso: la inhibición temprana de la autofagia dada por la modulación de Atg1 y Atg13 y una inhibición más tardía fosforilando a LC3.

### **1.9. Modelo de estudio y planteamiento de la hipótesis.**

En nuestro grupo, se ha estudiado el proceso de autofagia en la línea celular VSMC de aorta de rata A7r5, induciendo este mecanismo por PDGF-BB, TNF- $\alpha$  o privación de suero (Norambuena, 2015; García, 2016). Además, se ha demostrado la expresión de GLP-1R en estas células y los diferentes efectos que genera la unión de este receptor con su agonista GLP-1, tanto en la prevención de la autofagia inducida por diversos estímulos, como en el metabolismo mitocondrial (Morales y col., 2014; Norambuena, 2015). Estos efectos de GLP-1 estarían mediados a través de la vía de señalización GLP-1R/AMPC/PKA (Morales y col., 2014).

Por lo tanto, y pesar de los enormes esfuerzos en las últimas décadas, las enfermedades cardiovasculares siguen teniendo una importante prevalencia en el mundo y la búsqueda de nuevos tratamientos sigue siendo un principal objeto de estudio. Dentro de esta investigación, GLP-1 surge como un prometedor tratamiento para las enfermedades cardiovasculares. Como se mencionó anteriormente, la unión de GLP-1 al receptor GLP-1R y la consecuente producción de AMPc que conlleva a la activación de PKA, puede ser una vía de control de la autofagia, proceso que se ha visto involucrado en variadas ECV. Además, últimamente se ha establecido que GLP-1 puede regular la autofagia (Cai y col., 2017). En ese trabajo se demostró que GLP-1 mejora la retinopatía diabética en ratas a través de la inhibición de la autofagia vía GLP-1R-ERK1/2-HDAC6 (Cai y col., 2017). Finalmente, en este Seminario de Título se plantea que GLP-1 a través de la vía GLP-1R/PKA inhibiría la autofagia a través de la fosforilación de la proteína LC3.

## **2. HIPÓTESIS**

El péptido similar a glucagón-1 inhibe la macroautofagia a través de la fosforilación de LC3 por la proteína kinasa A en células musculares lisas vasculares.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si el péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) inhibe la macroautofagia a través de la fosforilación de LC3 por la proteína kinasa A (PKA) en células musculares lisas vasculares (VSMC).

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Determinar si el péptido similar a glucagón-1 inhibe la macroautofagia en células musculares lisas vasculares.
- 2.** Evaluar la participación de proteína kinasa A en la inhibición de la macroautofagia por GLP-1 en células musculares lisas vasculares.
- 3.** Determinar si GLP-1 induce la fosforilación de LC3 dependiente de proteína kinasa A en células musculares lisas vasculares.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Modelo de estudio y cultivo celular

Para la realización de este Seminario de título, se utilizó la línea celular A7r5 derivada de aorta torácica de rata (ATCC CRL-1444). Las células se crecieron en medio de cultivo Dulbecco Eagle modificado (DMEM) alto en glucosa (25 mM), suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  (1,2  $\mu\text{g/L}$ ), suero fetal bovino (10% [v/v] FBS) y piruvato (110 g/mL). Las células se mantuvieron en incubadores termorregulados a 37 °C en una atmósfera humedecida con 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  en aire. Las células se utilizaron como máximo hasta el pasaje 10 (cantidad de veces que fueron plaqueadas) y se descartaron si su morfología cambiaba.

Las células se plaquearon al alcanzar un 80% de confluencia utilizando tripsina (0,3% [p/v]) en una solución de amortiguador fosfato con etilendiaminotetracetato (EDTA) 0,025% libre de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ , traspasándolas a nuevas placas de cultivo con medio DMEM + 10% FBS.

### 5.2. Tratamiento de células

#### a) Inducción de la autofagia

Las células se sembraron en placas de 60 o 35 mm. Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se cambió el medio de cultivo por medio DMEM sin suero o por el medio RPMI 1640 (medio sin glucosa), previamente ambientados en un baño termorregulado a 37 °C, y se mantuvieron en el incubador por 4 h.

#### b) Detención del flujo autofágico

Con la finalidad de detener el flujo autofágico, se utilizó cloroquina (CQ, 30  $\mu\text{M}$ ), compuesto que inhibe la unión del autofagosoma con el lisosoma. Las células se expusieron a CQ por 4 h durante el estímulo.

#### c) Estimulación con GLP-1

Las células se preincubaron 30 min con GLP-1 (100 nM) antes de iniciar los estímulos por 4 h. Luego, GLP-1 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el experimento.

#### d) Inhibición de PKA

Las células se preincubaron durante 30 min con N-(2-[p-bromocinnamylamino]ethyl)-5-isoquinoline-sulfonamide (H-89), antes del inicio de los estímulos. En el caso de las células tratadas con GLP-1 y H-89, estas se preincubaron primero con H-89 durante 30 min y luego 30 min más con GLP-1.

### **5.3. Preparación de extractos celulares totales**

Las células sembradas en placas de 60 mm se estimularon una vez que alcanzaron un 80% de confluencia aproximadamente. Finalizado el estímulo, las células se lavaron con una solución de amortiguador fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; pH 7,4) fría y posteriormente se lisaron con 50 µL de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% [v/v]) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche, Alemania). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000 r.p.m durante 12 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se determinó la concentración de proteínas por el método Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente, el extracto se desnaturó a 95°C por 5 min en amortiguador dodecil sulfato de sodio (SDS)-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% [v/v]; 2 mercaptoetanol 20% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; azul de bromofenol 0,02% [p/v]), para ser almacenado a -20°C hasta su uso posterior.

### **5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas**

Las proteínas se separaron en base a su masa molecular mediante SDS-PAGE. En todos los casos, se cargaron 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3% [p/v] y el separador al 15% [p/v] de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en amortiguador PAGE (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% [p/v]) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 90 V hasta el final de la corrida

electroforética. Finalizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad, Hercules, CA, EEUU) de 0,45  $\mu\text{m}$  a amperaje constante de 400 mA por 90 min en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% [v/v]) en frío.

### 5.5. Western blot

Luego de la electrotransferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo (amortiguador Tris-borato salino 1x [TBS 1x: Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 2 mM]; Tween-20 0,1% [v/v]; leche descremada 5% [p/v]) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron toda la noche, con agitación suave, con el anticuerpo primario correspondiente en la siguiente dilución: anti p62 (ratón, dilución 1:2.000); anti gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, conejo, dilución 1:20.000); anti-LC3 (conejo, dilución 1:1.000); anti-p-LC3 (conejo, dilución 1:500), todos en solución de incubación (TBS 1x: Tween-20 0,1% [v/v]; leche descremada 5% [p/v]). Luego, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1% [v/v], y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo o anti-IgG de ratón, según corresponda, conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en solución de incubación. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces y para la detección se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se revelaron en el sistema de captura de imágenes Diversity 4 (Syngene). Las imágenes digitales se procesaron mediante el programa computacional UN-SCAN-IT gel. Para la obtención del blot de LC3 total (LC3 I y II), las membranas ya utilizadas en la obtención de LC3 fosforilado se incubaron por 1 h en un buffer de stripping para membranas (Restore<sup>TM</sup> Plus Western Blot Stripping Buffer, Prod #46430) para desprender los anticuerpos y, posteriormente, se incubaron y se trataron con el anticuerpo anti LC3, tal como se hizo en los casos anteriores.

## 5.6. Transducción adenoviral

Células A7r5 se sembraron en placas de 35 mm con 3 cubreobjetos a una densidad de  $4 \times 10^4$  células por placa. 48 h después, se transdujeron con el adenovirus proteína fluorescente verde (GFP)-LC3 a una multiplicidad de infección (MOI) de 180 partículas virales por célula. El virus fue fabricado en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo de Sistema de vectores adenovirales AdEasy1 (<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/240009.pdf>). Cabe mencionar la expresión del gen que codifica para GFP-LC3 es regulado por un promotor constitutivo aislado de citomegalovirus, por lo cual no es inducible. Luego de 24 h, las células se lavaron y se estimularon, como se explicó anteriormente. Como control de transducción se utilizó un adenovirus GFP a la misma MOI. Una vez terminados los estímulos, las células se lavaron con PBS 1X (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM; pH 7,4) y se incubaron durante 15 min en una solución de paraformaldehído al 4% [p/v] en PBS para fijar las células. En paralelo los núcleos se tiñeron con el reactivo Hoechst (dilución 1:1000). Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje. Los portaobjetos se analizaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 (CarlZeiss Microsystems, Oberkochen, Alemania), bajo las siguientes condiciones: zoom de 0,5; el lente de 40x; potencia del láser verde al 5% y potencia del láser azul al 4%; con una ganancia de 900 para el color verde y ganancia de 570 para el color azul. Cabe destacar que las imágenes de las Figuras 11 y 12 se adquirieron con un zoom de 1,0 y con el lente 63x. Se obtuvieron alrededor de 20 imágenes por cubreobjeto, las cuales se tomaron en el plano medio de cada célula. Todos los análisis digitales de las imágenes se realizaron en este corte confocal.

## 5.7. Análisis digital de imágenes

Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal se analizaron por el programa Image J (NIH, EEUU). Los autofagosomas tienen un tamaño aproximado de 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$  (Mizushima y col., 2002), por lo tanto, las imágenes se procesaron aplicando un *Background Subtraction* de 0,75  $\mu\text{m}$ , de esta manera no se consideraron los objetos mayores a 1,5  $\mu\text{m}$ . Utilizando una imagen de referencia, en este caso la condición RPMI

+ CQ, se fijó un umbral de fluorescencia, para eliminar del análisis toda fluorescencia menor al umbral fijado mediante la condición control. Utilizando la herramienta *Analyze Particles* del programa Image J, se pudo cuantificar el número de vacuolas autofágicas que había en cada imagen y, al dividirlo por el número de células, se obtuvo el número de vesículas por células.

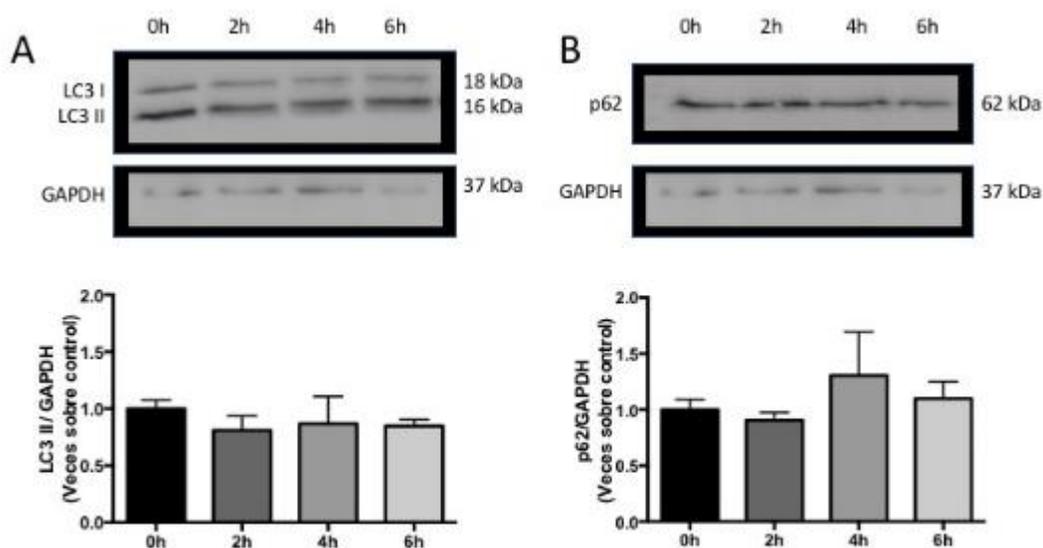
### **5.8. Análisis estadístico**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios  $\pm$  SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Dependiendo del experimento, los datos se analizaron por ANOVA de una o dos vías y la prueba post hoc de Holm Sidak para determinar la significancia estadística de los resultados. En todos los casos, se consideró como valor significativo un  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Inducción de la autofagia en VSMC.

