

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Estudio de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Carla López Alegre
TUTORA: Prof. Dra. Lynne Yenush
COTUTORA: Dra. Eva Pérez Jiménez

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 28 de Noviembre 2014



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIERIA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO RURAL**

**Ficha resumen del
Trabajo Fin de Grado**

Datos personales:

Nombre y apellidos: Carla López Alegre

Datos del Trabajo Fin de Grado:

Título del TFG:	"Estudio de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa"	
Lugar de realización:	CIPF – Centro de Investigación Príncipe Felipe	
Titulación:	Grado en Biotecnología	
Cotutora externa:	Dra. Eva Pérez Jiménez	Lugar y fecha: Valencia,
Tutor/a académico:	Prof. Dra. Lynne Yenush	Noviembre 2014

Resumen

La degradación intracelular de proteínas es un proceso catabólico clave para la supervivencia celular frente a cambios ambientales. Este proceso degradativo tiene como función principal la eliminación de proteínas mal plegadas, que pueden ser tóxicas al acumularse, o la eliminación de proteínas que no son útiles en ciertas situaciones, para conseguir una rápida adaptación al medio. Los productos de esta degradación son los aminoácidos, que serán utilizados para la síntesis de nuevas proteínas o para la obtención de energía. Existen dos vías de degradación intracelular de proteínas: la vía independiente y la vía dependiente de lisosomas. Dentro de esta última, uno de los principales mecanismos es la macroautofagia (denominada comúnmente autofagia para simplificar), que consiste en la formación de unas estructuras de doble membrana que se cierran secuestrando material citoplasmático, denominadas autofagosomas, que posteriormente se fusionan con endosomas y lisosomas dando lugar a los autolisosomas, cuyas enzimas lisosomales degradarán el contenido de los mismos.

La autofagia es un proceso altamente regulado. Por ejemplo, la privación de nutrientes, como los aminoácidos, induce autofagia, que proporciona los requerimientos necesarios para la supervivencia de la célula. Por el contrario, la presencia de aminoácidos en el medio inhibe la autofagia. Sin embargo la glucosa, siendo otro nutriente, regula de manera opuesta el proceso. Se ha demostrado que la administración de glucosa a células de mamífero tras un periodo de ayuno induce autofagia, de forma independiente de mTOR y AMPK, que son un sensor nutricional y energético respectivamente, y dependiente de p38 MAPK. La translocación al núcleo de esta quinasa en presencia de glucosa sugiere un papel regulador de la expresión génica.

El objetivo de este trabajo es determinar los genes regulados por p38 MAPK implicados en la inducción de autofagia en presencia de glucosa. Para ello, a partir de los datos de un PCR array donde se compararon células MEFs $p38^{+/+}$ y $p38^{-/-}$ en presencia y ausencia de glucosa, seleccionamos cuatro genes candidatos: *Rgs19*, *Bcl2*, *Ifna4* y *Akt1*. Analizamos el perfil de expresión de cada uno de ellos mediante qPCR en células HEK293T y NIH/3T3, en presencia y

ausencia de glucosa. No observamos diferencias en la expresión de *BCL2* y *AKT1*, mientras que la expresión de *RGS19* disminuyó en presencia de glucosa, aunque estas mismas diferencias se mantenían al inhibir p38 MAPK, poniendo de manifiesto una expresión independiente de la misma. Teniendo en cuenta estos resultados, no podemos relacionar estos genes con la regulación de la autofagia por glucosa mediada por p38 MAPK. La expresión de *IFNA4* aumentó de manera significativa en presencia de glucosa únicamente cuando p38 MAPK estaba inhibida, por lo que no podemos relacionar *IFNA4* con la inducción de autofagia, aunque sí destacar una posible regulación entre la quinasa y el interferón que actúa de manera independiente al proceso autofágico.

Por otro lado, analizamos los posibles mecanismos implicados en la activación de p38 MAPK. Nuestros resultados muestran que existe un aumento de estrés de retículo en presencia de glucosa, que correlaciona con la activación de p38.

Palabras clave:

Autofagia, glucosa, p38 MAPK, transcripción, estrés de retículo.

Abstract

Protein degradation is a key catabolic process for cell survival in response to environmental changes. The main function of protein degradation is the removal of unfolded protein, which accumulation may be toxic, or useless proteins, providing a quickly environmental adaptation. The products of that degradation are amino acids that are reused for the synthesis of new proteins or are metabolized for energy obtaining. There are two protein degradation mechanisms: lysosomal-dependent pathway and lysosomal-independent pathway. One of the main mechanisms in the lysosomal dependent pathway is macroautophagy (called autophagy here after to simplify). Autophagy consists in formation of a double membrane that will close sequestering cytoplasmic portions. These double membrane structures, called autophagosomes, will ultimately fuse with endosomes and lysosomes forming autolysosomes. Lysosomal enzymes, which contain autolysosomes, will degrade the engulfed material.

Autophagy is a highly regulated process. Upon nutrient deprivation, such as amino acids, autophagy is induced to provide necessary requirements to cell survival. On the other hand, presence of amino acids suppresses autophagy. However, glucose, that is other nutrient, regulates the process in an opposite way. It has been demonstrated that addition of glucose to mammalian cells after a starvation period induces autophagy. This induction, surprisingly, is mTOR and AMPK-independent and p38 MAPK-dependent. p38 MAPK translocates to the nucleus in the presence of glucose suggesting a role in the regulation of gene expression.

