

RESUMEN

La supervivencia celular frente a los cambios ambientales requiere el mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas. La degradación de proteínas, además de regular diferentes procesos celulares, tiene como función principal la eliminación de productos que no son útiles para la célula en determinadas situaciones o cuya acumulación puede ser tóxica. Los productos de esta degradación, es decir los aminoácidos, son reutilizados para la síntesis de nuevas moléculas o son metabolizados para la obtención de energía. La alteración de esta proteólisis intracelular puede llevar a la acumulación en el citoplasma de orgánulos defectuosos o de moléculas que se pueden agrupar en agregados insolubles y que pueden así desencadenar diferentes patologías. Aunque se ha avanzado bastante durante los últimos años en los conocimientos sobre la degradación intracelular de proteínas y de sus principales mecanismos, existen bastantes detalles moleculares todavía desconocidos. Por este motivo es necesario aportar nueva información sobre estos procesos que además podría ser relevante para identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar tratamientos más eficaces para las enfermedades derivadas de alteraciones en los mismos.

La degradación de proteínas ocurre por diferentes mecanismos que pueden clasificarse generalmente en dependientes o no de unos orgánulos citoplásmicos, los lisosomas. La macroautofagia (a la que se denomina generalmente con el término más simple de autofagia) y el sistema ubiquitina-proteasomas son, respectivamente, los más importantes de esos dos grupos. Básicamente, el sistema ubiquitina-proteasomas consiste en la poliubiquitinación de proteínas que son después degradadas por los proteasomas. La autofagia en cambio se inicia con el secuestro de porciones del citoplasma en estructuras de doble membrana que se cierran formando los autofagosomas. Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con endosomas y con lisosomas dando lugar a los autolisosomas, en los que por la acción de las proteasas o catepsinas lisosomales se degrada el material encerrado.

La autofagia está regulada por una amplia variedad de vías de señalización que responden a multitud de factores ambientales. Entre estos últimos, la situación de ayuno de nutrientes es la inductora más potente de la autofagia. Durante la privación de nutrientes como los aminoácidos, la célula sufre un estrés energético que debe tratar de reducir produciendo ATP a partir de nuevas fuentes. Para ello activa la autofagia para degradar los componentes de la célula, como las proteínas, hasta producir sus unidades básicas que después son metabolizadas. Por el contrario, se ha demostrado que cuando se proporcionan aminoácidos a la célula la autofagia es inhibida. Aunque el efecto sobre la autofagia de los aminoácidos ha sido estudiado ampliamente

en muchos laboratorios, no estaba tan claro ese efecto en el caso de otro nutriente, la glucosa, ya que cuando planteamos ese estudio los datos eran contradictorios.

En este trabajo hemos podido establecer claramente que la glucosa tiene un papel inductor sobre la autofagia empleando técnicas muy variadas que incluyen: la cuantificación por “Western-blot” de los niveles del marcador de autofagia LC3-II en presencia o en ausencia de inhibidores lisosomales, la cuantificación de la proteína degradada, total y por la vía autofágica, mediante experimentos de pulso y caza, la cuantificación morfométrica de estructuras autofágicas (equivalentes a autofagosomas y autolisosomas) por microscopia electrónica y la cuantificación de la masa lisosomal por fluorescencia. Además, hemos comprobado que la glucosa también induce la ubiquitinación de proteínas y la degradación de estas por los proteasomas. Con estos y otros datos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, hemos podido concluir que la glucosa induce la autofagia en todos los tipos celulares estudiados y en todas las condiciones ensayadas. Este efecto disminuye o se enmascara cuando están presentes a la vez otros factores que son inhibidores de la autofagia, como los aminoácidos o el suero bovino fetal, lo que podría explicar algunos de los datos contradictorios en la literatura.

La glucosa aporta la energía necesaria para el correcto funcionamiento de la autofagia a partir de unos niveles mínimos de ATP. Un descenso en la disponibilidad energética a través de la inhibición de la glucólisis reprime la autofagia inducida por la glucosa. Sin embargo, la estimulación de la autofagia por glucosa no parece depender únicamente de la disponibilidad de ATP, sino que hemos identificado una vía de señalización en la que no interviene AMPK a pesar de responder al descenso de los niveles de ATP y al aumento de los niveles de calcio durante la incubación en un medio carente de glucosa. Esta vía tampoco implica a mTORC1 y en ella sí interviene en cambio la MAPK $p38\alpha$, como hemos comprobado con diferentes inhibidores de esta quinasa, con el uso de siRNAs o empleando MEFs $p38^{-/-}$. Consideramos que estos resultados contribuyen a clarificar más la regulación de la autofagia por nutrientes y, más concretamente, por uno tan relevante como es la glucosa.