

EFFECTOS DE LA RAPAMICINA EN LOS PROCESOS DE SENESCENCIA Y AUTOFAGIA EN LINEAS CELULARES HUMANAS

PABLO N. FERNANDEZ LARROSA*¹, MARINA RUIZ GRECCO*¹, CECILIA V. ALVARADO¹, SABRINA MICENMACHER¹, CRISTINA AGUIRRE², GISELLE MARTINEZ NÖEL¹, MONICA A. COSTAS¹⁺, MARIA FERNANDA RUBIO¹

¹Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, ²Nefrología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, IDIM-CONICET, Buenos Aires

Resumen Tanto la autofagia como la senescencia celular son procesos que, en principio, evitan el desarrollo tumoral impidiendo la proliferación de células dañadas. Sin embargo, la autofagia no siempre lleva a la muerte celular, sino que puede ser un mecanismo de supervivencia en condiciones de estrés. En cuanto a la senescencia, si bien las células no proliferan, producen factores de crecimiento que contribuyen a la proliferación de células vecinas. La rapamicina es un conocido inmunosupresor utilizado en pacientes con trasplantes de órganos, que inhibe la cascada de transducción de señal mTOR, principal vía que censa el estado energético y nutricional de la célula, permite la síntesis de proteínas e inhibe la autofagia cuando se encuentra activa. En este trabajo se investigó la acción de rapamicina sobre estos procesos y encontramos que a dosis bajas es capaz de inducir la senescencia de una línea celular normal y a dosis altas la autofagia en una línea celular transformada. También se determinó que el oncogén RAC3 es inhibitorio de la autofagia y su expresión es inhibida por rapamicina. Estos resultados constituyen un aporte al conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales este fármaco puede actuar, dado que actualmente se ha focalizado el interés en su aplicación a terapias anti-tumorales.

Palabras clave: rapamicina, autofagia, senescencia, mTOR

Abstract *Rapamycin effect on senescence and autophagy processes in human cell lines.* Autophagy and senescence are both processes that firstly avoid tumor development through the inhibition of proliferation of damaged cells. However, autophagy does not imply cell death, because it is also a mechanism of cell survival under stress conditions. Concerning senescence, although these cells do not proliferate, they produce growth factors that contribute to the proliferative response of other cells. Rapamycin is an immunosuppressor used in transplanted patients that inhibits the mTOR transduction signal pathway. This pathway is involved in the control of the energetic and nutritional state of the cell allowing protein synthesis and inhibiting autophagy when it is active. In this paper, the action of rapamycin over these processes was investigated and we found that a low concentration of this drug induces the senescence of a normal cell line, while a higher concentration induces autophagy of a transformed cell line. We have also determined that the oncogen RAC3 inhibits autophagy and that its expression is diminished by rapamycin. Therefore, our results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms by which this drug is effective, given the relevance of rapamycin for potential tumor therapy.

Key words: rapamycin, autophagy, senescence, mTOR

RAC3 es una molécula de 160 KDa que pertenece a la familia de coactivadores de receptores nucleares conocida como p160¹. Si bien originalmente fue descrita por su capacidad de asociarse a receptores de hormonas esteroideas, tales como el receptor de estrógenos o

progestágenos aumentando su actividad, en el año 2000 nuestro grupo demostró que es además un coactivador del factor de transcripción activado por citoquinas NF-κB contribuyendo a la proliferación celular y protegiendo de la apoptosis²⁻⁴.

La apoptosis y la senescencia preservan la salud de órganos y tejidos a través del "sacrificio" de células potencialmente peligrosas. Si bien en la apoptosis se eliminan células, es sabido que las senescentes no mueren, cambian su patrón de expresión génica, suprimiendo información genética (por heterocromatinización de ciertas zonas del genoma) y liberan factores que pueden favorecer el crecimiento y diferenciación de células vecinas^{5, 6}. La senescencia puede ocurrir por dos mecanismos: acortamiento de telómeros o acumulación

Recibido: 22-XII-2010

Aceptado: 18-IV-2011

*Ambos autores comparten primera autoría

⁺Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Dirección postal: Dra. Mónica A. Costas, Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM-CONICET, Combatientes de Malvinas 3150, 1427, Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4523-8947 e-mail: mcostas@lanari.fmed.uba.ar

de daños genómicos a lo largo del tiempo. Es un proceso que acompaña al envejecimiento del individuo⁶.

