

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR ANGIOTENSINA II EN CÉLULAS
MUSCULARES LISAS VASCULARES”**

Tesis presentada para optar al grado académico de
Doctor en Farmacología por:

David Gonzalo Mondaca Ruff

Directores de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Dr. Sergio Lavandero Gonzalez

Santiago, Chile

2018

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares del Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y Departamento de Cardiología, Facultad de Medicina, Universidad de Emory.

Financiado por Beca Doctorado Nacional Conicyt N° 21130337, Beca Pasantía Doctoral Conicyt y los proyectos Fondecyt 1140329, Fondecyt 1180157 y Fondap ACCDiS 15130011

Esta tesis y parte de su contenido, ha dado origen a los siguientes trabajos:

Publicaciones

Autophagy mediates tumor necrosis factor- α -induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. García-Miguel M, Riquelme JA, Norambuena-Soto I, Morales PE, Sanhueza-Olivares F, Nuñez-Soto C, **Mondaca-Ruff D**, Cancino-Arenas N, San Martín A, Chiong M. *PLoS One*. 2018;13:e0197210.

The STIM1 inhibitor ML9 disrupts basal autophagy in cardiomyocytes by decreasing lysosome content. Shaikh S, Troncoso R, **Mondaca-Ruff D**, Parra V, Garcia L, Chiong M, Lavandero S. *Toxicol In Vitro*. 2018; 48:121-127.

Revisiones.

Transforming growth factor-beta and Forkhead box O transcription factors as cardiac fibroblast regulators. Norambuena-Soto I, Nuñez-Soto C, Sanhueza-Olivares F, Cancino-Arenas N, **Mondaca-Ruff D**, Vivar R, Díaz-Araya G, Mellado R, Chiong M. *Biosci Trends*. 2017;11:154-162.

Therapeutic targeting of autophagy in myocardial infarction and heart failure. Riquelme JA, Chavez MN, **Mondaca-Ruff D**, Bustamante M, Vicencio JM, Quest AF, Lavandero S. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14:1007-19.

ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. Mendoza-Torres E, Oyarzún A, **Mondaca-Ruff D**, Azocar A, Castro PF, Jalil JE, Chiong M, Lavandero S, Ocaranza MP. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2015;9 :217-37.

Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **Mondaca-Ruff D**, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R. *Front Cell Dev Biol*. 2014; 15;2:72.

Resúmenes presentados en reuniones científicas

2017

XL Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

Angiotensin II increases total LC3 levels and induces autophagy in vascular smooth muscle cells. Mondaca-Ruff D, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Núñez-Soto C, Cancino-Arenas N, San Martín A, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 26-29, 2017, Puerto Varas. Chile.

XL Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

Atorvastatin inhibits basal autophagy in skeletal muscle cells. Norambuena-Soto I, Navarro-Márquez M, Cartes-Saavedra B, Sanhueza-Olivares F, Núñez-Soto C, Cancino-Arenas N, Mondaca-Ruff D, Mellado R, Chiong M. Septiembre 26-29, 2017, Puerto Varas. Chile.

XL Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

Glucagon-like peptide-I inhibits basal and induced autophagy via protein kinase A in vascular smooth muscle cells. Núñez-Soto C, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Mondaca-Ruff D, Chiong M. Septiembre 26-29, 2017, Puerto Varas. Chile.

XL Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

PDGF-BB decreases mitochondrial function and induces mitophagy during VSMC phenotypic switch. Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Núñez-Soto C, Mondaca-Ruff D, Cancino-Arenas N, San Martín A, Chiong M. Septiembre 26-29, 2017, Puerto Varas. Chile.