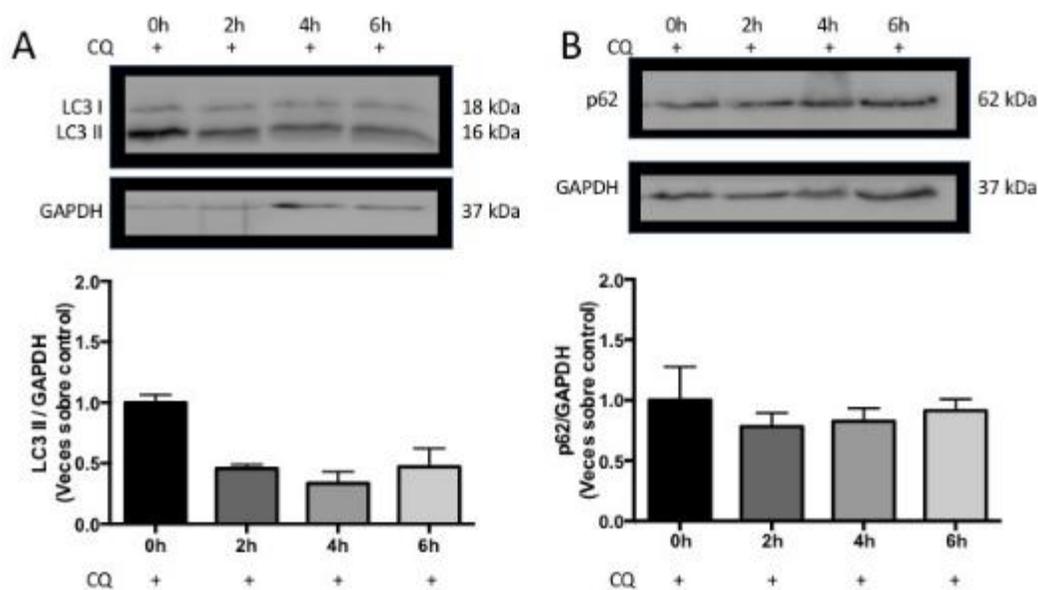
Para determinar las condiciones experimentales de trabajo, las células A7r5 se plaquearon y, cuando alcanzaron el 80% de confluencia, se les cambió el medio por DMEM + 2% FBS (Norambuena, 2015). Luego de 24 h, se inició la inducción de la autofagia por privación de glucosa utilizando el medio RPMI 1640. Las células se mantuvieron con este medio por 0, 2, 4 y 6 h. Si la autofagia se activara, se esperaría que los niveles de LC3 II aumentaran y se alcanzara un máximo de los niveles de esta proteína entre las 2 a las 6 h con respecto al control. Sin embargo, como se observa en la Figura 7, no hubo cambios significativos en los niveles de los marcadores autofágicos LC3 II y p62 a ninguno de los tiempos ensayados.



**Figura 7. Cinética de inducción de autofagia en células privadas de suero.**

Células A7r5 se cultivaron 24 h con medio DMEM + 2% FBS antes de la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I, LC3 II y p62. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A)** se muestran los niveles de LC3 II normalizados por GAPDH y en **B)** se muestran los niveles de p62 normalizados por GAPDH. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de un post test Holm Sidak.

Sin embargo, cuando las células además se expusieron a CQ (30  $\mu$ M), inhibidor del flujo autofágico, los niveles de LC3 II a las 0 h de inducción tuvieron una tendencia a ser mayor que en el resto de la cinética (Figura 8). El hecho de que los niveles de p62 no disminuyeran y que los niveles de LC3 II no aumentaran con el tiempo, sugiere que la disminución del contenido de FBS de 10% a 2% podría estar aumentando los niveles basales de autofagia en las células A7r5. Esta activación basal de la autofagia impediría observar los efectos de inducción de la autofagia por privación de glucosa en estas células.

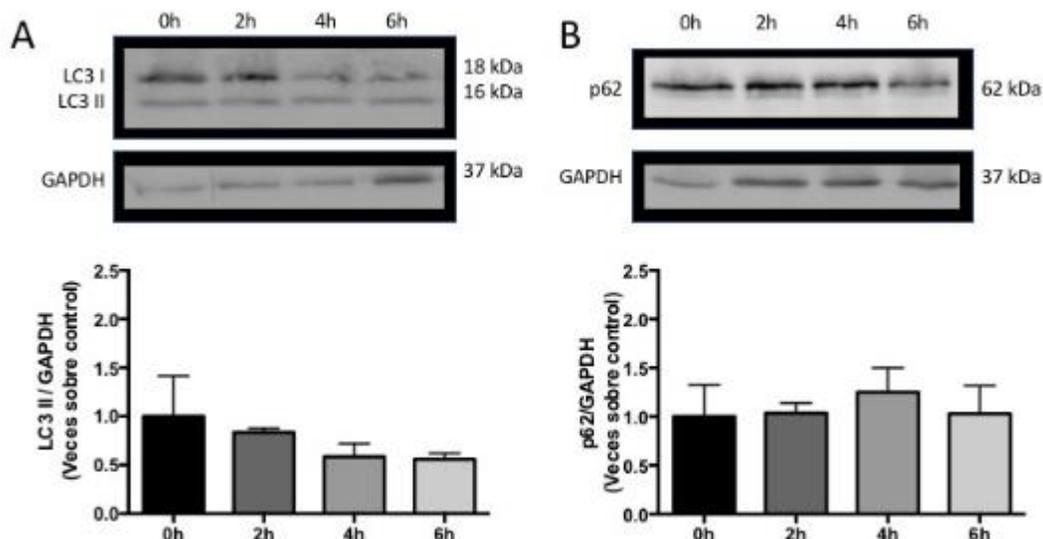


**Figura 8. Cinética de inducción de autofagia y detención del flujo autofágico en células privadas de suero.**

Células A7r5 se cultivaron 24 h con medio DMEM + 2% FBS antes de la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h. Para determinar el flujo autofágico, las células se expusieron a 30  $\mu$ M CQ por 4 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I, LC3 II y p62. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A)** se muestran los niveles de LC3 II normalizados por GAPDH y en **B)** se muestran los niveles de p62 normalizados por GAPDH. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de un post test Holm Sidak.

Para evitar la inducción de autofagia por privación de suero, se probó mantener las células en medio DMEM + 10% FBS hasta que estuvieran listas para ser estimuladas. De esta forma, se esperaba un aumento en los niveles de LC3 II en alguno de los tiempos de

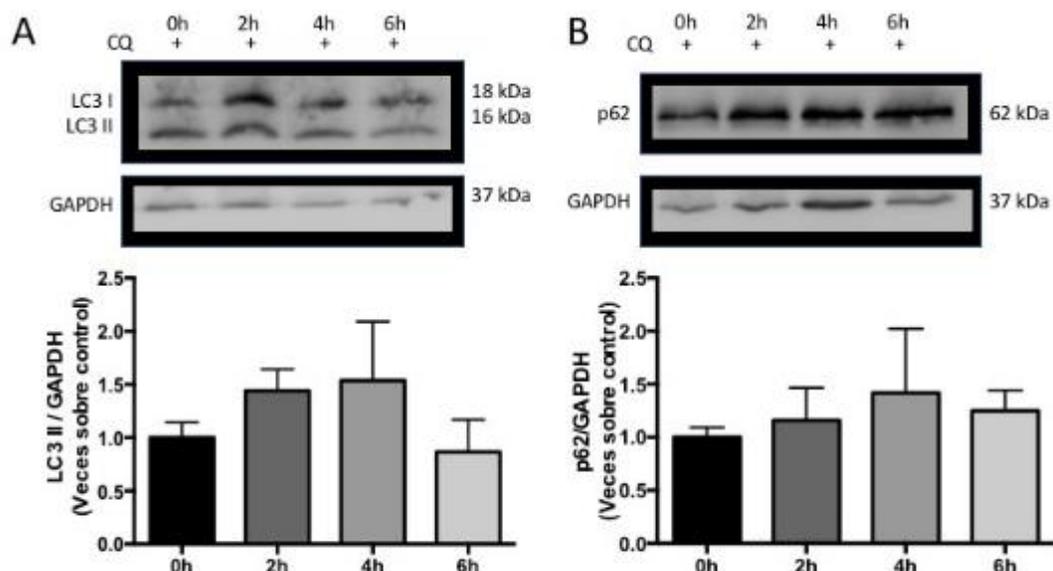
inducción. No obstante, en la Figura 9A se puede observar que los niveles de LC3 II tienden a disminuir a medida que aumentó el tiempo de privación de glucosa.



**Figura 9. Cinética inducción de autofagia en células no privadas de suero.**

Células A7r5 se mantuvieron en medio DMEM + 10% FBS hasta la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I, LC3 II y p62. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A)** se muestran los niveles de LC3 II normalizados por GAPDH y en **B)** se muestran los niveles de p62 normalizados por GAPDH. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de un post test Holm Sidak.

Cuando las células se tratan con CQ, se espera ver una acumulación de los niveles proteicos de LC3 II, debido a que CQ bloquea su degradación. Tal como se muestra en la Figura 10A, los niveles de LC3 II presentan un leve aumento a las 2 y 4 h de inducción. En el caso de los niveles de p62, estos aumentan de manera no significativa a las 4 h en el caso de la cinética sin CQ (Figura 9B) y el aumento es mayor cuando las células se expusieron a CQ (Figura 10B).

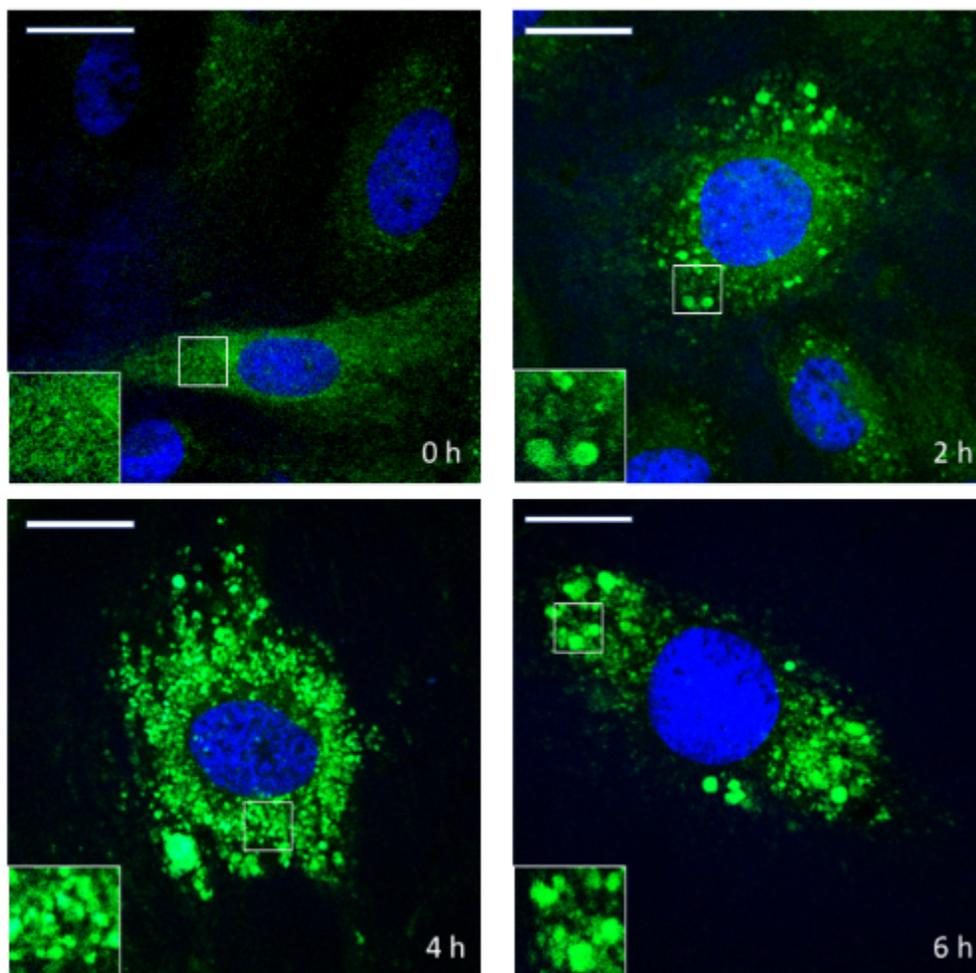


**Figura 10. Cinética de inducción de autofagia y detención del flujo autofágico en células no privadas de suero.**

Células A7r5 se mantuvieron en medio DMEM + 10% FBS hasta la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h, en presencia de 30  $\mu$ M de CQ. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I, LC3 II y p62. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A)** se muestran los niveles de LC3 II normalizados por GAPDH y en **B)** se muestran los niveles de p62 normalizados por GAPDH. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de un post test Holm Sidak.  $p < 0,05$ .

Con los niveles proteicos de los marcadores autofágicos LC3 II y p62, se estimó que el tiempo óptimo para evaluar la autofagia en las células A7r5 estaría entre las 2 o 4 h. Sin embargo, como estos datos no resultaron del todo concluyentes, se procedió a evaluar la formación de vesículas autofágicas a través de la transducción de células A7r5 con un adenovirus GFP-LC3, lo cual permite la observación de autofagosomas por medio de microscopía de fluorescencia. Si la autofagia se encuentra activa, se espera ver un aumento de puntos verdes que representan vesículas autofágicas formadas, mientras que en la condición control solo se esperaría ver un fondo verde sin el patrón punteado.