The main objective of this work is to determine p38 MAPK regulated-genes that may be implicated in autophagy induction by glucose. To this end, we analysed a PCR Array data where MEFs cells *p38^{+/+}* and *p38^{-/-}* in the presence or absence of glucose were compared, and we selected four candidate genes: *Rgs19*, *Bcl2*, *Ifna4* y *Akt1*. Then, we study their expression pattern by qPCR experiments in NIH/3T3 and HEK293T cells, in presence or absence of glucose. No changes were observed in *BCL2* and *AKT1* expression, whereas *RGS19* expression decreased in presence of glucose, maintaining these differences in expression when p38 MAPK was inhibited. These data suggest a p38 MAPK independent expression of *RGS19*. Based on the aforementioned results, *IFNA4* expression significantly increased in presence of glucose only when p38 MAPK was inhibited, so it is not possible to connect *IFNA4* and autophagy induction. However, it should be pointed out that there is a

possible regulation between IFNA4 and kinase p38, independently on its role in autophagy.

Furthermore, we analysed possible mechanisms implicated in p38 MAPK activation. Our results show an increase in reticulum endoplasmic stress in presence of glucose, correlating with activated p38.

Key words:

Autophagy, glucose, p38 MAPK, transcription, reticulum stress.

Índice

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1-8
1.1. Degradación intracelular de proteínas: aspectos generales	1
1.1.1 Macroautofagia	3
1.2. Regulación de la autofagia	5
1.2.1. Regulación de la autofagia por glucosa	6
1.2.2. p38 MAPK	7
1.3. Implicaciones patológicas de la regulación de la autofagia por glucosa	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10-18
3.1. Materiales	10
3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo	10
3.1.2. Reactivos	10
3.1.2.1 Inhibidores	10
3.1.2.2. Anticuerpos	11
3.1.3. Tampones y otras soluciones	12
3.2. Métodos	13
3.2.1. Inmunodetección de proteínas	13
3.2.1.1. Obtención de extractos celulares	13
3.2.1.2. Cuantificación de la concentración de proteína	13
3.2.1.3. SDS-PAGE, transferencia electroforética e inmunodetección en membrana (“Western-blot”)	14
3.2.2. Cuantificación de los niveles del mRNA	15
3.2.2.1. Extracción de RNA mediante TRizol	15
3.2.2.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	15
3.2.2.2.1. Curva estándar para la optimización de los oligos	17
3.2.3. Análisis estadístico y otras herramientas informáticas	18
4. RESULTADOS	19-31
4.1. Análisis de los resultados obtenidos en el PCR Array para la selección de genes candidatos reguladores de la autofagia por glucosa	19
4.2. Estudio de la expresión del mRNA de los posibles genes candidatos reguladores de la autofagia por glucosa	22
4.2.1. Análisis de LC3-II para determinar los niveles de autofagia	24
4.2.2. Análisis de las diferencias relativas de expresión de los genes candidatos	25
4.3. Estudio de los mecanismos que activan la proteína p38 MAPK	30
5. DISCUSIÓN	32-33
6. CONCLUSIONES	34
7. BIBLIOGRAFÍA	35-39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos lisosomales de degradación intracelular de proteínas	2
Figura 2. Sistemas de conjugación de LC3 a la membrana del autofagosoma	5
Figura 3. La autofagia es inducida por glucosa mediante la quinasa p38 MAPK	25
Figura 4. Expresión relativa del gen <i>IFNA4</i> en células HEK293T	26
Figura 5. Expresión relativa del gen <i>RGS19</i> en células NIH/3T3	27
Figura 6. Expresión relativa del gen <i>RGS19</i> en células HEK293T	28
Figura 7. Expresión relativa del gen <i>BCL2</i> en células NIH/3T3	28
Figura 8. Expresión relativa del gen <i>AKT1</i> en células NIH/3T3	29
Figura 9. Expresión relativa del gen <i>AKT1</i> en células HEK293T	30
Figura 10. La inducción de la autofagia por glucosa aumenta los niveles de CHOP y activa la señalización UPR	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inhibidores empleados y sus dianas de actuación	11
Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados clasificados en función de la proteína que reconocen	11
Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados	12
Tabla 4. Componentes empleados en la reacción de PCR cuantitativa	16
Tabla 5. Fases y características de la reacción de PCR cuantitativa	17
Tabla 6. Tipos celulares, condiciones y combinaciones evaluadas en el PCR Array	19
Tabla 7. Resultados esperados en el perfil de expresión de los posibles genes candidatos de la regulación de la autofagia por glucosa	20
Tabla 8. Genes seleccionados, posibles candidatos de la regulación de la autofagia por glucosa vía p38 MAPK, y los resultados de sus perfiles de expresión obtenidos en el PCR Array	21
Tabla 9. Pendiente y coeficiente de correlación de la curva estándar obtenida para cada gen candidato y para el gen endógeno en cada uno de los organismos	24

LISTADO DE ABREVIATURAS:

ACTB	Gen actina-beta
AKT	Proteína quinasa B (PKB)
AMP	Adenosin monofosfato
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATF-2	Factor de transcripción activador 2
Atg	Proteína relacionada con la autofagia (“Autophagy related genes”)
ATP	Adenosín trifosfato
BCL	Linfoma de célula B
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementario del mRNA
CHOP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CREB	Elemento de unión de la respuesta al AMP cíclico
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido dexosirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dsDNA	DNA de doble cadena
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FIP200	Proteína de 200 kDa que interactúa con la familia de las quinasas de adhesión focal
FOXO	“Forkhead box” clase O
GAP	Proteína activadora de GTPasas
GDP	Difosfato de Guanosina o Guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina o Guanosina-5'-trifosfato
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
HT-29	Células de adenocarcinoma de colón (<i>Homo sapiens</i>)
IFNA4	Interferón alpha-4
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
LKB1	Quinasa hepática B1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEF	Fibroblasto embrionarios murinos