Existe otro mecanismo por el cual se sacrifican organelas de la célula para preservarla y que es conocido como autofagia. Si bien es un mecanismo de supervivencia y contribuye a preservar células sanas en condiciones de estrés celular, ha cobrado gran relevancia en la regulación del desarrollo y progresión tumoral. Se sabe que puede actuar como un supresor de tumores en las etapas tempranas⁷, mientras que puede promover la resistencia a drogas quimioterapéuticas y el desarrollo tumoral en etapas tardías⁹⁻¹⁰.

La vía mTOR, principal vía que censa el estado energético y nutricional de la célula, permite la síntesis de proteínas e inhibe la autofagia cuando se encuentra activa. También existen evidencias que la acción hipertrófica de esta vía promueve a largo plazo el ingreso a senescencia¹¹. Esta vía de señalización suele estar hiperactivada en células tumorales¹². Una de las principales drogas utilizadas como inmunosupresor y en el tratamiento oncológico, la rapamicina, justamente tiene como blanco la inhibición de la vía mTOR, y es un potente inductor de la autofagia¹³.

En cuanto a la senescencia, existen trabajos recientes en los que se ha demostrado que en condiciones de alta expresión de genes supresores de ciclo celular como p21 o p16 que inducen senescencia, la inhibición de la vía mTOR por rapamicina tiene un rol protector, evitando el arresto irreversible del ciclo¹⁴. Sin embargo, se desconoce cuál es su rol en este proceso en ausencia de factores inductores de senescencia.

Dada la importancia de la vía mTOR en el control de procesos que involucran desarrollo tumoral, y resultados previos del laboratorio respecto del rol anti-apoptótico

de RAC3²⁻⁴ y su acción protumoral¹⁵, en este trabajo se investigó el rol de RAC3 y rapamicina en la autofagia y senescencia.

Dado que RAC3 se encuentra en altos niveles en células tumorales y que no siempre se debe a amplificación génica, en este trabajo se investigó si la inhibición de la vía mTOR puede modificar los niveles de RAC3.

El modelo de estudio fueron líneas celulares humanas no tumorales con cantidades limitantes de coactivador.

Para determinar los efectos de la inhibición de la vía mTOR sobre la senescencia celular se utilizó la línea celular de fibroblastos pulmonares fetales humanos WI38, que no está transformada y tiene la capacidad de envejecer en cultivo a través de los sucesivos pasajes.

Para estos experimentos se utilizó un pasaje joven de la línea sobre la cual se estudió el efecto de distintas dosis de rapamicina. Como puede observarse en la Fig. 1, rapamicina en la dosis de 50 nM induce la senescencia prematura de esta línea celular según fue determinado por la aparición de núcleos grandes con focos heterocromáticos (Fig. 1A) o la aparición de células positivas para la actividad β -galactosidasa ácida (Fig. 1B), ambos a 3 días post tratamiento y típicos marcadores de senescencia¹⁵.

De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con rapamicina en ausencia de otras señales inductoras de arresto celular o promotoras de proliferación induce la senescencia celular.

Para los experimentos de autofagia se trabajó con la línea de riñón embrionario humano HEK293, con niveles limitantes del coactivador, o bien las mismas células en las cuales se aumentaron los niveles de RAC3 por transfección con un vector (plásmido) llevando este gen bajo el control de un promotor de expresión constitutiva. Dichas células se incubaron con 0.5 μ M de rapamicina

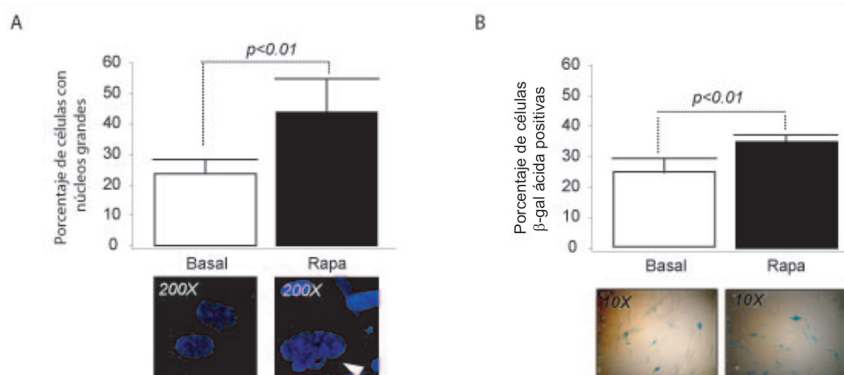


Fig. 1.— Senescencia inducida por rapamicina. Células de la línea Wi38 fueron incubadas con rapamicina (Rapa) 50nM o con medio completo (Basal) durante 72 horas. A) Porcentaje de células con núcleos grandes, observados por tinción de núcleos con Hoechst. Las fotos (aumento 200X) muestran núcleos normales con el tratamiento basal, y un núcleo grande (flecha negra) con el tratamiento de rapamicina. B) Porcentaje de células β -gal ácida positiva, observada por el ensayo de β -gal ácida, al microscopio (campo claro), y cuantificadas sobre un total de 200 células. Las fotos (aumento 10X) muestran las células positivas, en condiciones basales o con el tratamiento con rapamicina. En A y B, las barras corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm SD. Test de Tukey.