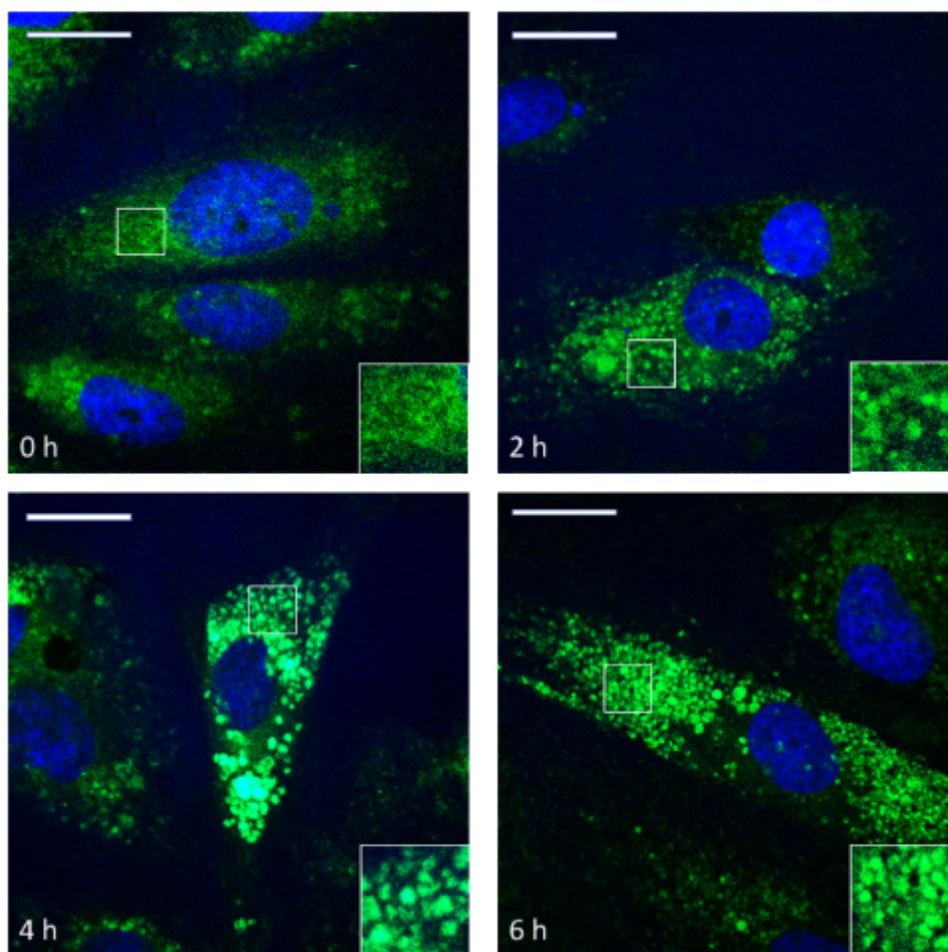
En la Figura 11, se observan imágenes representativas de la cinética realizada de 0 a 6 h de privación de glucosa. Se aprecia que a las 4 h de privación hay un aumento de autofagosomas (puntos verdes) en comparación con la condición control (0 h) y el resto de los tiempos estudiados (2 y 6 h).



**Figura 11. Cinética de inducción de autofagia y evaluación de formación de vesículas.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180. Luego de 24 h, se inició la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h. Posteriormente, se tomaron imágenes usando microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas para cada condición. En el inserto se muestra una amplificación de la zona demarcada para mostrar el detalle de los autofagosomas. Los núcleos se tiñeron con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ . Los resultados corresponden a la realización de un experimento ( $n = 1$ ),  $\sim 20$  células analizadas por condición. Estos resultados se analizaron solo de manera cualitativa.

Al detener el flujo autofágico con CQ, se observa la acumulación de vesículas autofágicas en las condiciones de 4 y 6 h (Figura 12) en comparación al control. Además, al comparar estas imágenes con las de la Figura 11, se aprecia que en ambas condiciones se detecta mayor acumulación de vesículas autofágicas a las 4 h.



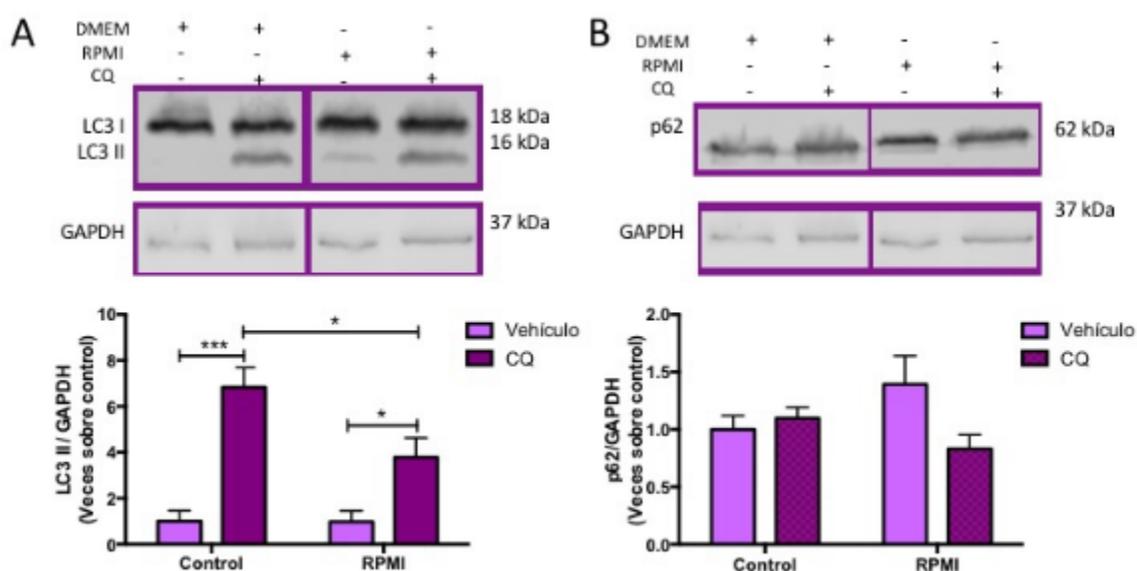
**Figura 12. Cinética de detención del flujo autofágico y evaluación de formación de vesículas.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180. Luego de 24 h, se inició la inducción de la autofagia con medio RPMI 1640 por 0, 2, 4 y 6 h en presencia de CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, se tomaron imágenes usando microscopía confocal. En el inserto se muestra una amplificación de la zona demarcada para mostrar el detalle de los autofagosomas. Se muestran imágenes representativas para cada condición. Los núcleos se tiñeron con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Los resultados corresponden a la realización de un experimento (n = 1), ~20 células analizadas por condición. Estos resultados se analizaron solo de manera cualitativa.

Por lo tanto, como se observa un aumento en los niveles de LC3 II a las 4 h de inducción de la autofagia (Figura 10) y una gran acumulación de vesículas autofágicas al mismo tiempo de estímulo, se escogió el tiempo de 4 h para realizar los experimentos posteriores.

## 6.2. GLP-1 inhibe la autofagia basal y la autofagia inducida en VSMC.

Lo primero que se realizó fue un control para evaluar la activación de la autofagia y la acumulación de los niveles proteicos de LC3 II. Si la autofagia está activa, al inhibir el flujo autofágico con CQ, los niveles de LC3 II deberían aumentar. Tal como se esperaba, los niveles de LC3 II aumentan significativamente tanto en condiciones basales (DMEM + 10% FBS) como en condiciones de privación de glucosa (RPMI 1640) (Figura 13). Sin embargo, en ambas condiciones no se observaron cambios en los niveles de p62 (Figura 13B). Debido a esta razón, de ahora en adelante sólo se mostrarán los resultados obtenidos con el marcador de autofagia LC3 II.



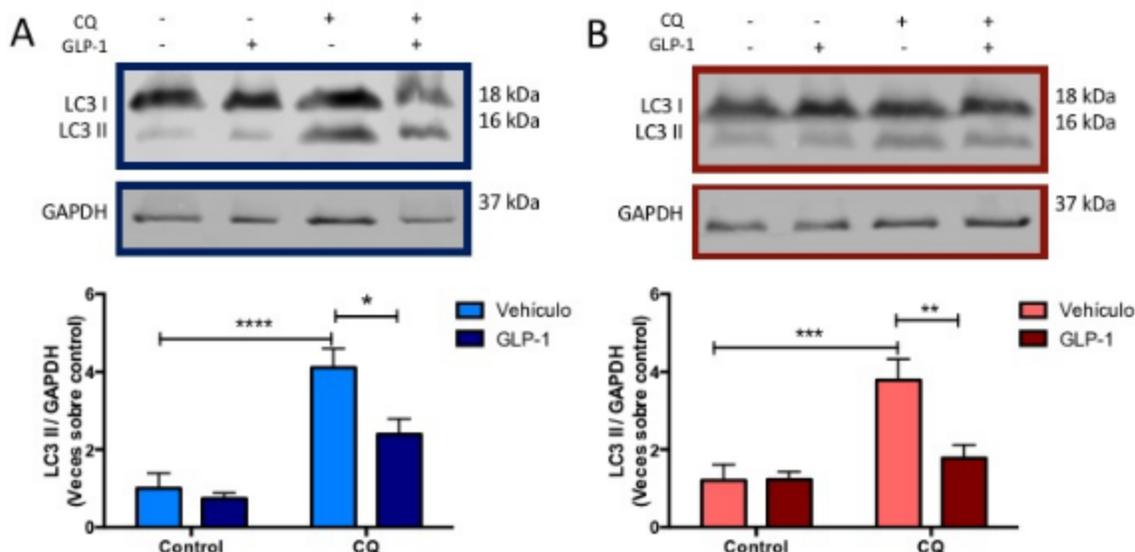
**Figura 13. Autofagia basal versus autofagia inducida.**

Células A7r5 se mantuvieron en medio DMEM + 10% FBS o RPMI 1640 por 4 h y con presencia o ausencia de CQ (30  $\mu$ M). Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I, LC3 II, p62. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A**) se muestran los niveles de LC3 II normalizados por GAPDH y en **B**) se muestran los niveles de p62 normalizados por GAPDH. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Debido a los resultados anteriores, se experimentó bajo dos condiciones: autofagia basal y autofagia inducida. Para esto, placas con células A7r5 se estimularon durante 4 h con medio DMEM 10% FBS, para autofagia basal, o RPMI 1640, para autofagia inducida por privación de glucosa. Todos los experimentos se realizaron bajo las siguientes

condiciones experimentales: control, GLP-1 (100 nM), CQ (30  $\mu$ M) y CQ + GLP-1. Si GLP-1 inhibe la autofagia, la acumulación de LC3 II debiese disminuir con respecto al control.

El aumento de los niveles proteicos de LC3 II, producto del inhibidor CQ, se ve reducido un 30% aproximadamente cuando las células A7r5 son expuestas, además, a GLP-1. Estos efectos son observados tanto la autofagia basal (Figura 14A) como en la autofagia inducida (Figura 14B). Estos primeros resultados dan cuenta de que GLP-1 tiene un efecto inhibitorio sobre el proceso autofágico.



**Figura 14. GLP-1 inhibe la acumulación de LC3 II.**

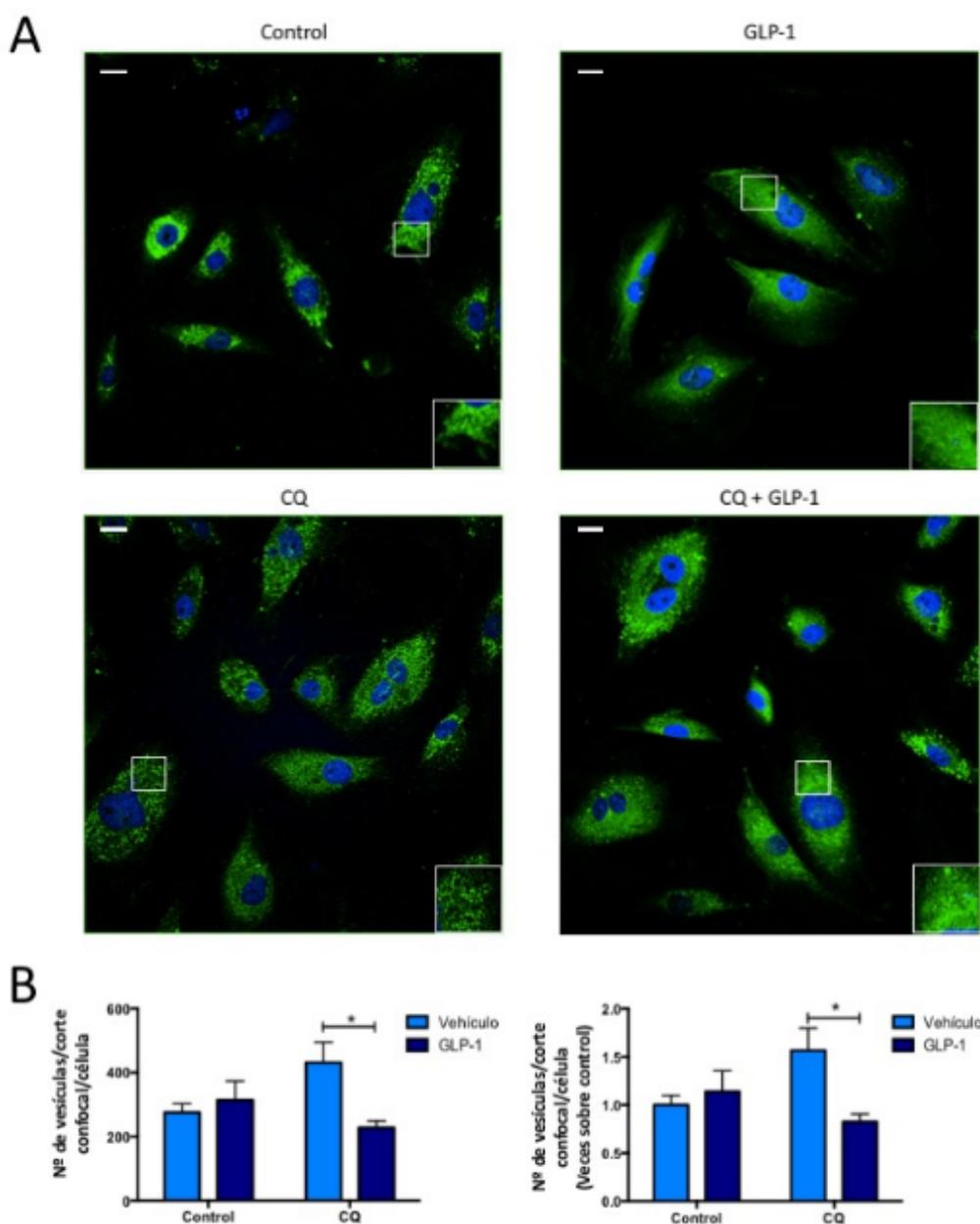
Células A7r5 se cultivaron en medio DMEM + 10% FBS o RPMI 1640 por 4 h y se pretrataron con GLP-1 (100 nM) por 30 min y luego con CQ (30  $\mu$ M) o CQ + GLP-1 durante todo el experimento. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I y LC3 II. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. **A)** Autofagia basal. n = 8. **B)** Autofagia inducida por privación de nutrientes. n = 6. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

En la Figura 15 se muestran células A7r5 que se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3, con la finalidad de visualizar la formación de vesículas autofágicas. Éstas se observan como puntos debido a la acumulación de GFP-LC3 en las membranas de los autofagosomas. Es importante señalar que las imágenes mostradas corresponden a las

originales. Sin embargo, para poder contabilizar la cantidad de autofagosomas las imágenes tuvieron que ser procesadas, tal como se explicó en la sección Materiales y Métodos. Si GLP-1 inhibe la autofagia, la cantidad de autofagosomas debería disminuir cuando las células son tratadas con este péptido.