mLST8	Proteína letal en mamíferos SEC13 -8
mRNA	RNA mensajero
MSK	Proteína quinasa activada por estrés y mitógeno
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
p38	Proteína quinasa activada por mitógeno 38
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	Estructura preautofagosomal
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PRAS40	Proteína de 40 kDa rica en prolina, sustrato de AKT
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RAPTOR	Proteína reguladora asociada a TOR
RE	Retículo endoplasmático
RGS	Proteína reguladora de la señalización de proteínas G
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
siRNA	RNA de interferencia
SQSTM1	Secuestrosoma 1 o Proteína p62
TBS	Tampón Tris salino
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
ULK	Quinasa 1 tipo Unc 51
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
V-ATPasa	ATPasa vacuolar
WIPI1	Efectores fosfolípidicos con dominios WD de la superficie del autofagosoma

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Degradación intracelular de proteínas: aspectos generales

Para el mantenimiento de la homeostasis celular debe existir un equilibrio entre el abastecimiento y la demanda de metabolitos, donde juegan un importante papel los procesos anabólicos y catabólicos. Debido a que ambas reacciones catabólicas y anabólicas son las responsables del metabolismo celular, es esencial equilibrarlas para asegurar el desarrollo y crecimiento celular y, por tanto, la supervivencia de las mismas.

Uno de los procesos catabólicos que ocurren en las células es la degradación intracelular de proteínas, en el que se produce la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas mediada por diversas proteasas presentes en las células y siendo la consecuencia directa de este proceso la obtención de las unidades básicas que forman las proteínas, los aminoácidos. Los aminoácidos libres obtenidos tras la proteólisis son utilizados para la síntesis de nuevas proteínas y de compuestos nitrogenados no proteicos, para la producción de energía mediante reacciones catabólicas, o como efectores fisiológicos. La proteólisis celular cumple varias funciones al degradar las proteínas a aminoácidos. En primer lugar, degrada proteínas mal plegadas que no son funcionales y que podrían ser tóxicas para las células o estar involucradas en diferentes patologías como Parkinson (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2012), Alzheimer (Ihara *et al.*, 2012) o Huntington (Godin *et al.*, 2010). En segundo lugar, permite la correcta y rápida adaptación de las células a las nuevas condiciones ambientales degradando las proteínas que no son necesarias. En este punto, la proteólisis juega un importante papel ante condiciones adversas (como la privación de nutrientes), en las que la célula tiene como único objetivo su supervivencia y por tanto necesitará prescindir de ciertas proteínas para obtener aminoácidos que utilizará como fuente de energía o para sintetizar nuevas proteínas esenciales para esa nueva situación.

La proteólisis intracelular es un proceso que consume energía ya que la hidrólisis de los enlaces peptídicos requiere ATP y se trata de un proceso específico puesto que necesita seleccionar las proteínas a degradar. La velocidad de degradación se puede expresar en términos de vida media, definiéndose la vida media como el tiempo requerido para que la mitad de las proteínas originarias sean degradadas. De este modo, la vida media de las distintas proteínas intracelulares varía desde apenas unos minutos en las enzimas reguladoras y hormonas, hasta días o incluso años en las proteínas estructurales, como el colágeno. La degradación proteica es un proceso altamente regulado, interviniendo en el mismo diferentes vías de señalización, para permitir esa variación de la vida media en una misma proteína según la situación ambiental a la que se enfrente.

Existen dos principales vías de degradación intracelular de proteínas que se pueden clasificar en función de si están o no implicados los lisosomas: la vía dependiente de lisosomas o autofagia, en la que intervienen los lisosomas y endosomas; y la vía independiente, en la que participa el sistema ubiquitina-proteasoma, cuya función es fundamental en la regulación de proteínas de vida media corta. Existen otros mecanismos

no lisosomales que participan en la degradación proteica, como las calpaínas, que se activan por el catión calcio, y las caspasas, principalmente involucradas en procesos apoptóticos.

El sistema ubiquitina-proteasoma es un complejo de enzimas proteolíticas que se encarga de reconocer y degradar proteínas que han sido marcadas previamente con ubiquitina, una proteína globular altamente conservada de 76 aminoácidos y 8,5 kDa. La ubiquitina se une covalentemente a su sustrato mediante un complejo de conjugación en el que intervienen tres enzimas: E1, enzima activadora de ubiquitina; E2, enzima conjugadora; y E3, ubiquitina ligasa (Hershko & Ciechanover, 1998). Una vez marcada la proteína para su degradación, se dirige a los proteasomas, que se localizan tanto en el citosol como en el núcleo (Palmer *et al.*, 1996).

La degradación mediada por lisosomas puede subdividirse en tres tipos (Figura 1): macroautofagia (ver apartado 1.1.1.), microautofagia, donde el material citoplasmático a degradar es secuestrado por invaginaciones de la membrana lisosomal, y autofagia mediada por chaperonas, en la que tiene lugar la degradación específica de proteínas que poseen la secuencia relacionada al pentapéptido KFERQ (Majeski y Dice, 2004).