durante 24 h, o bien en condiciones de ayuno (medio de cultivo pobre, carente de suero) durante 6 h como control positivo de autofagia.

Con el objeto de detectar la formación de autofagosomas, las células fueron tratadas con monodancyl cadaverina (MDC) y observadas en un microscopio de fluorescencia. Las células con autofagia fueron cuantificadas sobre un total de 200 células. Para descartar que estas condiciones induzcan apoptosis, las células fueron marcadas con Hoechst y observadas en el microscopio de fluorescencia para analizar la morfología nuclear.

En presencia de rapamicina, se observó la inducción de autofagosomas en niveles similares a los observados en condiciones de ayuno de 6 h. En ambos casos, las células transfectadas con vector de expresión para RAC3 mostraron una inhibición significativa de la autofagia respecto de células transfectadas sólo con vector vacío (Fig. 2A). No se observó apoptosis en las células transfectadas cuando fueron incubadas con rapamicina (datos no mostrados). Estos resultados fueron confirmados mediante la cotransfección con un plásmido que expresa RFP-LC3 que permite la visualización específica de autofagosomas (no mostrado).

La Fig. 2B muestra que estos resultados tienen coherencia con los efectos de sobreexpresión de RAC3 en la acción antiproliferativa de rapamicina sobre esta línea celular a las 48 h de tratamiento.

De acuerdo con estos resultados puede concluirse que RAC3 tiene un rol inhibitorio de la autofagia inducida por ayuno, así como por inhibición directa de la vía mTOR y contrarresta la acción inhibitoria de la proliferación de rapamicina.

Dada la acción antagónica de rapamicina y RAC3 en cuanto a inducción de autofagia y el hecho de que aún se desconocen las señales que controlan la expresión de este coactivador, se investigó si la inhibición de la vía mTOR tenía algún efecto sobre los niveles de expresión de RAC3.

En estos experimentos se trabajó con ambas líneas celulares y distintas dosis de rapamicina (50-100 y 500 nM) y se analizaron los niveles de expresión de RAC3 por *Western Blot*.

La Fig. 2C muestra que el tratamiento con este fármaco en la dosis de 50 nM produce una disminución significativa de los niveles proteicos de RAC3 en las células WI38 respecto de controles sin rapamicina a 1, 3 y 6 días post