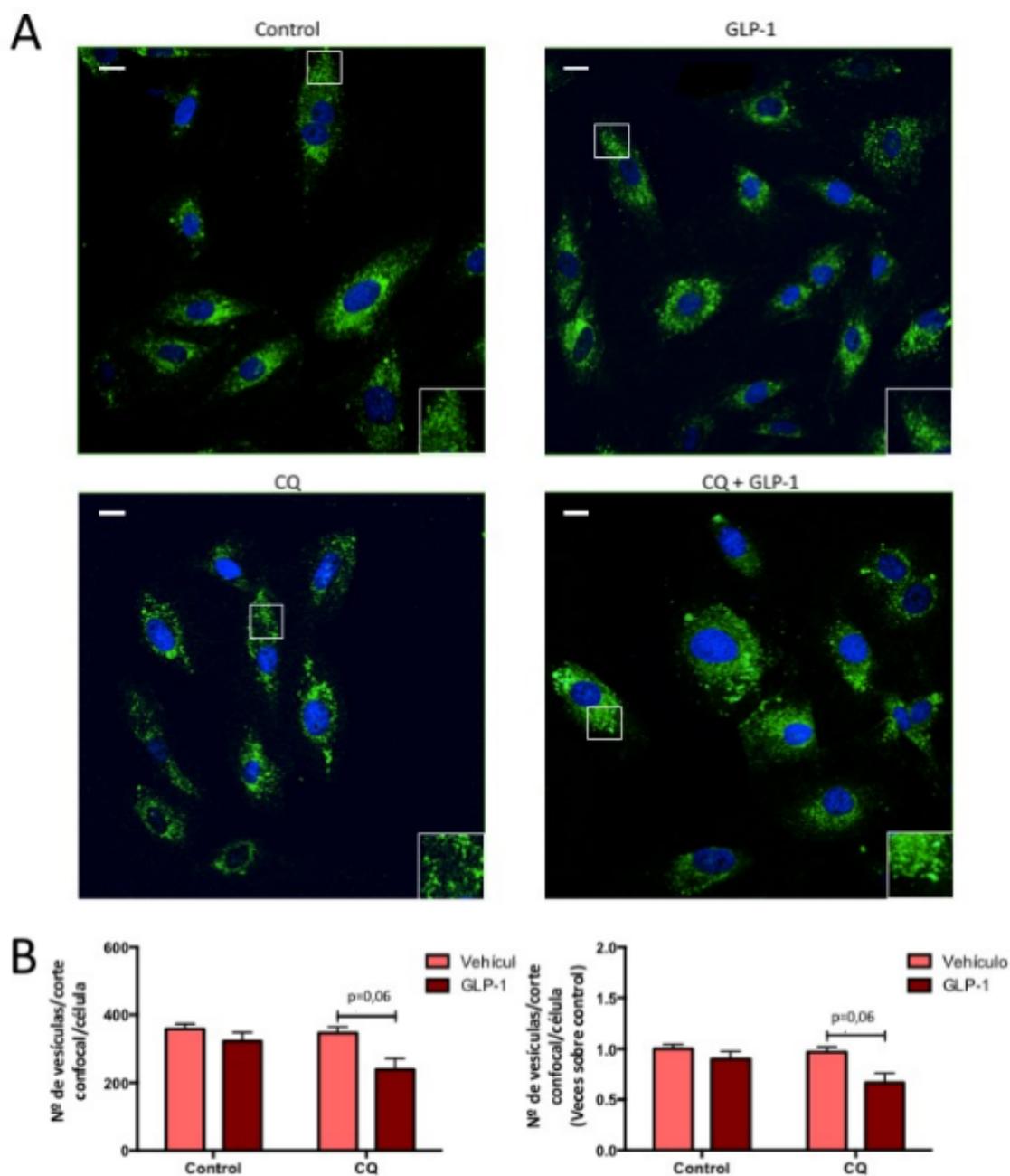
Cuando las células se estimularon con GLP-1, éstas no presentaron cambios significativos con respecto al control. No obstante, al tratarlas con CQ, GLP-1 disminuyó el número de vesículas formadas por célula (Figura 15). Este dato es consistente con la disminución de los niveles proteicos de LC3 II que se observó en la Figura 14A. Esto confirma que GLP-1 tiene un efecto inhibitorio sobre la formación de autofagosomas en condiciones basales en VSMC.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos al inducir la autofagia en células A7r5 con el medio RPMI 1640. Tal como en el caso anterior, GLP-1 no indujo cambios significativos en el número de vesículas autofágicas en comparación con el control (Figura 16). Al tratar las células con CQ, tampoco se observó un cambio significativo en la formación de vesículas autofágicas comparándolo con la condición control. Sin embargo, se aprecia una tendencia a la disminución del número de vesículas autofágicas en la condición donde las células se cotrataron con CQ y GLP-1, pero esta diferencia no es significativa.



**Figura 15. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas en la autofagia basal.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180. Luego de 24 h, se pretrataron con GLP-1 (100 nM) 30 min antes de iniciar los estímulos por 4 h con CQ (30  $\mu$ M). Posteriormente, se tomaron imágenes a través de microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. **A)** Imágenes representativas. **B)** Cuantificación del número de vesículas por célula.  $n = 6$ ,  $\sim 150$  células analizadas por condición. En el gráfico izquierdo se muestra el número de vesículas por célula y en el gráfico derecho los resultados están expresados como veces de cambio respecto al control. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.  $*p < 0,05$ .



**Figura 16. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas en la autofagia inducida.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180. Luego de 24 h, se pretrataron con GLP-1 (100 nM) 30 min antes de iniciar los estímulos por 4 h con RPMI 1640 y CQ (30  $\mu$ M). Posteriormente, se tomaron imágenes a través de microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. **A)** Imágenes representativas. **B)** Cuantificación del número de vesículas por célula.  $n = 3$ , ~150 células analizadas por condición. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

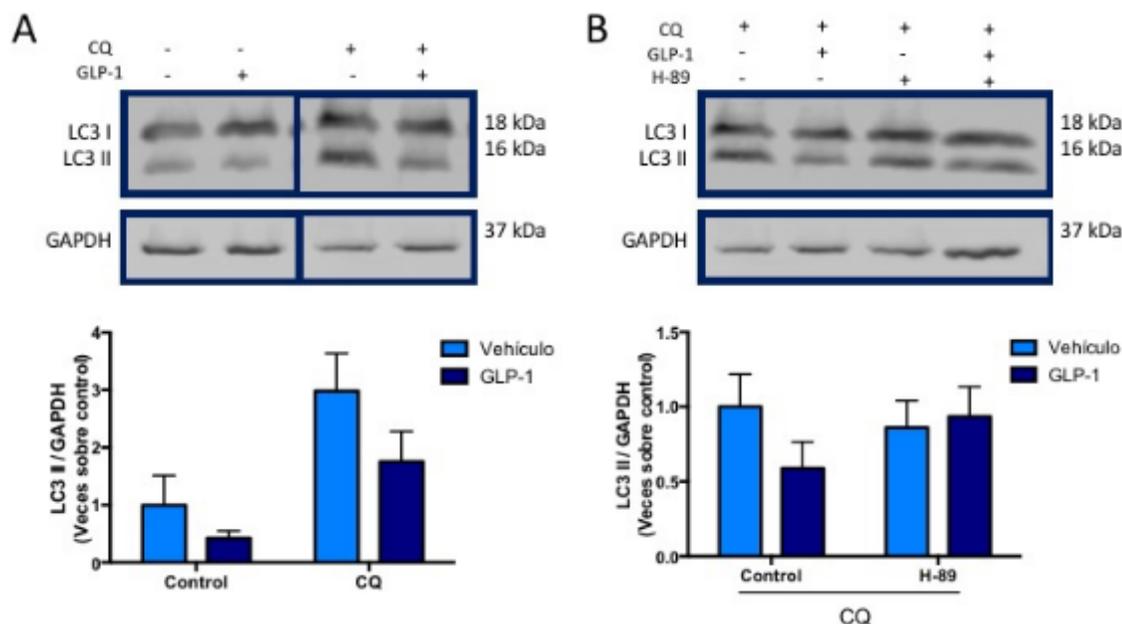
Por lo tanto, con los resultados obtenidos midiendo los niveles de LC3 II (Figura 14A) y con la cuantificación de autofagosomas formados por célula (Figura 15B), se sugiere que GLP-1 tiene un efecto inhibitorio sobre la autofagia basal de las VSMC. Los niveles proteicos de LC3 II sugieren que GLP-1 además puede inhibir la autofagia inducida por privación de glucosa en VSMC. No obstante, este efecto no es claro ya que no se pudo reproducir determinando el número de vesículas autofágicas por célula (Figura 16B).

### **6.3. GLP-1 previene la autofagia vía PKA en VSMC**

Como se mencionó anteriormente, GLP-1 activa a PKA mediante la vía GLP-1R/cAMP/PKA. Además, se ha demostrado que PKA inhibe la autofagia fosforilando proteínas claves para este proceso (Seglen y col., 1990; Suzuki y col., 2001; Budovskaya y col., 2004; Budovskaya y col., 2005; Stephan y col., 2009; Cherra y col., 2010). Por estas razones es que proponemos que GLP-1 podría estar inhibiendo la autofagia en VSMC a través de la activación de PKA. Para demostrar lo anterior, se pretrataron células A7r5 por 30 min con H-89, el inhibidor farmacológico de PKA, antes de ser estimuladas con GLP-1.

Si la inhibición de la autofagia por GLP-1 ocurre vía PKA, la disminución en los niveles de LC3 II debiese revertirse cuando se inhibe esta quinasa con H-89. En estas condiciones, los niveles del marcador autofágico debiesen ser similares a los niveles en la condición control.

En la Figura 17A se muestra el control realizado para validar que el proceso autofágico estaba activo. Como se observa, los niveles de LC3 II aumentaron con respecto al control y disminuyeron cuando las células se trataron con GLP-1. Aunque los resultados no son significativos, el efecto biológico mostrado en el blot es claro. Dado que el control funcionó, es posible evaluar qué efectos genera la inhibición de PKA mediante H-89. Como se aprecia en la Figura 17B, los niveles de LC3 II en las células A7r5 se mantuvieron constantes al inhibir la quinasa, incluso cuando han sido tratadas con GLP-1. Este resultado sugiere que los efectos de GLP-1 sobre la autofagia basal pueden estar mediados por PKA.