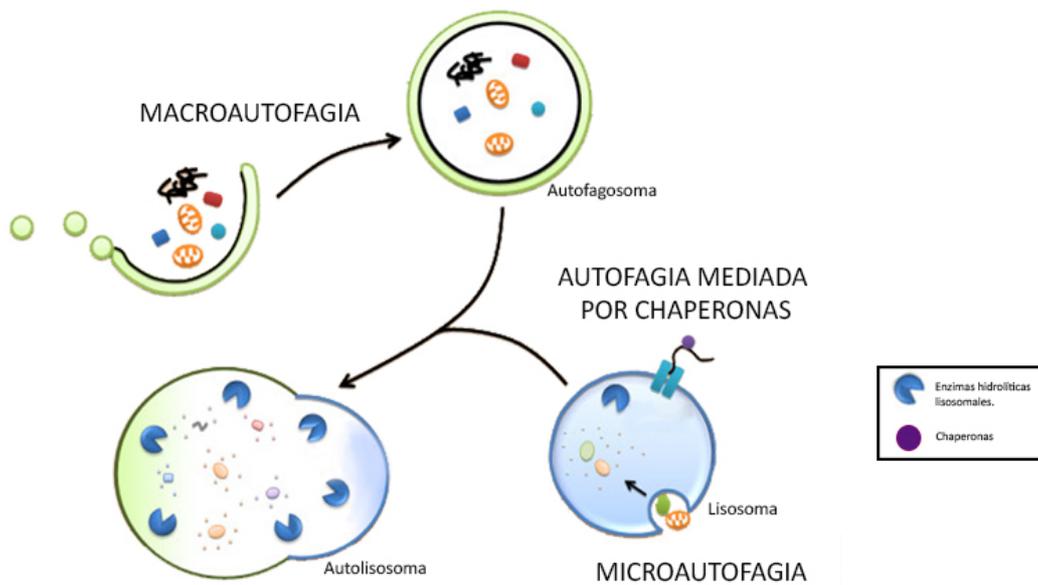


Figura 1. Mecanismos lisosomales de degradación intracelular de proteínas.

La macroautofagia es el principal proceso degradativo mediante lisosomas, en el que tiene lugar la formación de distintas estructuras membranosas (fagoforo, autofagosoma y autolisosoma) que se fusionarán con lisosomas y endosomas para degradar los componentes celulares secuestrados por las mismas. Además, existen otros mecanismos degradativos en los que participan los lisosomas, como son la microautofagia o la autofagia mediada por chaperonas (Modificado de Cheung *et al.*, 2009).

Los lisosomas se pueden definir como un grupo heterogéneo de vacuolas de diferente tamaño, forma y densidad, que contienen numerosas peptidasas denominadas catepsinas. Además en su interior se pueden observar también depósitos densos y restos membranosos. Las catepsinas son hidrolasas ácidas que requieren, por tanto, un pH ácido para su adecuada actividad (Knecht *et al.*, 2009). Las V-ATPasas, bombas de protones ancladas a la membrana lisosomal, son las encargadas de mantener gracias a su actividad ese pH ácido requerido en el lumen lisosomal (Kane, 2006).

1.1.1. Macroautofagia

La macroautofagia (denominada para simplificar, de ahora en adelante, autofagia) consiste en un proceso degradativo de componentes celulares mediado por lisosomas que ocurre en las células eucariotas y que se encuentra altamente conservado. La degradación mediante autofagia es un proceso no selectivo, al contrario que la degradación que tiene lugar en el sistema ubiquitina-proteasoma, aunque también se ha descrito una degradación autofágica más específica de mitocondrias (mitofagia), peroxisomas (pexofagia) (Sakai *et al.*, 2006), ribosomas (ribofagia) (Kraft *et al.*, 2008) y otros orgánulos, e incluso de proteínas como p62/SQSTM1 (Knecht *et al.*, 2009). La autofagia aumenta la supervivencia celular degradando orgánulos dañados, metabolitos tóxicos y patógenos intracelulares, o en situaciones de estrés celular, como el ayuno de nutrientes, aportando la energía requerida por la célula. Sin embargo, también se ha relacionado la autofagia con procesos de muerte celular cuando existen niveles elevados de la misma y por tanto, un exceso degradativo de componentes celulares esenciales para la célula (Pattingre *et al.*, 2005).

El mecanismo degradativo, de forma general, comienza con la formación de una doble membrana que secuestra componentes del citoplasma con la participación de filamentos intermedios y microfilamentos. Esta doble membrana se cierra formando una estructura conocida como autofagosoma, que sufre un transporte dependiente de dineína a lo largo de los microtúbulos (Kimura *et al.*, 2008) y se fusiona con endosomas tempranos y/o tardíos para más tarde fusionarse con lisosomas y formar el autolisosoma. Las enzimas hidrolíticas contenidas en el autolisosoma degradarán en primer lugar la membrana interna del autofagosoma y en segundo lugar el contenido interno que haya sido secuestrado (Chen y Klionsky, 2011). En levaduras, el origen de esa doble membrana es una estructura pre-autofagosomal (PAS, *preautophagosomal structure*) a la que se unen vesículas que contienen Atg9 para la formación del autofagosoma (Yamamoto *et al.*, 2012). En mamíferos no se ha encontrado una estructura equivalente, aunque se ha descrito un posible origen a partir de un subdominio del retículo endoplásmico, el denominado omegasoma, que se encuentra enriquecido en fosfatidilinositol 3-fosfato (Axe *et al.*, 2008). Recientemente, se ha observado un nuevo origen posible en la biogénesis del autofagosoma en mamíferos, como es la membrana plasmática (Puri *et al.*, 2014). Sin embargo, los detalles sobre las vías de señalización de la biogénesis o la composición de la membrana autofagosomal están por elucidar.