2016

XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Activation of Angiotensin II type 1 receptor I induces autophagy in vascular smooth muscle cells. Mondaca-Ruff D, García-Miguel M, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Núñez-Soto C, Riquelme J, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 27-30, 2016, Puerto Varas, Chile. **Presentación Oral.**

XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Regulation of autophagy by glucagon-like peptide I in vascular smooth muscle cells. Núñez-Soto C, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, García-Miguel M, Mondaca-Ruff D, Riquelme J, Chiong M. Septiembre 27-30, 2016, Puerto Varas, Chile.

XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. TNF- α Mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype switching. García-Miguel M, Norambuena-Soto I, **Mondaca-Ruff D**, Cartes-Saavedra B, Morales P, Núñez-Soto C, Sanhueza-Olivares F, Riquelme J, Mellado R, Chiong M. Septiembre 27-30, 2016, Puerto Varas, Chile.

XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. PDGF-BB Induces changes in mitochondrial mass and function associated with vsmc phenotypic switching. Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, García-Miguel M, **Mondaca-Ruff D**, Núñez-Soto, C, Riquelme J, Chiong M. Septiembre 27-30, 2016, Puerto Varas, Chile.

2015

XXV Congreso interamericano de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. La autofagia inducida por tnf-alfa regula el cambio fenotípico de las células musculares lisas vasculares. Marina García-Miguel, Benjamín Cartes-Saavedra, Ignacio Norambuena-Soto, **David Mondaca-Ruff**, Fernanda-Sanhueza, Mario Chiong. Diciembre 4–7, 2015, Santiago, Chile.

X International Symposium on Vasoactive Peptides.

Effect of glucagon-like peptide 1 on vascular smooth muscle mitochondrial metabolism and phenotype. Chiong M, Morales PE, Torres G, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **Mondaca-Ruff D**, Vidal-Peña G, Nuñez C, Sanhueza-Olivares F, García-Miguel M. Octubre 29 – 31, 2015, Lagoa dos Santos, Minas Gerais – Brazil.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

Control del cambio fenotípico de las células musculares lisas vasculares por el metabolismo mitocondrial. Mario Chiong, Pablo E Morales, Benjamín Cartes-Saavedra, Ignacio Norambuena-Soto, Marina García-Miguel, Fernanda Sanhueza-Olivares, Gloria Torres, Gonzalo Vidal-Peña, Constanza Núñez, **David Mondaca-Ruff**, Sergio Lavandero. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.

Angiotensin II induces autophagy in vascular smooth muscle cells. **Mondaca-Ruff D**, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Garcia-Miguel M, Sanhueza-Olivares F, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
Study of STIM1-Orai1 in cardiomyocyte autophagy. Shaikh S, **Mondaca-Ruff, David**, Troncoso Rodrigo, Chiong Mario, Lavandero Sergio. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
GLP-1 prevents mitochondrial and phenotypic changes induced by PDGF-BB in VSMC through PKA-Drp1 pathway. Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, García-Miguel M, Morales P, Torres G, Sanhueza-Olivares F, **Mondaca-Ruff D**, Chiong M. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) inhibits VSMC dedifferentiation through an autophagy dependent mechanism. Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, **Mondaca-Ruff D**, García-Miguel M, Sanhueza-Olivares F, Nuñez C, Mellado R, Chiong M. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

XXXVIII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
PDGF-BB induces mitochondrial fragmentation and degradation during VSMC dedifferentiation. Sanhueza-Olivares F, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **Mondaca-Ruff D**, Pino-Espinoza G, García-Miguel M, Morales P, Chiong M. Septiembre 22 – 25, 2015, Puerto Varas – Chile.

2014

XXXVII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
PDGF-BB induces mitochondrial degradation and autophagy in VSMCs. **Mondaca-Ruff D**, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Vidal-Peña G, Morales PE, García-Miguel M, Pino-Espinoza, G, Pedrozo Z, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 30 – 04 Octubre. 2014, Puerto Varas – Chile.