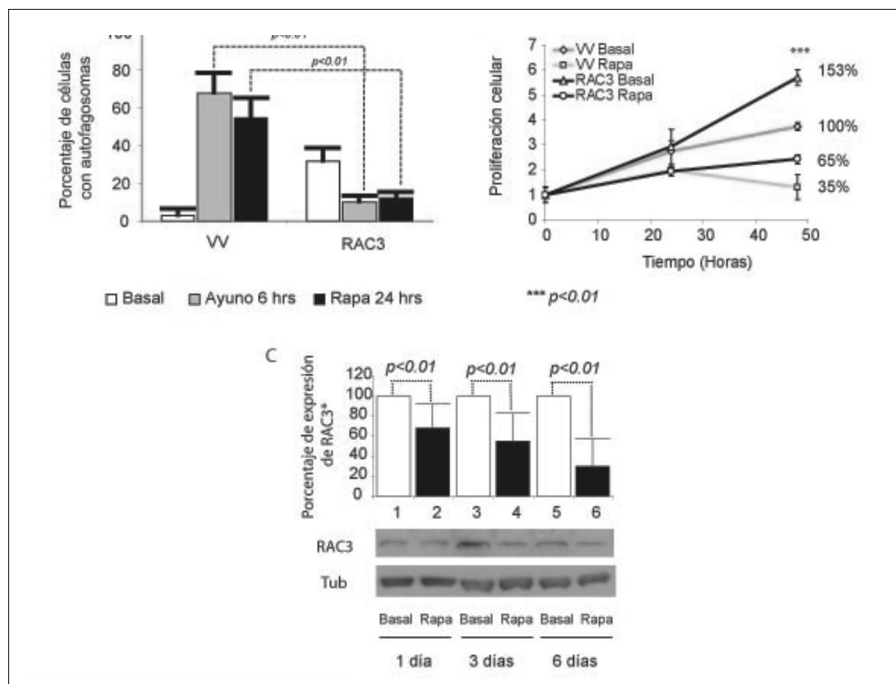


Fig. 2.- Rol de RAC3 sobre la acción de la rapamicina. A) Células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión de RAC3 o vector vacío como control, fueron incubadas con rapamicina 0.5 µM, con medio EBSS (ayuno) o con medio completo. Las barras muestran el porcentaje de células con autofagosomas observadas con tinción de monodansyl cadaverina (MDC). Las células fueron observadas por microscopía de fluorescencia y cuantificadas sobre un total de 200 células. B) Ensayo de proliferación (cristal violeta) a las 24 y 48 horas de tratamiento con rapamicina 0,5 µM. ****p* < 0.01 entre los 4 tratamientos a las 48h. C) Niveles de RAC3 medidos por *Western Blot* en células Wi38 incubadas con rapamicina 50 nM al día 1, 3 y 6; *relativizados al 100% del basal. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes ± SD.

tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos en las células HEK293, confirmados por el uso de PCR en tiempo real, en las que se observa una disminución de los niveles de RNAm de RAC3 por rapamicina (no mostrados), demostrando que la vía mTOR contribuye a la transcripción del gen codificante para RAC3.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la vía mTOR desempeña un rol importante en la determinación del destino de la célula, pudiendo contribuir a su transformación hacia un fenotipo senescente, así como tumoral.

Es interesante considerar que la adquisición de un fenotipo senescente, si bien tiene un rol anti-cáncer evitando la proliferación de células con daños genómicos, también contribuye al desarrollo tumoral a través de la producción de factores de crecimiento y citoquinas⁵.

De acuerdo con trabajos recientes realizados en gusanos, levaduras y ratones, la rapamicina es considerada un factor *anti-age*¹⁴. Sin embargo, en todos estos modelos se considera la supervivencia de los individuos y no, precisamente, la senescencia celular y en los casos en que se estudia, solo se considera su acción frente a otras señales inductoras de senescencia¹⁴.

Una de las razones por la cual este fármaco podría contribuir a una prolongación de la vida es el hecho ya conocido que la inhibición de una alta tasa metabólica y proliferativa, expresado en términos más simples: un enlentecimiento del ciclo celular, prolonga la vida de la célula, dado que se acumularían menos desechos metabólicos y oxidantes que puedan dañar el genoma, a la vez que se retrasa el acortamiento de telómeros en cada ciclo⁶.

A pesar de estas interpretaciones y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, es importante considerar que, al menos en una línea celular normal, la rapamicina en las dosis utilizadas puede inducir senescencia.

Existen evidencias de que la rapamicina puede inducir autofagia y nuestros resultados también lo demuestran. Si bien en este proceso se reciclan organelas de la célula para preservar su vida, también es un proceso que puede llevar a la muerte celular, conocida como muerte tipo II, a diferencia de la apoptosis llamada de tipo I¹⁶.

RAC3 es una proteína que se encuentra en alto título en células tumorales y en pocas ocasiones debido a una amplificación génica. Hasta el presente se desconocen los mecanismos y señales que disparan su sobreexpresión en tumores. De acuerdo con nuestros resultados, la vía mTOR estaría contribuyendo al aumento de la transcripción de su gen codificante, y tomando en consideración que existen mutaciones para esta cascada de señalización en tumores es posible que una hiperestimulación de esta vía contribuya al aumento de RAC3.

La inhibición de la expresión de RAC3 y la consecuente disminución de la proliferación celular sería uno de los

mecanismos por los cuales la rapamicina ejercería un rol anti-tumoral.