Existen un conjunto de proteínas conocidas como Atg (“Autophagy gene” o genes relacionados con la autofagia) que participan en el secuestro de los componentes celulares mediante la formación, elongación y cierre de la doble membrana que dará lugar al autofagosoma y posteriormente al autolisosoma. El complejo ULK es el encargado de iniciar la nucleación de la membrana dando lugar al secuestro del material citoplásmico a degradar. El complejo ULK está formado por cuatro proteínas: ULK1/2 (homólogo en levaduras: Atg1), FIP200 (homólogo en levaduras: Atg17), Atg101 y Atg13. Además, la curvatura y nucleación de la membrana se ve favorecida por la acción de un complejo de la membrana autofagosomal formado por WIPI1 (homólogo en levaduras: Atg18), Atg2 y Atg9, que se une al fosfatidilinositol 3-fosfato. En todo este proceso es necesario también el complejo PI3K-III (fosfatidilinositol 3-quinasa III), cuya función exacta es desconocida. Recientemente, se ha descrito en levaduras una interacción entre Atg1 y Atg9 necesaria para la elongación del fagoforo: la quinasa Atg1 (homólogo en mamíferos: Ulk1) fosforila a Atg9 en 6 residuos de serina permitiendo su unión a Atg18 (homólogo en mamíferos: WIPI1) y a Atg8 (Papinski y Kraft, 2014).

Durante el mecanismo de elongación y terminación del autofagosoma intervienen dos sistemas de conjugación que pueden compararse con el proceso de ubiquitinación por sus similitudes entre las enzimas que participan en ambos mecanismos. En el primer sistema de conjugación actúan Atg7 y Atg10 como enzimas activadoras (E1) y conjugadoras (E2), respectivamente, para dar lugar a la conjugación de Atg12 a Atg5. Estas reclutan a su vez a Atg16, formando un complejo multimérico (Atg12-Atg5-Atg16) similar a E3. En el segundo sistema se produce la conjugación de LC3 (homólogo en levaduras: Atg8). LC3 es sintetizada como precursor (Pro-LC3-I) e inmediatamente procesada por Atg4 eliminando su extremo C-terminal y dejando un residuo de glicina expuesto (LC3-I). Atg7 y Atg3 participan respectivamente como E1 y E2, sobre LC3-I. Finalmente, el complejo Atg12-Atg5-Atg16 (E3) formado como producto del primer sistema mediará la lipidación de LC3 a una fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana autofagosomal dando lugar a LC3-II (Figura 2). La forma de LC3 unida a PE, denominada LC3-II, es la única proteína específica de los autofagosomas por lo que permite su empleo como marcador de los niveles de los mismos. Las moléculas de LC3-II de la parte citosólica serán recicladas por Atg4 en LC3-I y fosfatidiletanolamina (Figura 2), mientras que las moléculas de LC3-II de la parte luminal del autofagosoma permanecerán en el mismo y serán degradadas posteriormente por las catepsinas lisosomales.

Como hemos comentado anteriormente, el complejo PI3K-III, formado entre otros por BECLIN1, participa en la formación de los autofagosomas. BECLIN1 posee un papel relevante: ante la condición de presencia de nutrientes, la proteína BCL (linfoma de célula B)-2 se une a BECLIN1 inhibiendo el complejo y, en consecuencia, la autofagia (Pattingre *et al.*, 2005). En cambio, el ayuno de nutrientes conduce a la separación de BECLIN1-BCL2, permitiendo la unión de BECLIN1 al complejo PI3K e induciendo la autofagia (Kang *et al.*, 2011). Existen tres modos de regulación de la unión BECLIN1-BCL2 en mamíferos: a) competencia de proteínas de la familia BCL2 por unirse a BECLIN1; b) unión de otras

proteínas a BECLIN1; y c) fosforilación de BCL2 o BECLIN1, por ejemplo, por parte de la quinasa p38 MAPK (ver apartado 1.2.1.1.).