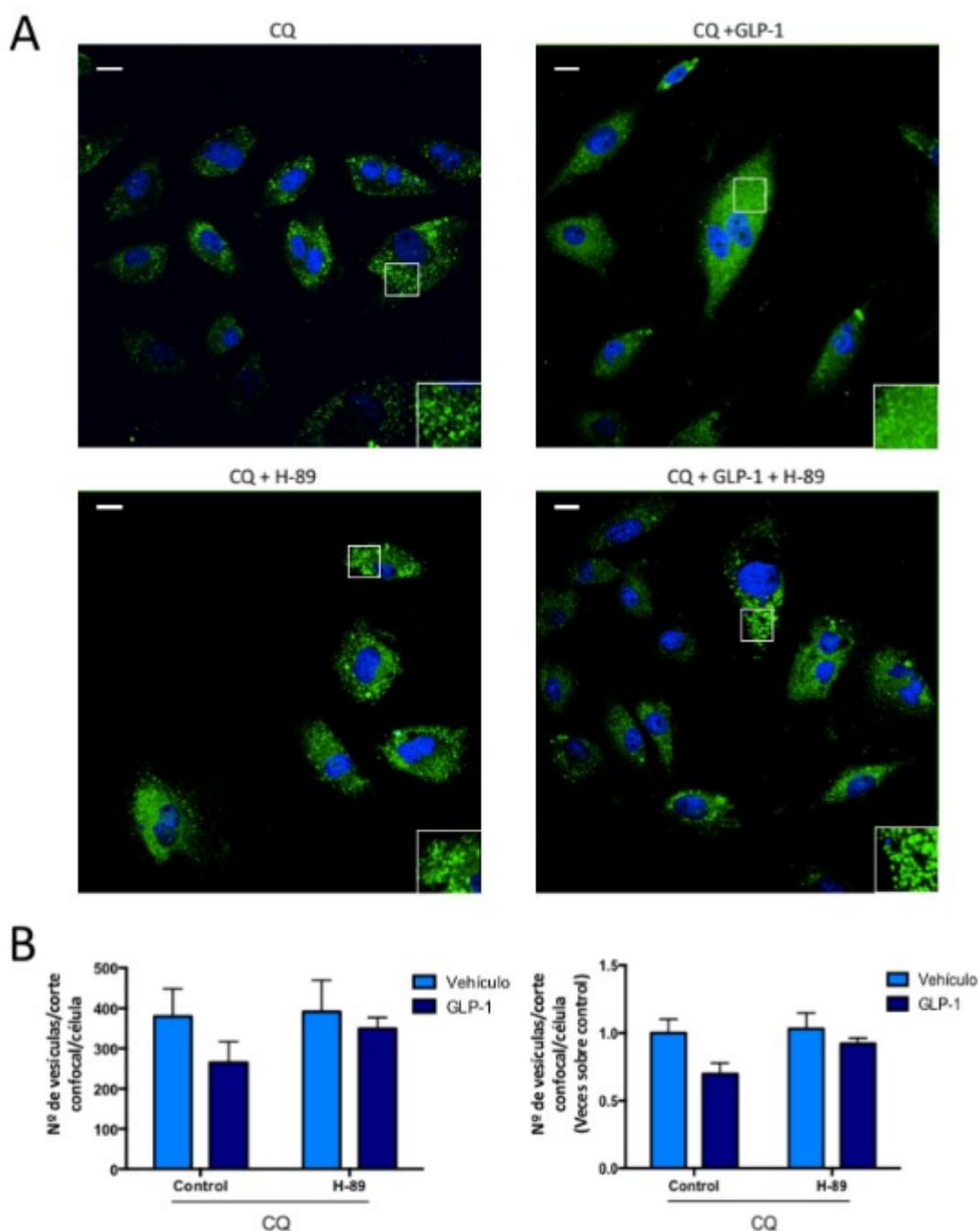


**Figura 17. GLP-1 inhibe el flujo autofágico vía PKA en la autofagia basal.**

Células A7r5 se mantuvieron en medio DMEM + 10% FBS y pretrataron con H-89 (100 nM) por 30 min, con GLP-1 (100 nM) por 30 min y finalmente se estimularon con CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I y LC3 II. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. **A)** Control activación del flujo autofágico. **B)** Inhibición de PKA por H-89. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

En la Figura 18 se observan la cantidad de vesículas autofágicas bajo las mismas condiciones de estímulo. Cuando las células se trataron con GLP-1, la cantidad de autofagosomas muestra una tendencia a disminuir, con respecto al control CQ. Sin embargo, al utilizar el inhibidor de PKA, esta disminución no ocurrió. Esto sugiere que la inhibición de la formación de autofagosomas por parte de GLP-1 puede estar ocurriendo a través de un mecanismo dependiente de PKA.

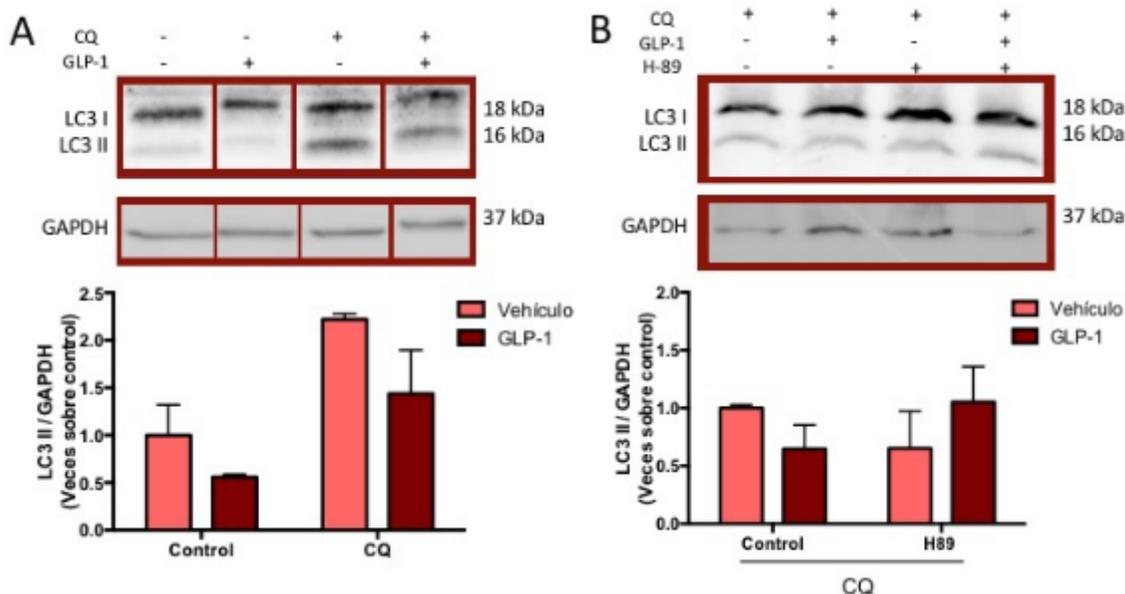
Por lo tanto, debido a que la disminución en los niveles proteicos de LC3 II generados por el tratamiento con GLP-1 en VSMC se recupera cuando estas células están expuestas a H-89 (Figura 17), así como también el número de vesículas autofágicas tiende a disminuir al tratar con GLP-1 (estadísticamente no significativo), pero se recupera esta cantidad cuando se tratan las células con H-89 (Figura 18), se propone que GLP-1 inhibe la autofagia basal en VSMC a través de un mecanismo dependiente de PKA.



**Figura 18. GLP-1 inhibe formación de autofagosomas vía PKA en la autofagia basal.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180 partículas virales por célula. Luego de 24 h, se pretrataron con H-89 (100 nM) por 30 min, con GLP-1 (100 nM) y finalmente con CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, se tomaron imágenes a través de microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. **A)** Imágenes representativas. **B)** Cuantificación del número de vesículas por célula.  $n = 3$ , ~150 células analizadas por condición. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

De manera análoga al experimento sobre la autofagia basal, se evaluó el flujo autofágico en la autofagia inducida por privación de glucosa. Si bien los resultados no son considerablemente diferentes, se observa la tendencia de GLP-1 a disminuir los niveles de LC3 II. Por lo tanto, se procedió a evaluar el rol de PKA en el proceso autofágico, inhibiendo esta proteína con H-89. Los niveles de LC3 II no disminuyen cuando las células son tratadas con H-89 y GLP-1, es decir, GLP-1 no realizó el efecto observado anteriormente cuando PKA estaba inhibida (Figura 19B). Sin embargo, estos resultados son poco concluyentes y requieren de mayor investigación para determinar si GLP-1 actúa vía GLP-1R/PKA en condiciones de privación de glucosa.



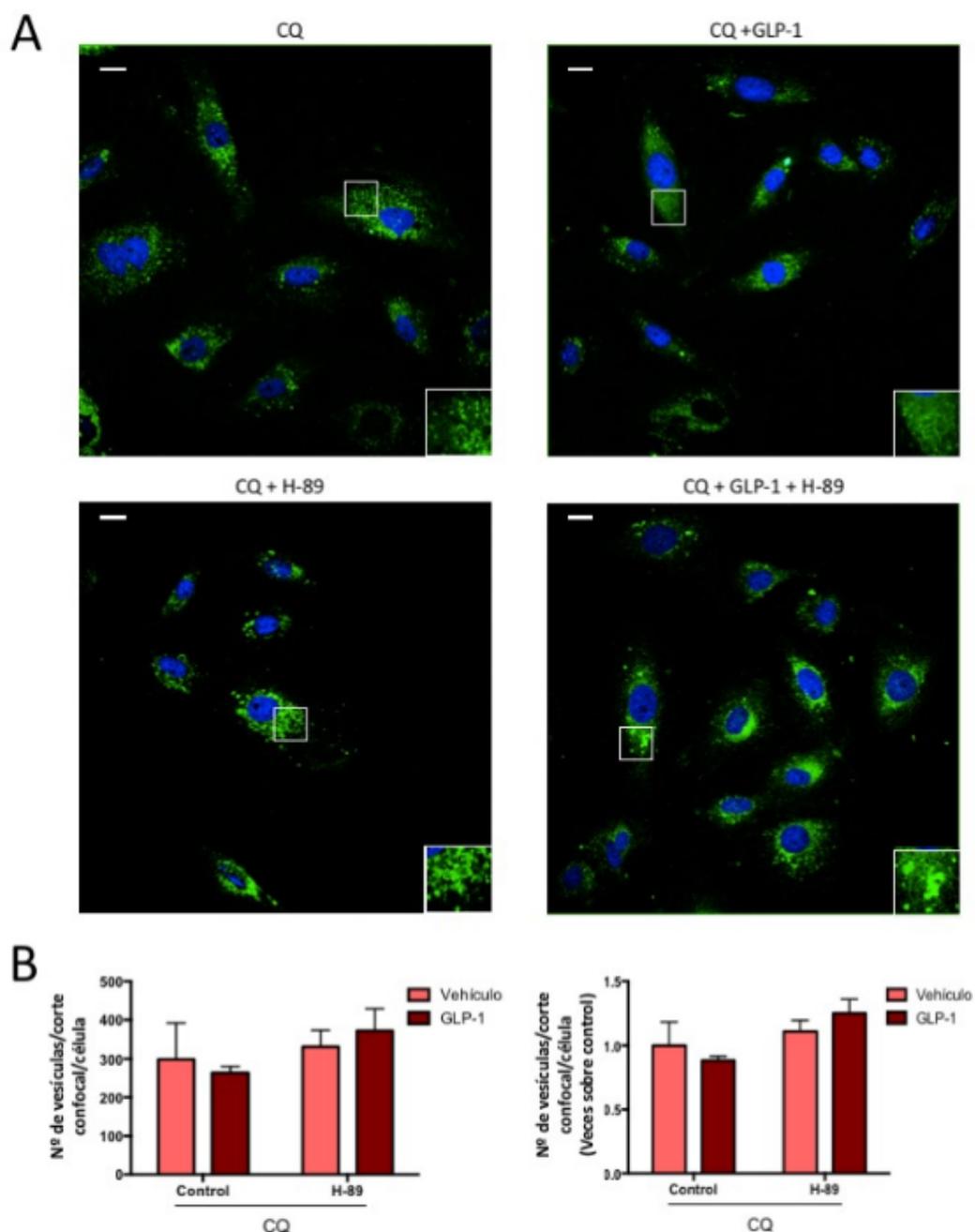
**Figura 19. GLP-1 inhibe el flujo autofágico vía PKA en la autofagia por privación de glucosa.**

Células A7r5 se pretrataron con H-89 (100 nM) por 30 min, con GLP-1 (100 nM) por 30 min y finalmente se estimularon con RPMI 1640 y CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I y LC3 II. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. **A)** Control activación del flujo autofágico. **B)** Inhibición de PKA por H-89. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

De manera similar a lo observado en la Figura 16, no se observaron diferencias significativas en el número de vesículas autofágicas por célula entre la condición control

CQ y CQ + GLP-1. Sin embargo, se apreció un leve aumento de estas vesículas en las condiciones con H-89. Esto puede ocurrir debido a que, como se señaló anteriormente, se ha reportado que PKA inhibe la autofagia a través del bloqueo del complejo ULK1/Atg13, por lo que es de esperar que si se inhibe dicha quinasa la autofagia se vea favorecida.

Por lo tanto, según lo observado en la Figura 19, GLP-1 puede tener efectos en el flujo autofágico provocado por la privación de glucosa en células VSMC. No obstante, estos efectos no son claros al momento de evaluar la formación de autofagosomas (Figura 20).