XXXVII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular.
Metabolic shift induced by PDGF-BB involves mitochondrial fragmentation in VSMCs. Cartes-Saavedra B, **Mondaca-Ruff D**, Norambuena-Soto I, Vidal-Peña G, Morales PE, García-Miguel M, Mellado R, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 30 – 04 Octubre 2014, Puerto Varas – Chile.

XXXVII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle phenotype. Chiong M, Morales PE, Torres G, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **Mondaca-Ruff D**, Vidal-Peña G, Nuñez-Soto C, García-Miguel M, Michea L. Septiembre 30 – 04 Octubre 2014, Puerto Varas – Chile.

XXXVII Reunión anual de la sociedad de Bioquímica y Biología molecular. GLP-1 prevents PDGF-BB induced dedifferentiation in VSMCs. Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Morales PE, **Mondaca-Ruff D**, Nuñez-Soto C, García-Miguel M, Mellado R, Lavandero S, Chiong M. Septiembre 30 – 04 Octubre 2014, Puerto Varas – Chile.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT	XII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	i
I.1. Enfermedades cardiovasculares.....	i
I.1.2. Sistema arterial	i
I.1.3. Células musculares lisas vasculares y fenotipo.....	ii
I.1.4. VSMCs y contracción	iv
I.1.5. Angiotensina II y VSMCs	v
I.1.5. Vía RhoA/ROCK en VSMCs	vi
I.1.6. Autofagia	vii
I.1.7. Mecanismo de autofagia	viii
I.1.8. Regulación de autofagia por mTORc1.....	x
I.1.9. Autofagia y VSMCs	xi
I.2. Hipótesis.....	xiv
I.3. Objetivos	xiv
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	xv
II.1. Línea celular.....	xv
II.2. Cultivo primario de aorta.....	xv
II.3. Preparación de extractos proteicos.....	xvi
II.4. Determinación por Western blot	xvi
II.5. Determinación de autofagia	xviii
II.6. Determinación de vesículas autofágicas.....	xviii
II.7. Inhibición de autofagia.....	xix
II.8. Vía mTORc1	xix
II.9. Actividad de ROCK.....	xx
II.10. Proteínas contráctiles.....	xx
II.11. Análisis de los datos	xxi
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	xxii
III.1. Determinación de autofagia en VSMCs	xxii
III.1.1. Cinética y curva dosis-respuesta de Ang II en VSMCs.....	xxii
III.1.2. Efecto de Ang II en la inducción de autofagia en VSMCs	xxiv

III.1.2. Efecto de Ang II sobre los niveles de LC3 en VSMCs	xxvii
III.2. Efecto de Ang II en las distintas etapas de la autofagia	xxxii
III.2.1. Regulación de la inducción de autofagia por Ang II en VSMCs	xxxii
III.2.1.1.Efecto de Ang II sobre Beclin 1.....	xxxii
III.2.1.2.Efecto de Ang II sobre la PI3K clase III	xxxiv
III.2.2. Efecto de Ang II sobre la formación del autofagosoma en VSMCs	xxxvi
III.3. Efecto de Ang II sobre la vía mTORc1	xxxviii
III.4. Papel del AT1R en la autofagia inducida por Ang II	xxxix
III.4.1. Efecto del antagonismo del AT1R con LOS sobre la autofagia inducida por Ang II	xl
III.4.2. Efecto del antagonismo del AT1R en las distintas etapas de la autofagia inducida por Ang II.....	xlii
III.4.2.1.Efecto del antagonismo del AT1R en la inducción de la autofagia	xlii
III.4.2.1.1.Efecto del antagonismo del AT1R sobre Beclin 1	xliii
III.4.2.1.2. Efecto del antagonismo del AT1R sobre la PI3K clase III.....	xliv
III.4.2.2. Efecto del antagonismo del AT1R en la formación del autofagosoma.....	xliv
III.5. Efecto de la activación de la vía RhoA/ROCK sobre la autofagia	xlvi
III.5.1.Activación de ROCK por Ang II en VSMCs.....	xlvi
III.5.1. Participación de ROCK en la autofagia inducida por Ang II	xlvi
III.5.1.1. Efecto de la inhibición de ROCK en el flujo autofágico y niveles de LC3 inducida por Ang II.....	xlix
III.5.1.2. Efecto de la inhibición de ROCK sobre los niveles Beclin 1 en células A7r5 estimuladas con Ang II	li
III.6. Efecto de Ang II sobre los niveles de Bag3 en células A7r5	lii
III.7. Proteínas contráctiles en VSMCs.....	liv
III.7.1. Autofagia y proteínas contráctiles.....	lvii
III.7.1.1. Autofagia dependiente de Ang II y proteínas contráctiles	lvii
III.7.1.2. Autofagia y niveles proteínas contráctiles.....	lix
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	lxii
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	lxxviii
BIBLIOGRAFÍA.....	lxxix

