

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN .....	2
1.1.	ASPECTOS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS .....	2
1.1.1.	EL SISTEMA UBICUITINA-PROTEASOMAS .....	7
1.1.2.	MACROAUTOFAGIA .....	13
1.2.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA .....	16
1.2.1.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR NUTRIENTES .....	16
1.2.2.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA.....	18
1.2.2.1.	Regulación de la autofagia por glucosa en levaduras.....	18
1.2.2.2.	Regulación de la autofagia por glucosa en células de mamífero .....	20
1.3.	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA .....	22
1.3.1.	AUTOFAGIA DEPENDIENTE DE ENERGÍA.....	23
1.3.1.1.	AMPK/mTORC1.....	23
1.3.1.2.	p53 .....	25
1.3.1.3.	p27Kip1 .....	26
1.3.2.	VÍAS DEPENDIENTES DEL ESTRÉS OXIDATIVO .....	27
1.3.2.1.	JNK .....	29
1.3.2.2.	ERK .....	29
1.3.2.3.	p38 .....	30
1.3.3.	OTRAS VÍAS.....	30
1.3.3.1.	IKK/NF- $\kappa$ B .....	30
1.3.3.2.	Sirtuína1 Y FoxO.....	32
1.4.	IMPLICACIONES PATOLÓGICAS DE LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA .....	32
1.5.	CONCLUSIÓN .....	34
2.	OBJETIVOS .....	38
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1.	MATERIALES .....	42
3.1.1.	LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO .....	42
3.1.2.	REACTIVOS.....	43
3.1.2.1.	Compuestos químicos.....	43
3.1.2.2.	Inhibidores .....	44

3.1.2.3.	Anticuerpos .....	44
3.1.3.	TAMPONES Y OTRAS SOLUCIONES .....	44
3.2.	METODOLOGÍA .....	45
3.2.1.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	45
3.2.1.1.	Obtención de extractos celulares .....	45
3.2.1.2.	Cuantificación de la concentración de proteína.....	46
3.2.1.3.	SDS-PAGE, transferencia electroforética e inmunodetección en membrana ("Western-blot") .....	46
3.2.2.	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE AUTOFAGIA .....	47
3.2.2.1.	Cuantificación de vacuolas autofágicas por microscopia electrónica .....	47
3.2.2.2.	Análisis de la actividad autofágica con el marcador GFP-LC3 .....	48
3.2.2.3.	Cuantificación de la degradación de proteínas mediante experimentos de pulso y caza.....	49
3.2.2.4.	Medida de la masa lisosomal .....	50
3.2.2.5.	Análisis de los niveles celulares de LC3-II.....	50
3.2.3.	ESTUDIO DE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS.....	51
3.2.3.1.	Niveles de proteína poliubiquitinadas.....	51
3.2.3.2.	Medida de la actividad de los proteasomas.....	51
3.2.4.	SILENCIAMIENTO DE LA MAPK p38 MEDIANTE RNAs DE INTERFERENCIA .....	52
3.2.5.	INMUNOFLUORESCENCIA .....	52
3.2.6.	MEDIDA DE LOS NIVELES DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	53
3.2.7.	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ATP INTRACELULAR.....	54
3.2.8.	MEDIDA DE LOS NIVELES DE CALCIO .....	54
3.2.9.	CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	55
3.2.10.	ESTADÍSTICA Y OTRAS HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS .....	56
4.	RESULTADOS.....	60
4.1.	LA GLUCOSA INDUCE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS .....	60
4.1.1.	LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA .....	61
4.1.2.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS.....	68
4.2.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA ES UN EFECTO GENERAL PARA DIFERENTES TIPOS CELULARES Y SU INTENSIDAD PUEDE MODULARSE POR OTROS FACTORES .....	71
4.3.	ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADOS POR GLUCOSA .....	76
4.3.1.	LA GLUCOSA REDUCE LOS NIVELES DE ROS EN EL MEDIO DE KREBS-HENSELEIT ...	77

4.3.2.	LA GLUCOSA NO EJERCE NINGÚN PAPEL EN LA INDUCCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR POR LA AUTOFAGIA .....	78
4.3.3.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA DEPENDE DEL ATP PRODUCIDO .....	81
4.3.3.1.	La glucosa produce un incremento de los niveles de ATP en las células incubadas en medio de Krebs-Henseleit con glucosa respecto el mismo medio sin glucosa.....	81
4.3.3.2.	La energía procedente de la glucosa induce la autofagia .....	82
4.4.	POSIBLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA .....	85
4.4.1.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE AMPK EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA .....	86
4.4.2.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE LA QUINASA mTORC1 EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA .....	89
4.4.3.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA.....	92
4.5.	PAPEL DE LA QUINASA p38 EN LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR GLUCOSA .....	94
4.5.1.	p38 ES ACTIVADA EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA .....	95
4.5.2.	LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA DEPENDE DE LA ACTIVIDAD DE LA MAPK p38 .....	98
5.	DISCUSIÓN.....	107
5.1.	REGULACIÓN DE LA PROTEÓLISIS INTRACELULAR POR GLUCOSA .....	107
5.1.1.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA AUTOFÁGICA.....	108
5.1.2.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS.....	114
5.2.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA REQUIERE EN PARTE EL ATP PRODUCIDO A PARTIR DE SU METABOLISMO .....	118
5.3.	LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE AMPK y mTORC1 .....	121
5.4.	LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA POR UNA VÍA DPEDIENTE DE p38 .....	123
6.	CONCLUSIONES.....	129
7.	ANEXOS .....	133
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	139