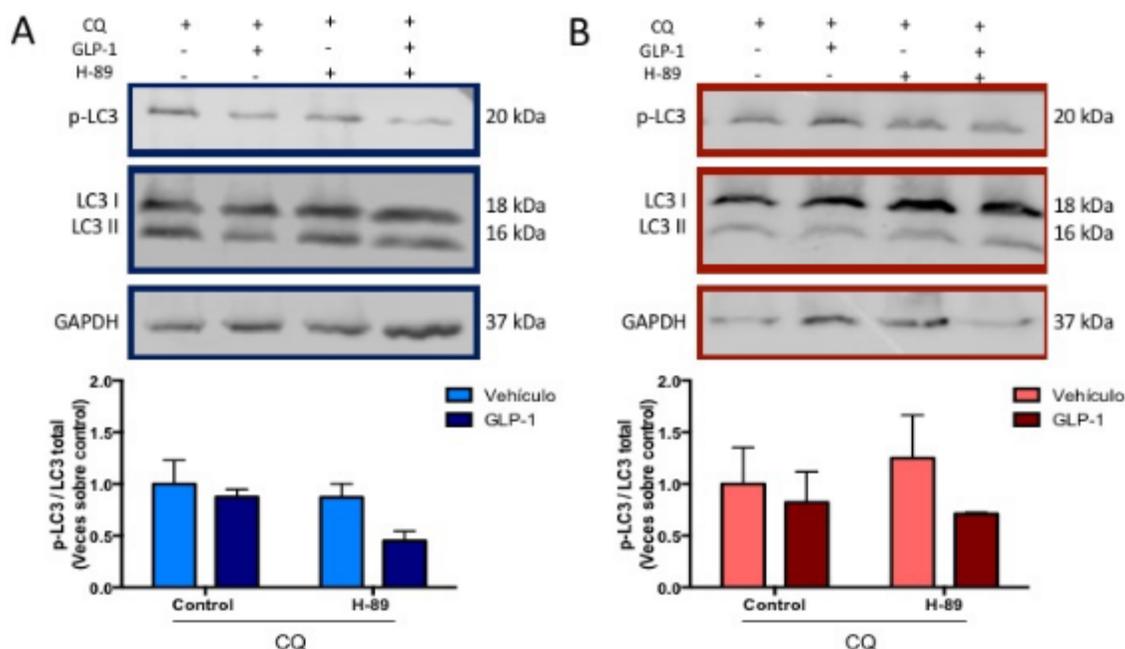
**Figura 20. GLP-1 no disminuye la formación de autofagosomas en condiciones de privación de glucosa.**

Células A7r5 se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una MOI de 180. Luego de 24 h, se pretrataron con H-89 (100 nM) por 30 min, con GLP-1 (100 nM) y finalmente con RPMI 1640 y CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, se tomaron imágenes a través de microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoescht. La observación de puntos de GFP-LC3 indica la presencia de células autofágicas positivas. Barra de escala, 10  $\mu$ m. **A)** Imágenes representativas. **B)** Cuantificación del número de vesículas por célula.  $n = 3$ , ~150 células analizadas por condición. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

#### **6.4. La inhibición de la autofagia por GLP-1 vía GLP-1R/cAMP/PKA no ocurre por fosforilación de LC3**

El último objetivo de este proyecto es evaluar si GLP-1 induce la fosforilación, y consecuente inhibición, de la proteína LC3 por la PKA. Para esto, se evaluaron los niveles proteicos de LC3 fosforilado (p-LC3) bajo las mismas condiciones experimentales del objetivo anterior.

Según la literatura, PKA fosforila a LC3 en serina 12 (Cherra y col., 2010). Esta fosforilación es inhibitoria, impidiendo que esta proteína sufra las modificaciones post-traduccionales que permiten el paso de LC3 a LC3 I y su lipidación a LC3 II (Cherra y col., 2010). Esta última proteína es la que se recluta para la enlongación de la doble membrana del autofagosoma, por lo que este proceso tampoco podría ocurrir (Cherra y col., 2010). Por lo tanto, si GLP-1 induce esta fosforilación, los niveles de p-LC3 deberían estar aumentados en la condición con GLP-1 con respecto al control. Este aumento no debería verse cuando PKA esté siendo inhibida por H-89. Sin embargo, y como se observa en la Figura 21, el efecto esperado no se observó en las condiciones basales (Figura 21A), ni bajo la privación de glucosa (Figura 21B). Contrario a lo que se esperaba, los niveles de p-LC3 son menores en condiciones con GLP-1. Además, los niveles de p-LC3 son incluso menores cuando las células son estimuladas con H-89 y GLP-1. Estos resultados sugieren que GLP-1 no induce la fosforilación de LC3 en el tiempo evaluado.



**Figura 21. GLP-1 no induce la fosforilación de LC3 por PKA en VSMC.**

Células A7r5 se pretrataron con H-89 (100 nM) por 30 min, con GLP-1 (100 nM) por 30 min y finalmente se estimularon con RPMI 1640 o se mantuvieron con DMEM + 10% FBS y CQ (30  $\mu$ M) por 4 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de fosfo-LC3 (p-LC3) y LC3 total (LC3 I + LC3 II). Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. En **A**) evaluación de la fosforilación de LC3 en condiciones basales (n = 4) y en **B**) bajo privación de glucosa (n = 3). Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM y se analizaron usando ANOVA de dos vías seguido de un post test Holm Sidak.

No obstante, cabe destacar que el tiempo al cual se evaluó la fosforilación de LC3 fue a las 4 h de estímulo. Para tener la certeza de que GLP-1 induce o no la fosforilación de LC3, es necesario evaluar los niveles de p-LC3 a tiempos más cortos (0-60 min).

Como se probó en los experimentos anteriores, se sugiere que GLP-1 genera efectos inhibitorios en el flujo autofágico y en la formación de autofagosomas en condiciones basales y en privación de glucosa en VSMC. Esta inhibición de la autofagia puede ser dependiente de PKA en condiciones basales. Sin embargo, esta inhibición no ocurriría por fosforilación de LC3, evaluado a las 4 h de estímulo.

## 7. DISCUSIÓN

A pesar de que la tasa de mortalidad de las enfermedades cardiovasculares ha disminuido gracias a la identificación de los factores de riesgo y mejoras en el diagnóstico e intervenciones quirúrgicas (Nabel & Braunwald, 2012), el aumento de la expectativa de vida, los cambios en el estilo de vida, el aumento de pacientes con obesidad y otras enfermedades como la diabetes, han generado un aumento en su prevalencia (Lavandero y col., 2015). Por estos motivos, la búsqueda de nuevas terapias es fundamental para disminuir la cantidad de muertes que se producen año a año y entregar una mejor calidad de vida a pacientes que sufren estas patologías.

Como se mencionó anteriormente, el control de la autofagia en las VSMC es uno de los principales objetivos de estudio para el control de enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis. Al mismo tiempo, GLP-1 ha sido calificado como un potencial candidato para una nueva medicina contra la formación de la placa aterosclerótica (Sudo y col., 2017). Además, PKA es un regulador negativo de la autofagia que fosforila e inhibe a las proteínas ATG y, últimamente, se ha demostrado que puede fosforilar a LC3 (Cherra y col., 2010). Por lo tanto, se planteó que GLP-1 inhibe la autofagia, mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación de LC3 por PKA, en VSMC.

Trabajos anteriores de nuestro grupo había determinado que bajar el porcentaje de suero de 10 % a 2 % no inducía la autofagia en las células A7r5, ya que no se observaba un aumento en los niveles proteicos de LC3 II (García, 2016). Sin embargo, al detener el flujo autofágico mediante el uso de CQ durante la privación de glucosa, se observó que los niveles de LC3 II eran mayores al tiempo control (0 h + CQ) que en los demás tiempos (Figura 8). Probablemente esto se generó porque los niveles basales de autofagia estaban muy elevados para poder apreciar un cambio cuando las células se privaron de glucosa por periodos cortos. Como se observa en la Figura 23, al mantener las células A7r5 por 24 h en medio DMEM con 2 % suero e inducir la autofagia con TNF- $\alpha$ , este proceso no se activa a tiempos cortos (3 h), pero sí cuando el estímulo es prolongado (24 y 48 h). Por lo tanto, esta dificultad no se presentaría al inducir la autofagia con otros estímulos, como

TNF- $\alpha$  o PDGF-BB, y por periodos más largos (Norambuena, 2015; García, 2016), lo que podría deberse a una adaptación de las células a un contexto de 2 % FBS. Además, como se observa en la Figura 22 del anexo, al tratar las células con otro medio inductor de la autofagia (EBSS, medio sin aminoácidos) por 4 h y con rapamicina (inhibidor de mTOR), no se observaron cambios en los niveles de LC3 II, lo que estaría apoyando la noción de que bajo estas condiciones de disminución del contenido de suero las células no responden a otros estímulos de inducción de autofagia. Por lo tanto, en este trabajo, se experimentó en condiciones de medio suplementado con 10% FBS. Bajo este nuevo contexto, al detener el flujo autofágico con CQ, se observó una tendencia al aumento de los niveles de los marcadores autofágicos a las 4 h. Debido a lo poco concluyente estos resultados, se realizó una cuantificación de las vesículas autofágicas. Con el objeto de marcar selectivamente las vesículas autofágicas se realizó una sobreexpresión de GFP-LC3 mediante transducción adenoviral. Esta proteína es expresada en el citosol, observándose una marca verde difusa en toda la célula. Sin embargo, cuando se induce la autofagia, el GFP-LC3 se relocaliza en las vesículas autofágicas. Esta relocalización permite la concentración de la marca en forma de puntos de color verde intenso (Salabei & Hill, 2013). Usando esta metodología se observó un aumento en el número de vesículas autofágicas entre las 4 y las 6 h. Como era de esperar, la acumulación de estas vesículas se incrementó al tratar las células con CQ, sugiriendo una acumulación aún mayor de autofagosomas. El aumento de la fluorescencia total por célula observada en las Figuras 11, 12, 15, 16, 18 y 20 puede ser explicado por dos razones. La primera, al inducirse la autofagia, la relocalización de la proteína GFP-LC3 concentraría la marca verde distribuida en todo el volumen del citoplasma en vesículas de pequeño tamaño, incrementando aparentemente la fluorescencia verde. Este aumento aparente de la fluorescencia puede verse exacerbado al observar un solo plano confocal, como el realizado en este trabajo, en vez de visualizar el volumen celular total. Segundo, la proteína GFP-LC3 es degradada normalmente por la autofagia, perdiéndose fluorescencia verde. Cuando este proceso se detiene usando CQ, la proteína GFP-LC3 se acumula, incrementando la fluorescencia total en la célula. Por esta razón, en este tipo de

experimentos, se evalúa el número de puntos verdes y no se considera la intensidad de fluorescencia de los mismos.

Al evaluar la autofagia basal e inducida durante 4 h y bajo la estimulación con CQ, como era de esperar, observamos que los niveles de LC3 II son mayores cuando se detiene el flujo autofágico. Sin embargo, la acumulación de este marcador fue mayor en la condición basal (DMEM + 10 % FBS) que en la condición de privación de glucosa (RPMI 1640) (Figura 13A). Este resultado sugiere fuertemente que la autofagia basal estaría elevada en las células A7r5. Interesantemente, al medir los niveles de LC3 II en líneas celulares de músculo liso que han sido expuestas a altas concentraciones de glucosa, estos niveles se encuentran elevados (Montes y col., 2013). Por lo tanto, aunque no se induzca la autofagia por factores como PDGF o TNF- $\alpha$  o por privación de nutrientes, este proceso puede estar activo en células de músculo liso en condiciones de alta glucosa (Montes y col., 2013) o de alto porcentaje de suero, como se vio en el presente trabajo.

Por otra parte, al evaluar los niveles proteicos de p62, estos no mostraron cambios significativos ni siquiera cuando se detuvo el flujo autofágico con CQ (Figura 13B). Esto puede ocurrir por el control de síntesis que posee la proteína, la cual se detiene cuando se alcanzan ciertos niveles basales (García, 2016). Por lo tanto, a pesar de que los niveles de p62 siguieron siendo monitoreados, no mostraron cambios por lo que no se muestran en este reporte.

Varios estudios se han basado en la identificación de los mecanismos moleculares por los cuales ocurre el cambio fenotípico en las VSMC (Owens y col., 2004; Mack, 2011). Como se mencionó anteriormente, la autofagia influye en la plasticidad de las VSMC (Salabei & Hill, 2013). Sin embargo, dependiendo de cómo se active este proceso catabólico, se desencadenarán diferentes respuestas. Para el tratamiento de la restenosis, por ejemplo, se utiliza rapamicina, el cual es un conocido inhibidor de mTOR y, por lo tanto, un activador de la autofagia. El principal efecto que se observa a nivel celular es que, al utilizar rapamicina, las VSMC conservan su fenotipo contráctil y quiescente (Martin y col., 2007). Esto último pareciera contradecir el principio de este trabajo, donde proponemos que la autofagia induciría la desdiferenciación de las VSMC. No obstante, en otro trabajo donde utilizaron PDGF como inductor del cambio fenotípico de estas células,

observaron que el proceso autofágico es esencial para que se produzca la desdiferenciación de las células de músculo liso, pasando desde un fenotipo contráctil y quiescente a uno sintético y migratorio (Salabei y col., 2013). En este trabajo, los resultados sugieren fuertemente que la maquinaria contráctil es degradada a partir del proceso autofágico (Salabei & Hill, 2013). Esta particularidad, que en principio pareciera ser contradictorio, ocurre porque, a pesar de que en ambos casos se activa la autofagia, la activación ocurre por dos vías distintas.

En el primer caso, al inhibir a mTOR y a su efector S6K1, rapamicina alivia la represión que sufre el receptor de insulina sustrato-1 (IRS-1), facilitando la activación de PI3K y Akt en respuesta a insulina o al factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) (Hayashi y col., 1999). La activación del receptor de IGF-1 por PI3K y Akt, es un mecanismo importante de la diferenciación de las VSMC, pues se ha visto que al inhibir a PI3K o a Akt, las VSMC se desdiferencian (Hayashi y col., 1999). Por lo tanto, a pesar de que se pueda estar activando la autofagia al inhibir a mTOR, la vía de señalización PI3K/Akt que está activando la rapamicina, conlleva a la diferenciación en las células de músculo liso. Asimismo, IGF-1 no produce desdiferenciación en VSMC pues, a diferencia de otros factores de crecimiento como PDGF que activan ERK, este factor activa la vía PI3K/Akt (Martin y col., 2007).

En cambio, en el segundo caso, PDGF al unirse a receptores de superficie, activa varias vías de señalización intracelular que conducen a la regulación de la expresión génica y de la función celular. El resultado de esto es una disminución de la abundancia de las proteínas contráctiles y un crecimiento en la expresión de proteínas sintéticas (Panda y col., 1997; Owens y col., 2004). Además, este factor de crecimiento activaría el cambio fenotípico a través de la vía ERK (Martin y col., 2007).