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de Ang II sobre los niveles de LC3 II en células A7r5 y en RASMs.....	xxv
Figura 2. Efecto de Ang II sobre el contenido de vesículas autofágicas en células A7r5.	xxvii
Figura 3. Efecto de Ang II sobre los niveles totales de LC3 en las células A7r5 y RASMs.	xxviii
Figura 4. Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre los niveles de LC3 en RASMs estimuladas con Ang II.....	xxx
Figura 5. Efecto de Ang II sobre Beclin 1 en células A7r5.....	xxxii
Figura 6. Efecto del silenciamiento de Beclin 1 sobre los niveles de LC3 en células A7r5 tratadas con Ang II.....	xxxiii
Figura 7. Efecto de Ang II sobre los niveles de PI3KCIII en células A7r5.....	xxxiv
Figura 8. Efecto de la inhibición de PI3KCIII sobre los niveles de LC3.	xxxv
Figura 9. Efecto de Ang II sobre los ATG involucrados en la elongación del fagoforo.....	xxxvii
Figura 10. Efecto de Ang II sobre la activación de la vía mTOR.	xl
Figura 11. Efecto del antagonismo del AT1R sobre la inducción de LC3 II, LC3 total y vesículas autofágicas inducidas por Ang II en células A7r5.	xlii
Figura 12. Efecto del antagonismo del AT1R sobre los niveles y fosforilación de Beclin 1 en células A7r5 estimuladas con Ang II.	xliii
Figura 13. Efecto del antagonismo del AT1R sobre los niveles de PI3KCIII en células A7r5 estimuladas con Ang II.....	xlv
Figura 14. Efecto del antagonismo del AT1R sobre los niveles de ATGs involucrados en la elongación del fagoforo en células A7r5 estimuladas con Ang II.....	xlvi
Figura 15. Efecto de Ang II sobre la activación de ROCK en células A7r5.....	xlviii

Figura 16.Efecto de la inhibición de ROCK sobre los niveles de LC3 I, LC3 II y LC3 total en células A7r5 estimuladas con Ang II.	i
Figura 17.Efecto de la inhibición de ROCK sobre los niveles de Beclin 1 en células A7r5 estimuladas con Ang II.....	li
Figura 18.Efecto de Ang II sobre los niveles de Bag3 en células A7r5.....	liii
Figura 19.Efecto del antagonismo AT1R e inhibición de ROCK sobre los niveles de Bag3 en células A7r5.	liii
Figura 20.Efecto de Ang II sobre proteínas contráctiles en células A7r5.....	liv
Figura 21.Efecto de LOS e Y27632 sobre las proteínas contráctiles en células A7r5 tratadas con Ang II.....	lvi
Figura 22.Efecto del bloqueo del flujo autofágico con CQ sobre las proteínas contráctiles en células A7r5 estimuladas con Ang II.	lviii
Figura 23.Efecto del silenciamiento de Beclin 1 sobre las proteínas contráctiles en células A7r5 estimuladas con Ang II.	lix
Figura 24.Inducción de autofagia por inhibición de mTOR en células A7r5.....	lx
Figura 25.Efecto de la inducción de autofagia por inhibición de mTOR sobre las proteínas contráctiles en células A7r5.	lxi
Figura 26.Modelo propuesto.	lxxvii