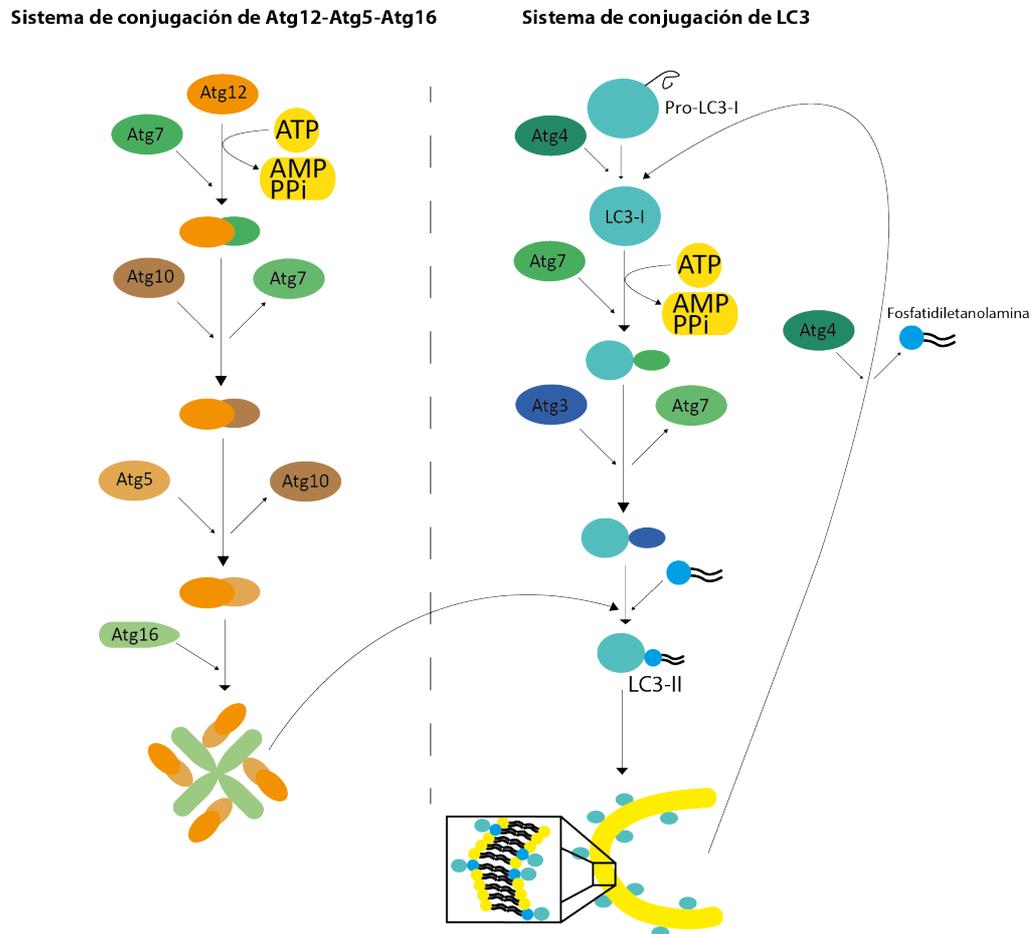


Figura 2. Sistemas de conjugación de LC3 a la membrana del autofagosoma.

La formación de la proteína LC3-II que se unirá a la membrana del autofagosoma tiene lugar tras la lipidación de LC3-I por una fosfatidiletanolamina. En dicho proceso participan dos sistemas de conjugación que darán lugar, por un lado, al complejo Atg12-Atg5-Atg16, el cual catalizará la última reacción del segundo sistema de conjugación, y por otro lado, a la proteína lipidada LC3-PE (fosfatidiletanolamina), denominada comúnmente LC3-II.

1.2. Regulación de la autofagia

La autofagia es un proceso altamente regulado por diversas proteínas en el que la situación ambiental en la que se encuentra la célula será uno de los determinantes de su inducción o inhibición. El crecimiento y división celular tiene lugar cuando se dispone de los nutrientes suficientes que permitirán la biosíntesis de las moléculas necesarias en cada condición. Por ello, la privación de nutrientes, entre otros tipos de estrés, es el principal estímulo inductor de la autofagia. Existe una compleja red de vías de señalización que

intervienen en la regulación del proceso, siendo las principales quinasas mTORC1 (complejo 1 de la diana de la rapamicina) y AMPK (proteína quinasa activada por AMP), que son un sensor nutricional y hormonal, y un sensor energético, respectivamente. El complejo mTORC1, formado por mTOR, Raptor, mLST8 y PRAS40, es activado ante altos niveles de nutrientes y factores de crecimiento (fuentes de carbono, nitrógeno y ATP) y, en mamíferos, inhibe al complejo ULK1/2-Atg13-FIP200, inhibiendo la autofagia. Por otro lado, la privación de nutrientes conduce a un aumento de la relación AMP/ATP, activándose la quinasa AMPK que inhibe a mTOR, y de este modo se activa la autofagia al permitir la translocación del complejo ULK1-Atg13-FIP200 a la membrana del autofagosoma (ver apartado 1.1.1.). La quinasa AMPK, tras condiciones de ayuno de nutrientes, también puede actuar directamente sobre el complejo ULK1-Atg13-FIP200, activándolo y produciendo un efecto positivo sobre la autofagia (Akers *et al.*, 2012).

1.2.1. Regulación de la autofagia por glucosa

Por tanto, hasta ahora, todos los estudios coinciden en la inducción de la autofagia ante una privación de nutrientes o su inhibición en una situación sin ayuno. En consecuencia se esperaría que la glucosa, al ser otro nutriente y una fuente de ATP, tuviera una función inhibitoria sobre la autofagia. De este modo, la privación de glucosa llevaría a la célula a aumentar los niveles de autofagia para poder suplir las necesidades energéticas, pudiendo obtener mediante la degradación proteica las unidades básicas que se requieren en la biosíntesis de las moléculas esenciales para la supervivencia celular. Por otro lado, el aporte de glucosa a las células conduciría a una reducción de los niveles de autofagia puesto que dicho nutriente aportaría los requerimientos energéticos que necesitan para su crecimiento y división celular. Sin embargo, la glucosa puede desencadenar efectos contrarios a los de otros nutrientes: se ha descrito su papel inductor de autofagia a través de la inhibición de mTORC1 (Ravikumar *et al.*, 2003), y recientemente, se ha mostrado que al administrar glucosa a células de mamífero tras una situación de ayuno se induce la autofagia (Moruno-Manchón *et al.*, 2013). Anteriormente, se describió también la activación de la autofagia por parte de la trehalosa, un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa (Sarkar *et al.*, 2007; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2010; Casarejos *et al.*, 2011).

Esclarecer la función que cumple la glucosa en el proceso de autofagia, así como los mecanismos de señalización que participan, es importante, ya que la glucosa es un nutriente involucrado en enfermedades como la diabetes o en distintos tipos de cáncer, y en ambos casos la autofagia también juega un papel relevante.

Se han descrito algunos mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa. Por ejemplo, existe una regulación hormonal que implica a las hormonas insulina y glucagón. En condiciones de ayuno de glucosa se induce la secreción de glucagón por parte de las células α del páncreas lo que lleva a una inducción de la autofagia (Schworer *et al.*, 1979), siendo gran parte de los aminoácidos glucogénicos, proporcionados por la degradación proteica que tiene lugar durante la autofagia, convertidos a glucosa mediante la gluconeogénesis hepática para mantener los niveles de glucosa en sangre. Por el contrario, el aporte de

glucosa conduce a la secreción de insulina por las células β del páncreas, inhibiendo la autofagia. Los niveles de insulina en ratones disminuyen hasta su nivel más bajo tras 24 horas de ayuno aproximadamente, mientras que los niveles de glucagón permanecen altos y estables durante todo el ayuno, por lo que la autofagia es inducida por el glucagón y también por la disminución de la función inhibitoria de la insulina al reducir su nivel (Ezaki *et al.*, 2011).