Finalmente, no basta con activar un proceso para producir el cambio deseado. En este caso, la activación de la autofagia puede llevar a la desdiferenciación de las VSMC, como en el caso de la estimulación por PDGF, o ser una consecuencia del proceso de diferenciación, como en el caso del tratamiento con rapamicina. Por lo tanto, la regulación del proceso autofágico es fundamental para la plasticidad de las VSMC, pero dependiendo de la vía por el cual se active este proceso, generará efectos distintos.

En cuanto a los efectos de GLP-1 en el control de la autofagia de las células A7r5, estos se analizaron bajo 2 condiciones de estudio: efectos basales y efectos inducidos por privación de glucosa. Cuando las células se mantuvieron durante 4 h con medio completo fresco suplementado con 10 % FBS y se estimularon con CQ, los niveles de LC3 II se acumularon. Sin embargo, cuando se pretrataron con GLP-1, esta acumulación disminuye significativamente alrededor de un 30 % (Figura 14A). Además, cuando se evaluó la formación de autofagosomas (Figura 15), el tratamiento con GLP-1 disminuyó la cantidad de vesículas formadas (condición CQ + GLP-1) en comparación con el control (condición solo con CQ). Estos resultados sugieren fuertemente que GLP-1 inhibe la autofagia basal en las VSMC. Este resultado es de interés debido a que no existe información de los efectos de GLP-1 sobre la autofagia en VSMC en condiciones normales de nutrientes. Sin embargo, recientemente se han estudiado los efectos de GLP-1 sobre lesiones ateroscleróticas de conejos con hiperlipidemia hereditaria (Sudo y col., 2017). Los resultados del grupo de Hirayama muestran que GLP-1, además de inhibir la absorción de triglicéridos (Qin y col., 2005) y reducir los niveles de triglicéridos séricos (Song y col., 2015), inhibe la formación de la placa aterosclerótica, inhibe su progresión y promueve su estabilización (Sudo y col., 2017). Por lo tanto, los efectos inhibitorios de GLP-1 sobre la placa de ateroma han sido probados y continúan en estudio, no obstante, no han estudiado el mecanismo por el cual estos efectos se llevarían a cabo, pero nuestros resultados sugieren que sería a través del proceso autofágico.

Por otra parte, cuando se indujo la autofagia por privación de glucosa, los niveles de LC3 II se acumularon cuando las células solo se trataron con CQ y, en contraste, disminuyeron cuando las células A7r5 se pretrataron con GLP-1 (Figura 14B). Al evaluar la formación de vesículas autofágicas en las mismas condiciones, se observó una tendencia a disminuir la cantidad de autofagosomas cuando las células se expusieron a GLP-1 en comparación a la condición con CQ, pero esta baja no es significativa (Figura 16). Por lo tanto, puede que GLP-1 inhiba la autofagia por privación de glucosa, pero los resultados no son tan sólidos como en el caso de la autofagia basal.

Para dilucidar si los efectos inhibitorios de GLP-1 sobre la autofagia ocurrían vía PKA, se utilizó el inhibidor H-89. La disminución de los niveles de LC3 II provocados por el tratamiento con GLP-1 se previnieron cuando las células se pretrataron con H-89, es decir, cuando se bloqueó PKA (Figura 17B). También se revirtió la disminución en la cantidad de los autofagosomas inducida por GLP-1 cuando se realizó el tratamiento con H-89 (Figura 18). Estos resultados indican que GLP-1 inhibe la autofagia basal en las células A7r5 a través de un mecanismo controlado por PKA. Como se mencionó anteriormente, al unirse con su receptor y estimular la producción de AMPc, GLP-1 activa PKA (Holz, 2004). Además, nuestro grupo ya probó que GLP-1R está presente en las células A7r5 y que GLP-1 activa a PKA en este modelo (Norambuena, 2015). Por consiguiente, los resultados obtenidos concuerdan con esta información.

En el caso de la autofagia inducida, los niveles de LC3 II muestran una leve disminución cuando las células se expusieron a GLP-1 y una tendencia a aumentar cuando se trataron con H-89 (Figura 19). Sin embargo, al estudiar la formación de autofagosomas, no hubo diferencias significativas bajo ninguna condición (Figura 20). Por lo tanto, si GLP-1 inhibe la autofagia inducida por privación de glucosa, no lo realiza a través de la PKA. Se ha establecido que la proteína quinasa activada por AMP, AMPK, se activa cuando la relación AMP/ATP aumenta debido al estrés provocado, por ejemplo, cuando hay bajos niveles de glucosa (Nagata & Hirata, 2010). Esto activa el mecanismo de regulación mTOR/S6K que, junto con otros estímulos, activan la autofagia (Nagata & Hirata, 2010). Según los resultados obtenidos en este trabajo, si GLP-1 está ejerciendo un control en la autofagia inducida por privación de glucosa, no ocurre mediante PKA y podría estar ocurriendo a través de AMPK, por lo tanto, se requiere de mayor investigación.

Como fue mencionado con anterioridad, una vez que GLP-1 se une a su receptor, la señal se amplifica y diversifica, induciendo la producción de AMPc lo que lleva a la activación de PKA (Holz, 2004). A su vez, esta proteína quinasa puede fosforilar e inactivar a LC3, inhibiendo la autofagia (Cherra y col., 2010). Por lo tanto, teóricamente GLP-1 debería aumentar la fosforilación de LC3 si es que el mecanismo de inhibición de la autofagia ocurriese por esta vía GLP-1R/AMPc/PKA. No obstante, los resultados de la

medición de los niveles de p-LC3 no mostraron un aumento cuando las células se trataron con GLP-1, ni en condiciones basales ni en condiciones de privación de glucosa (Figura 21A y B). Además, al inhibir la PKA con H-89, se esperaría que los niveles de p-LC3 disminuyeran. Sin embargo, por el contrario, en la condición control con H-89 los niveles de fosforilación no disminuyeron y, curiosamente, solo disminuyeron en la condición de H-89 + GLP-1. Este último resultado fue bastante inesperado, por lo que requiere mayor investigación.

A pesar de los antecedentes recientes que postulan una regulación de la autofagia por PKA vía fosforilación de LC3 (Cherra y col., 2010), esta no necesariamente ocurre en todos los tipos celulares. En efecto, esto se probó en líneas celulares de cáncer y en neuronas, contextos biológicos distintos a las VSMC, por lo que no necesariamente ocurrirán las mismas vías de señalización.

A pesar de que los efectos de GLP-1 vía PKA sobre la autofagia basal en VSMC fueron concluyentes, estos no se producen por la fosforilación de LC3. El blanco sobre el que actúa PKA para inhibir finalmente la autofagia en VSMC es aún desconocido y requiere de mayor estudio. Por otro lado, la manera en que GLP-1 regularía la autofagia en condiciones deficientes de glucosa tampoco está dilucidado. No obstante, los efectos de GLP-1 son positivos y este trabajo se suma a la evidencia ya existente que postula a esta incretina como un posible medicamento para tratar la aterosclerosis, lo que requiere de mayor investigación clínica (Sudo y col., 2017).

## 8. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

GLP-1 disminuye el flujo autofágico, tanto en condiciones basales como en contextos de privación de glucosa.

GLP-1 disminuye la formación de autofagosomas en condiciones basales. En condiciones de privación de glucosa, los resultados son similares, pero requieren del aumento de las repeticiones experimentales.

GLP-1 inhibe la autofagia basal por medio de un mecanismo dependiente de la activación de la PKA en VSMC. Sin embargo, la implicancia de la vía GLP-1R/PKA sobre la autofagia inducida por privación de glucosa, requiere de mayor investigación.

GLP-1 no induce la fosforilación de LC3 a las 4 h de estímulo. Sin embargo, este resultado requiere del análisis a tiempos más cortos.

Por lo tanto, en condiciones basales GLP-1 inhibe la autofagia por medio de un mecanismo dependiente de PKA. En contextos de privación de glucosa los resultados requieren de mayor estudio para determinar si la inhibición es vía PKA o AMPK. Finalmente, la fosforilación de LC3 no se induce a las 4 h de estímulo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C., y Stroke Statistics, S. (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, **135**: e146-e603.
- Bernard, A., y Klionsky, D. J. (2013). Autophagosome formation: tracing the source. *Dev Cell*, **25**: 116-117.
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Deminoff, S. J., y Herman, P. K. (2005). An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 13933-13938.
- Budovskaya, Y. V., Stephan, J. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J., y Herman, P. K. (2004). The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**: 20663-20671.
- Cai, X., Li, J., Wang, M., She, M., Tang, Y., Li, J., Li, H., y Hui, H. (2017). GLP-1 Treatment Improves Diabetic Retinopathy by Alleviating Autophagy through GLP-1R-ERK1/2-HDAC6 Signaling Pathway. *Int J Med Sci*, **14**: 1203-1212.
- Campbell, G. R., y Campbell, J. H. (1985). Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, **42**: 139-162.
- Cecchetti, A., Rocchiccioli, S., Boccardi, C., y Citti, L. (2011). Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *Int Rev Cell Mol Biol*, **288**: 43-99.
- Clowes, A. W., Reidy, M. A., y Clowes, M. M. (1983). Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest*, **49**: 327-333.
- Creutzfeldt, W. (1979). The incretin concept today. *Diabetologia*, **16**: 75-85.
- Creutzfeldt, W. O., Kleine, N., Willms, B., Orskov, C., Holst, J. J., y Nauck, M. A. (1996). Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care*, **19**: 580-586.
- Chen, Y., y Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, **124**: 161-170.

- Cherra, S. J., 3rd, Kulich, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B. W., y Chu, C. T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*, **190**: 533-539.
- Choi, A. M., Ryter, S. W., y Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*, **368**: 651-662.
- Davies, M. G., y Hagen, P. O. (1994). Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg*, **81**: 1254-1269.
- Deacon, C. F. (2004). Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res*, **36**: 761-765.
- Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., y Holst, J. J. (1995). Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, **44**: 1126-1131.
- Deacon, C. F., Plamboeck, A., Moller, S., y Holst, J. J. (2002). GLP-1-(9-36) amide reduces blood glucose in anesthetized pigs by a mechanism that does not involve insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**: E873-879.
- Dhanvantari, S., Seidah, N. G., y Brubaker, P. L. (1996). Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol*, **10**: 342-355.
- Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R., y Goke, B. (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*, **22**: 283-291.
- Elliott, R. M., Morgan, L. M., Tredger, J. A., Deacon, S., Wright, J., y Marks, V. (1993). Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*, **138**: 159-166.
- Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., y Rubinsztein, D. C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol*, **7**: 9-17.
- Frid, M. G., Dempsey, E. C., Durmowicz, A. G., y Stenmark, K. R. (1997). Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**: 1203-1209.
- García, M. (2016). Participación de la autofagia en la inducción del fenotipo sintético por TNF- $\alpha$  en células musculares lisas vasculares. Tesis para obtener el grado de Doctor en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Geer, J. C., Mc, G. H., Jr., y Strong, J. P. (1961). The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, **38**: 263-287.
- Gittenberger-de Groot, A. C., DeRuiter, M. C., Bergwerff, M., y Poelmann, R. E. (1999). Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**: 1589-1594.
- Green, B. D., Hand, K. V., Dougan, J. E., McDonnell, B. M., Cassidy, R. S., y Grieve, D. J. (2008). GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys*, **478**: 136-142.
- Green, B. D., Mooney, M. H., Gault, V. A., Irwin, N., Bailey, C. J., Harriott, P., Greer, B., Flatt, P. R., y O'Harte, F. P. (2004). Lys9 for Glu9 substitution in glucagon-

- like peptide-1(7-36)amide confers dipeptidylpeptidase IV resistance with cellular and metabolic actions similar to those of established antagonists glucagon-like peptide-1(9-36)amide and exendin (9-39). *Metabolism*, **53**: 252-259.
- Gribble, F. M. (2008). RD Lawrence Lecture 2008: Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. *Diabet Med*, **25**: 889-894.
- Griendling, K. K., y Alexander, R. W. (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*, **96**: 3264-3265.
- Grieve, D. J., Cassidy, R. S., y Green, B. D. (2009). Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control? *Br J Pharmacol*, **157**: 1340-1351.
- Hargrove, D. M., Nardone, N. A., Persson, L. M., Parker, J. C., y Stevenson, R. W. (1995). Glucose-dependent action of glucagon-like peptide-1 (7-37) in vivo during short- or long-term administration. *Metabolism*, **44**: 1231-1237.
- Hayashi, K., Takahashi, M., Kimura, K., Nishida, W., Saga, H., y Sobue, K. (1999). Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*, **145**: 727-740.
- He, C., y Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, **43**: 67-93.
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., Zhao, S., Liu, J. O., y Yu, L. (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem*, **278**: 29278-29287.
- Holz, G. G. (2004). Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, **53**: 5-13.
- Holz, G. G., y Chepurny, O. G. (2003). Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. *Curr Med Chem*, **10**: 2471-2483.
- Kabaya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., y Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, **19**: 5720-5728.
- Kanse, S. M., Kreymann, B., Ghatei, M. A., y Bloom, S. R. (1988). Identification and characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Lett*, **241**: 209-212.
- Kendall, D. M., Riddle, M. C., Rosenstock, J., Zhuang, D., Kim, D. D., Fineman, M. S., y Baron, A. D. (2005). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care*, **28**: 1083-1091.
- Kervran, A., Blache, P., y Bataille, D. (1987). Distribution of oxyntomodulin and glucagon in the gastrointestinal tract and the plasma of the rat. *Endocrinology*, **121**: 704-713.