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la Tesis	29
Tabla 2. Estímulos e inhibidores utilizados	33

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	:	Factor de unión al iniciador de traducción eucariótico
α -SMA	:	Alfa-actina de musculo liso
A7r5	:	Línea celular de músculo liso de aorta embrionaria de rata
AcD	:	Actinomicina D
Ad	:	Adenovirus
Akt	:	RAC-alfa serina/treonina-proteína kinasa
AMBRA	:	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein
AMP	:	Adenosín mono fosfato
AMPK	:	Proteína kinasa activada por AMP
Ang I	:	Angiotensina I
Ang II	:	Angiotensina II
ANOVA	:	Análisis de varianza
ARN	:	Ácido ribonucleico
AT1R	:	Receptor de angiotensina tipo 1
ATG	:	Relacionado a autofagia (AuTophagy - related)
ATP	:	Adenosín trifosfato
Bag3	:	Bcl2-associated athanogene protein 3
BCA	:	Ácido bicin crónico
Bcl-2	:	Proteína asociada al linfoma de células-B del tipo 2
Ca ²⁺ -CaM	:	Complejo calcio-calmodulina
CaM	:	Calmodulina
CQ	:	Cloroquina
CHX	:	Cicloheximida
CS	:	Suero de ternera
DAG	:	Diacilglicerol
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's medium
ECA	:	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	:	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
SEM	:	Error estándar de la media
ET-1	:	Endotelina I
FBS	:	Suero fetal bovino
FCS	:	Suero fetal de ternera
GAP	:	Proteína activadora de GTPasas
GAPDH	:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDI	:	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
GDP	:	Guanosín difosfato
GEF	:	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GFP	:	Proteína fluorescente verde
GTP	:	Guanosín trifosfato
GTPasa	:	Guanosina trifosfatasa
HRP	:	Peroxidasa de rabano picante
HTA	:	Hipertensión arterial

IP3	:	Inositol trifosfato
LC3	:	Proteína de cadena liviana-3 asociada a microtúbulos
LIMK	:	Lim kinasa
LOS	:	Losartán
MEC	:	Matriz extracelular
MHC	:	Cadena pesada de la miosina
MLC	:	Cadena liviana de la miosina
MLCK	:	Kinasa de la cadena liviana de la miosina
MLCP	:	Fosfatasa de la cadena liviana de la miosina
MMP	:	Metaloproteinasa
MOI	:	Multiplicidad de infección
mRNA	:	Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	:	Mechanistic target of rapamycin
MYPT-1	:	Subunidad reguladora de la proteína blanco 1 de la fosfatasa de la miosina
MYPT-1 P	:	MYPT-1 fosforilado
MYPT-1 T	:	MYPT-1 total
NA	:	Noradrenalina
NP-40	:	Nonidet P-40
p70S6K	:	Proteína sustrato de 70 KDa de la proteína ribosomal S6K
PAGE	:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	:	Amortiguador fosfato salino
PE	:	Fosfatidil etanolamina
PDGF	:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3KCIII	:	Fosfatidilinositol 3-kinasa de clase III
PI3P	:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PIP2	:	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PLC	:	Fosfolipasa C
PVDF	:	Fluoruro de polivinilideno
RASMs	:	Células de cultivo primario de músculo liso de aorta
ROCK	:	Rho kinasa
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
siRNA	:	RNA pequeño interferente
SM22	:	Proteína de musculo liso de 22 kDa
TGF- β	:	Factor de crecimiento transformante beta
TSC1	:	Hamartina
TSC2	:	Tuberina
VSMCs	:	Células musculares lisas vasculares