La mayoría de investigadores han descrito una función inhibitoria de la glucosa en células de mamífero sobre la autofagia (Hariharan *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2012), estableciendo relaciones concordantes con la regulación de la autofagia por vía hormonal, como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, recientemente se ha descrito la glucosa como estímulo inductor del proceso autofágico (Moruno-Manchón *et al.*, 2013), como anteriormente se adelantaba. Estos datos contradictorios pueden ser explicados teniendo en cuenta que la mayoría de experimentos que demuestran el papel represor de la glucosa sobre la autofagia se realizaron sobre células incubadas en medios de cultivo completos que contenían suero, vitaminas y aminoácidos que afectan a la autofagia. Por ello, los datos que demuestran la inducción de la autofagia por glucosa fueron realizados en un medio libre de suero con o sin glucosa, para determinar el efecto de la glucosa sin ningún otro factor que pudiera modular la autofagia. En estas condiciones, la glucosa induce un aumento en la formación de autofagosomas y autolisosomas, y en la degradación proteica por autofagia mediada por el efector p38 MAPK, de forma independiente de AMPK y mTOR.

1.2.2. p38 MAPK

La información derivada de los estudios sobre el papel que juega la quinasa p38 MAPK en la autofagia es controvertida. Se ha descrito su función inductora de la autofagia cuando p38 MAPK es activada por estrés oxidativo o de retículo (Liu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010), aunque también existen datos que ponen de manifiesto su papel inhibitorio (Webber y Tooze, 2010). Sin embargo, la mayoría de dichos estudios se han realizado empleando el inhibidor químico SB203580, y recientemente se ha descrito que dicho inhibidor puede inducir la autofagia independientemente de p38 MAPK (Zhang *et al.*, 2012). Debido a ello, los resultados sobre el papel inhibitorio de la quinasa estarían enmascarados por el aumento de la autofagia que provoca el propio inhibidor.

Por otro lado, un estudio reciente ha puesto de manifiesto el efecto inductor de p38 MAPK sobre la autofagia al administrar glucosa a células de mamífero tras un periodo de ayuno (ver apartado 1.2.1.) (Moruno-Manchón *et al.*, 2013). Además, estudios anteriores ya habían descrito ese efecto positivo sobre la autofagia: p38 MAPK activada por diferentes estímulos puede disociar el complejo BCL-2/BECLIN1 al fosforilar a BCL-2 (De Chiara *et al.*, 2006) y permitir a BECLIN1 fosforilar a sus sustratos para iniciar la autofagia. La quinasa MSK1/2 implicada en la regulación positiva de la autofagia, también puede ser fosforilada por p38 MAPK, tras la translocación al núcleo de esta última (Cuadrado y Nebreda, 2010).

1.3. Implicaciones patológicas de la regulación de la autofagia por glucosa

La autofagia ha sido relacionada con multitud de situaciones patológicas, como enfermedades metabólicas, neurodegenerativas o infecciosas y cáncer; y en cada una de ellas la autofagia está regulada de diferente manera. De este modo, en algunos casos el proceso autofágico degradativo se presenta inducido; y en otros casos, la autofagia está inhibida, y no siempre a lo largo de todo el proceso patológico, si no que varía en cada estado del mismo promoviendo o aliviando la enfermedad. Además, la glucosa juega un papel importante en ciertas enfermedades citadas anteriormente, como las enfermedades metabólicas (diabetes y obesidad, por ejemplo) o el cáncer.

En el caso del cáncer, el proceso degradativo autofágico se encuentra alterado según el estado del tumor. Durante la iniciación tumoral, la autofagia actúa como mecanismo supresor del tumor. Existen evidencias directas de que mutaciones en los genes que regulan la autofagia promueven la tumorigénesis. Por ejemplo la delección de BECLIN1 aumenta la susceptibilidad a padecer cáncer de ovario o próstata (Liang *et al.*, 1999) y diversos genes supresores tumorales, como LKB1 (*liver kinase B1*) estimulan la autofagia (Rubinsztein *et al.*, 2012). Sin embargo, una vez que el tumor se ha establecido, la autofagia permite su progresión al suministrar a la célula tumoral los requerimientos metabólicos que necesita para la biosíntesis de moléculas que le permitirán su supervivencia puesto que las condiciones características que rodean a las células son regiones poco vascularizadas con un bajo aporte de nutrientes. Además, las células tumorales producen señales de activación de autofagia, como estrés oxidativo (ROS), que conducen a un aumento de la autofagia en las células no tumorales vecinas. Siendo el producto de esa actividad degradativa también utilizado por las células cancerosas para su crecimiento (Mah *et al.*, 2012).

El efecto de la autofagia en pacientes diabéticos también juega un importante papel. En este caso las células crecen en un ambiente hiperglucémico que conlleva a un aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y estrés de retículo endoplasmático (Kaneto *et al.*, 2004). En esas condiciones la autofagia fomenta la supervivencia de la célula al degradar los agregados y proteínas mal plegadas. Además, el proceso aterosclerótico se acelera en la hiperglucemia, lo que conduce a enfermedades cardiovasculares en las que la autofagia se encuentra alterada provocando un aumento de la formación de placas ateroscleróticas que se reducen al inducir el proceso autofágico (Gonzalez *et al.*, 2011).