- Khoo, J. C., Miller, E., Pio, F., Steinberg, D., y Witztum, J. L. (1992). Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler Thromb*, **12**: 1258-1266.
- Kirschner, L. S., Yin, Z., Jones, G. N., y Mahoney, E. (2009). Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer*, **16**: 773-793.
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**: 931-937.
- Knudsen, L. B., Kiel, D., Teng, M., Behrens, C., Bhumralkar, D., Kodra, J. T., Holst, J. J., Jeppesen, C. B., Johnson, M. D., de Jong, J. C., Jorgensen, A. S., Kercher, T., Kostrowicki, J., Madsen, P., Olesen, P. H., Petersen, J. S., Poulsen, F., Sidemann, U. G., Sturis, J., Truesdale, L., May, J., y Lau, J. (2007). Small-molecule agonists for the glucagon-like peptide 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 937-942.
- Knudsen, L. B., y Pridal, L. (1996). Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur J Pharmacol*, **318**: 429-435.
- Kockx, M. M., De Meyer, G. R., Buysens, N., Knaapen, M. W., Bult, H., y Herman, A. G. (1998). Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res*, **83**: 378-387.
- Lavandero, S., Chiong, M., Rothermel, B. A., y Hill, J. A. (2015). Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest*, **125**: 55-64.
- Levine, B., y Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**: 463-477.
- Liaw, L., Almeida, M., Hart, C. E., Schwartz, S. M., y Giachelli, C. M. (1994). Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res*, **74**: 214-224.
- Libby, P., Sukhova, G., Lee, R. T., y Liao, J. K. (1997). Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol*, **62 Suppl 2**: S23-29.
- Lin, F., y Wang, R. (2009). Molecular modeling of the three-dimensional structure of GLP-1R and its interactions with several agonists. *J Mol Model*, **15**: 53-65.
- Liu, H., Xiong, W., Liu, Q., Zhang, J., y Dong, S. (2016). Chemokine-Like Receptor 1 Regulates the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Med Sci Monit*, **22**: 4054-4061.
- Mack, C. P. (2011). Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**: 1495-1505.
- Martin, K. A., Merenick, B. L., Ding, M., Fetalvero, K. M., Rzuclidlo, E. M., Kozul, C. D., Brown, D. J., Chiu, H. Y., Shyu, M., Drapeau, B. L., Wagner, R. J., y Powell, R. J. (2007). Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling. *J Biol Chem*, **282**: 36112-36120.
- Mayr, B., y Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 599-609.
- MedlinePlus. (2017). Diabetes. Página web  
<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001214.htm>

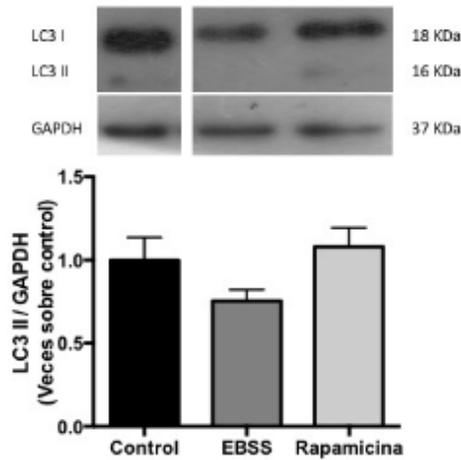
- Mendis, S., Puska, P., y Norrving, B. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control* (W. W. H. F. W. S. Organization Ed.). Geneva: World Health Organization.
- MINSAL. (2014). *Indicadores básicos de salud Chile 2014*. Santiago: Departamento de Estadísticas e Información de Salud, DEIS.
- Mizushima, N., y Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**: 728-741.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., y Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, **27**: 421-429.
- Modi, P. (2007). Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol*, **4**: 39-47.
- Montes, D. K., Brenet, M., Munoz, V. C., Burgos, P. V., Villanueva, C. I., Figueroa, C. D., y Gonzalez, C. B. (2013). Vasopressin activates Akt/mTOR pathway in smooth muscle cells cultured in high glucose concentration. *Biochem Biophys Res Commun*, **441**: 923-928.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem*, **66**: 807-822.
- Morales, P. E., Torres, G., Sotomayor-Flores, C., Pena-Oyarzun, D., Rivera-Mejias, P., Paredes, F., y Chiong, M. (2014). GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun*, **446**: 410-416.
- Morel, D. W., Hessler, J. R., y Chisolm, G. M. (1983). Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*, **24**: 1070-1076.
- Nabel, E. G., y Braunwald, E. (2012). A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*, **366**: 54-63.
- Nagata, D., y Hirata, Y. (2010). The role of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Hypertens Res*, **33**: 22-28.
- Newby, A. C. (2002). Vitronectin is implicated as the matrix takes control of neointima formation. *Cardiovasc Res*, **53**: 779-781.
- Newby, A. C., Libby, P., y van der Wal, A. C. (1999). Plaque instability--the real challenge for atherosclerosis research in the next decade? *Cardiovasc Res*, **41**: 321-322.
- NHLBI. (2016). What Is Atherosclerosis? Página web <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/atherosclerosis>
- Norambuena, I. (2015). Efecto de la incretina GLP-1 sobre la autofagia inducida por PDGF-BB en el cambio fenotípico de las células musculares lisas vasculares. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Orskov, C., y Poulsen, S. S. (1991). Glucagonlike peptide-I-(7-36)-amide receptors only in islets of Langerhans. Autoradiographic survey of extracerebral tissues in rats. *Diabetes*, **40**: 1292-1296.
- Orskov, C., Rabenhoj, L., Wettergren, A., Kofod, H., y Holst, J. J. (1994). Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*, **43**: 535-539.

- Owens, G. K., Kumar, M. S., y Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, **84**: 767-801.
- Panda, D., Kundu, G. C., Lee, B. I., Peri, A., Fohl, D., Chackalaparampil, I., Mukherjee, B. B., Li, X. D., Mukherjee, D. C., Seides, S., Rosenberg, J., Stark, K., y Mukherjee, A. B. (1997). Potential roles of osteopontin and alphaVbeta3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 9308-9313.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., y Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, **282**: 24131-24145.
- Parker, F., y Odland, G. F. (1966). A light microscopic, histochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in rabbit coronary artery and a comparison with rabbit aorta atherosclerosis. *Am J Pathol*, **48**: 451-481.
- Petri, M. H., Laguna-Fernandez, A., Tseng, C. N., Hedin, U., Perretti, M., y Back, M. (2015). Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A(4) signals through FPR2/ALX in vascular smooth muscle cells and protects against intimal hyperplasia after carotid ligation. *Int J Cardiol*, **179**: 370-372.
- Qin, X., Shen, H., Liu, M., Yang, Q., Zheng, S., Sabo, M., D'Alessio, D. A., y Tso, P. (2005). GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **288**: G943-949.
- Ranganath, L. R. (2008). The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med*, **46**: 43-56.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., y Rubinsztein, D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, **90**: 1383-1435.
- Rosenberg, D., Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Bertagna, X., y Bertherat, J. (2002). Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci*, **968**: 65-74.
- Rubinsztein, D. C., Shpilka, T., y Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol*, **22**: R29-34.
- Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*, **39**: 86-93.
- Rzucidlo, E. M., Martin, K. A., y Powell, R. J. (2007). Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, **45 Suppl A**: A25-32.
- Salabei, J. K., Cummins, T. D., Singh, M., Jones, S. P., Bhatnagar, A., y Hill, B. G. (2013). PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J*, **451**: 375-388.
- Salabei, J. K., y Hill, B. G. (2013). Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Free Radic Biol Med*, **65**: 693-703.

- Saleh Al-Shehabi, T., Iratni, R., y Eid, A. H. (2016). Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Phytomedicine*, **23**: 1068-1081.
- Schachter, M. (1997). Vascular smooth muscle cell migration, atherosclerosis, and calcium channel blockers. *Int J Cardiol*, **62 Suppl 2**: S85-90.
- Schaper, W., y Ito, W. D. (1996). Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*, **79**: 911-919.
- Schirra, J., Katschinski, M., Weidmann, C., Schafer, T., Wank, U., Arnold, R., y Goke, B. (1996). Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *J Clin Invest*, **97**: 92-103.
- Schwartz, S. M. (1997). Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, **99**: 2814-2816.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., y Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Semin Cell Biol*, **1**: 441-448.
- Shimizu, I., Hirota, M., Ohboshi, C., y Shima, K. (1987). Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology*, **121**: 1076-1082.
- Singh, R., y Cuervo, A. M. (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab*, **13**: 495-504.
- Song, X., Jia, H., Jiang, Y., Wang, L., Zhang, Y., Mu, Y., y Liu, Y. (2015). Anti-atherosclerotic effects of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) based therapies in patients with type 2 Diabetes Mellitus: A meta-analysis. *Sci Rep*, **5**: 10202.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., y Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 17049-17054.
- Su, G., Sun, G., Liu, H., Shu, L., Zhang, J., Guo, L., Huang, C., y Xu, J. (2015). Niacin Suppresses Progression of Atherosclerosis by Inhibiting Vascular Inflammation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Med Sci Monit*, **21**: 4081-4089.
- Sudo, M., Li, Y., Hiro, T., Takayama, T., Mitsumata, M., Shiomi, M., Sugitani, M., Matsumoto, T., Hao, H., y Hirayama, A. (2017). Inhibition of plaque progression and promotion of plaque stability by glucagon-like peptide-1 receptor agonist: Serial in vivo findings from iMap-IVUS in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, **265**: 283-291.
- Sutherland, E. W., y Rall, T. W. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*, **232**: 1077-1091.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., y Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, **20**: 5971-5981.
- Thomas, W. A., Florentin, R. A., Reiner, J. M., Lee, W. M., y Lee, K. T. (1976). Alterations in population dynamics of arterial smooth muscle cells during atherogenesis. IV. Evidence for a polyclonal origin of hypercholesterolemic diet-induced atherosclerotic lesions in young swine. *Exp Mol Pathol*, **24**: 244-260.

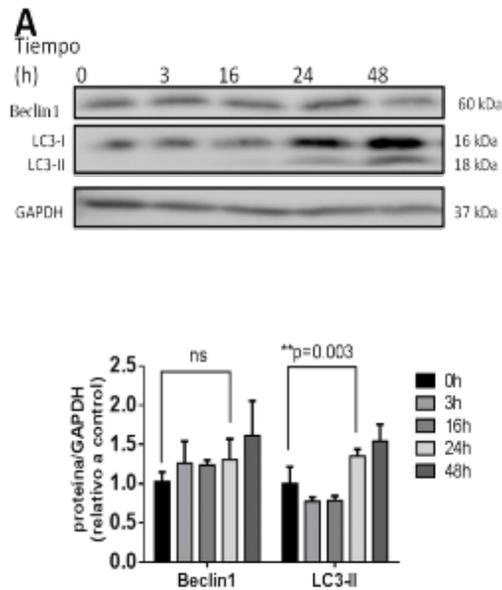
- Thorens, B. (1992). Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the glucocretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 8641-8645.
- Uttenthal, L. O., y Blazquez, E. (1990). Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands. *FEBS Lett*, **262**: 139-141.
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., y Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, **243**: 3763-3765.
- Wei, Y., y Mojsov, S. (1995). Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett*, **358**: 219-224.
- White, J. W., y Saunders, G. F. (1986). Structure of the human glucagon gene. *Nucleic Acids Res*, **14**: 4719-4730.
- Wight, T. N. (1995). The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **6**: 326-334.
- Wikimedia-Commons. (2007). Anatomía de una arteria. Página web [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomia\\_arteria.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anatomia_arteria.jpg)
- Wolf, C., Cai, W. J., Vosschulte, R., Koltai, S., Mousavipour, D., Scholz, D., Afsah-Hedjri, A., Schaper, W., y Schaper, J. (1998). Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol*, **30**: 2291-2305.
- Wolinsky, H., Goldfischer, S., Schiller, B., y Kasak, L. E. (1973). Lysosomes in aortic smooth muscle cells. Effects of hypertension. *Am J Pathol*, **73**: 727-734.
- World Health Organization (2017). The top 10 causes of death. Página web <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Zalewski, A., Shi, Y., y Johnson, A. G. (2002). Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res*, **91**: 652-655.

## 10. ANEXOS



**Figura 22. Inducción de autofagia en células privadas de suero.**

Células A7r5 se cultivaron 24 h con medio DMEM + 2% FBS antes de la inducción de la autofagia con medio EBSS (sin aminoácidos) y Rapamicina por 4 h. Posteriormente, los extractos proteicos obtenidos se sometieron a western blot para detectar los niveles de LC3 I y LC3 II. Se utilizó GAPDH como control de carga. En la parte superior se muestra una imagen representativa de los blots obtenidos. En la parte inferior, la cuantificación de las señales. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes y se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de un post test Holm Sidak.



**Figura 23. Efecto de TNF- $\alpha$  sobre los marcadores de autofagia en las células A7r5.**

**A. Cinética.** Las células se estimularon con 100 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante diferentes tiempos (0, 3, 16, 24 y 48 h). Los resultados son el promedio  $\pm$  EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Dunnett.