Si bien no existen dudas que RAC3 es un oncogen¹⁵, nuestros resultados en cuanto al rol inhibitorio de la autofagia de esta molécula resultan particularmente interesantes. Como ya se mencionó, este proceso puede inhibir el desarrollo tumoral llevando a la muerte de células dañadas, pero también es sabido que contribuye a preservar a las células tumorales en los estadios más avanzados, en el centro del tumor, bajo condiciones adversas por falta de nutrientes e hipoxia, previo a la angiogénesis⁹. De acuerdo con nuestras observaciones, siendo RAC3 un factor anti-autofágico, la disminución de sus niveles por rapamicina podría ser uno de los mecanismos por los cuales este fármaco contribuye a inducir autofagia.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este trabajo y la experiencia de otros en el uso de la rapamicina surge como interrogante si efectivamente es, o no, una droga anti-tumoral y anti-edad. Probablemente debemos primero responder si la autofagia es un mecanismo anti-tumoral, si la senescencia también lo es y hasta qué punto contribuye al envejecimiento del individuo. Es sabido que con la edad aumenta el número de células senescentes en los tejidos, debido a los daños genómicos acumulados en años⁵. Tal vez, todos los procesos que determinan el destino: vida, muerte o transformación de la célula tengan un rol dual, tanto benéfico como nocivo para la salud del individuo, y deban funcionar de modo controlado de acuerdo a condiciones fisiológicas determinadas. De hecho, los procesos de apoptosis, senescencia y autofagia son todos mutuamente excluyentes: una célula senescente o en autofagia, por ejemplo, es incapaz de ingresar en apoptosis¹⁷.

Como conclusión, los efectos benéficos del uso de rapamicina, que primariamente es un inmunosupresor, así como sus aplicaciones futuras, deben considerarse de acuerdo a la enfermedad particular y teniendo en cuenta que no siempre prolongar la vida significa mayor salud.

Agradecimientos: El trabajo ha sido desarrollado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés respecto de los contenidos de este trabajo.

Bibliografía

1. Anzick S, Kononen J, Walker R, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997; 277: 965-8.
2. Werbajh S, Nojek I, Lanz R, Costas MA. RAC-3 is a NF-kB coactivator. *Febs Letters* 2000; 485: 195-9.
3. Colo GP, Rubio MF, Alvarado CV, Costas MA. El coactivador de receptores nucleares RAC3 tiene un rol protector de la apoptosis inducida por distintos estímulos. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67: 465-8.
4. Colo GP, Rubio MF, Nojek IM, et al. The p160 nuclear

- receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action. *Oncogene* 2008; 27: 2430-44.
5. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005; 120: 513-22.
 6. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223-33.
 7. Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett* 2009; 278: 130-8.
 8. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, et al. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr Mol Med* 2008; 8: 78-91.
 9. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 2006; 66: 9349-51.
 10. Song J, Qu Z, Guo X, et al. Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells. *Autophagy* 2009; 5: 1131-44.
 11. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124: 471-84.
 12. Hynes NE, Boulay A. The mTOR pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006; 11: 53-61.
 13. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; 36: 585-95.
 14. Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, et al. Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle* 2009; 8: 1888-95.
 15. Yan J, Tsai SY, Tsai MJ. SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 387-94.
 16. Liu JJ, Lin M, Yu JY, Liu B, Bao JK. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett*; 300: 105-14.
 17. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. *Gerontology* 2008; 54: 92-9.

L'expérience fondamentale sous-jacente au doute cartésien était la découverte que la terre, contrairement à toute expérience sensible immédiate, tournait autour du soleil. L'époque moderne a commencé quand l'homme, avec l'aide du télescope, tourna ces yeux corporels vers l'univers, sur lequel il avait spéculé pendant longtemps [...] et apprit que ces sens n'étaient pas ajustés à l'univers, que son expérience quotidienne [...] était une source constante d'erreur et d'illusion.

Après cette désillusion [...] la conséquence la plus immédiate fut l'essor spectaculaire de la science de la nature, que [...] sembla être libérée par la découverte que nos sens ne disent pas la vérité. Désormais convaincue de [...] l'insuffisance de la simple observation, les sciences de la nature se tournèrent vers l'expérience qui, en intervenant directement sur la nature, assura ce développement dont la progression a depuis lors semblé sans limites.

La experiencia fundamental subyacente a la duda cartesiana fue el descubrimiento de que la tierra giraba alrededor del sol, contrariamente a toda experiencia sensible inmediata. La época moderna comenzó cuando el hombre, con la ayuda del telescopio tornó sus ojos corporales hacia el universo, sobre el que había especulado tanto tiempo [...] y aprendió que sus sentidos no estaban ajustados al universo, que su experiencia cotidiana [...] era una fuente constante de error y de ilusión.

Después de esta desilusión [...] la consecuencia más inmediata fue el desarrollo espectacular de la ciencia de la naturaleza, que pareció liberarse por el descubrimiento de que nuestros sentidos no dicen la verdad. Desde ahí, con el convencimiento de la insuficiencia de la simple observación, las ciencias de la naturaleza se tornaron hacia la experiencia que, interviniendo directamente sobre la naturaleza, aseguró ese desarrollo cuya progresión —desde entonces— parece ilimitada.

Hanna Arendt (1906-1975)

La crise de la culture. Paris: Gallimard, 2009, p 75