Por todo lo anteriormente expuesto, la regulación de la autofagia por glucosa es un proceso de gran relevancia, que debe ser estudiado en profundidad, de forma que este conocimiento pueda aplicarse al tratamiento de dichas enfermedades.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Como se ha indicado en la Introducción, en un estudio previo se demostró que la glucosa induce autofagia en células de mamífero al suministrarla tras un periodo de ayuno de nutrientes. En el mismo estudio se observó que esta activación de la autofagia es inducida por la quinasa p38 MAPK. Una vez activada, p38 MAPK se trasloca al núcleo donde regula la actividad de sus dianas: los factores de transcripción ATF-2 y CREB (Moruno-Manchón *et al.*, 2013). Esta traslocación al núcleo sugiere la activación de factores de transcripción que regularán la expresión de diferentes genes que codificarán las proteínas involucradas en la regulación de la inducción de la autofagia por glucosa.

En el presente trabajo nos hemos propuesto, por tanto, obtener información acerca de los posibles genes candidatos que puedan estar involucrados en la regulación de la autofagia inducida por glucosa. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Análisis de los resultados de un PCR Array de genes de autofagia para la selección de posibles genes candidatos relacionados con la regulación de la autofagia por glucosa.
2. Análisis de la expresión del mRNA de los posibles genes reguladores.
3. Análisis de los mecanismos que producen la activación de p38 MAPK.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- **NIH/3T3**: fibroblastos embrionarios de ratón (*Mus musculus*).
- **HEK293T**: células embrionarias de riñón humanas (*Homo sapiens*).
- **MEFs $p38^{+/+}$ y $p38^{-/-}$** : fibroblastos embrionarios de ratón derivados, respectivamente, de ratones “wild-type” y “knock-out” para la proteína p38 (*Mus musculus*).

Todas las células se mantuvieron en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), suplementado con 10 % (v/v) de FBS (suero bovino fetal), penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 mg/mL), todo procedente de Gibco Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EE.UU.). El medio de cultivo de las MEFs se suplementó con 2-mercaptoetanol al 0,02 %.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una estufa de CO₂ TC2323 Shel Lab. de Sheldon Manufacturing Inc. (Cornelius, OR, EE.UU.), bajo una atmósfera de 5 % CO₂ y 80 % de humedad relativa. Todo el trabajo relacionado con los cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar Bio II A de Telstar Industrial (Terrassa, España).

Para la realización de los diferentes experimentos, las células se tripsinizaron y se sembraron 6×10^5 células en placas multipocillo de 6 pocillos, 24 horas antes de realizar los experimentos.

Para la inducción de la autofagia, las células se lavaron con PBS (tampón fosfato salino) y se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 minutos. Según se indica en cada experimento, al medio de Krebs-Henseleit se le añadió, o no, D(+)- glucosa a las concentraciones indicadas, procedente de VWR Merck (Radnor, PA, EE.UU.); y distintos inhibidores que se especifican en la tabla de inhibidores (mirar 3.1.2.1.).

3.1.2. Reactivos

3.1.2.1. Inhibidores

Las moléculas empleadas como inhibidores de las vías proteolíticas y las que actúan sobre otras dianas se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Inhibidores empleados y sus dianas de actuación.

Inhibidor	Diana/s principal/es	Casa comercial	Referencia
Leupeptina	Serina y cisteína proteasas	Peptide Institute ¹	4041
Na₃VO₄	Fosfatasas alcalinas y tirosina fosfatasas	Sigma Aldrich	S-6508
NaF	Fosfatasas ácidas y Serina/Treonina fosfatasas	VWR International	6449
PMSF	Serina proteasas	Sigma Aldrich	P-7626
SB203580	p38	Calbiochem ²	59398

¹ Peptide Institute (Osaka, Japón); ² Calbiochem (San Diego, CA, EE.UU.)

3.1.2.2. Anticuerpos

La información sobre los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resume en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados clasificados en función de la proteína que reconocen.

Proteína reconocida	Dilución(Obtenido en*)	Casa comercial	Referencia
Actina	1:5000 (Rb)	Sigma-Aldrich	A-2066
CHOP	1:1000	Santa Cruz ¹	Sc-575
CREB	1:1000 (Rb)	Cell Signaling ²	9197
P-CREB	1:1000 (Rb)	Cell Signaling	9198
LC3	1:500 (Ms)	NanoTools ³	231
p38	1:1000 (Rb)	Santa Cruz	Sc-535
P-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000 (Ms)	Cell Signaling	9216
Tubulina	1:5000 (Rt)	Abcam ⁴	ab6160

¹Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE.UU.); ²Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.); ³NanoTools (Teningen, Alemania); ⁴Abcam (Cambridge, Reino Unido); ^{3*}Obtenido en: Rb (conejo), Ms (ratón) o Rt (rata).

Tabla 3. Anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpo secundario	Dilución (Obtenido en*)	Casa comercial	Referencia
Anti-IgG de ratón-HRP	1:5000 (Gt)	Sigma	A-4416
Anti-IgG de conejo-HRP	1:7000 (Gt)	Sigma	A-6154
Anti-IgG de rata-HRP	1:10000 (Gt)	Sigma	A-9037

*Obtenido en: Gt (cabra)

3.1.3. Tampones y otras soluciones

Los principales tampones y soluciones usados en este trabajo fueron:

Medio de Krebs-Henseleit sin Glucosa: NaCl 118,4 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, MgSO₄·7H₂O 2,54 mM, CaCl₂·2H₂O 2,44 mM, NaHCO₃ 18,5 mM, y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,4.

Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5% en TBS-Tween.

Solución de Lowry A: Na₂CO₃ 20 mg/mL y NaOH 4 mg/mL.

Solución de Lowry B: tartrato sódico-potásico 10 mg/mL y CuSO₄ 5 mg/mL.

Tampón de carga para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida): Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glycerol 10%, SDS 2,5%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001%.

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %, pH 8,3.

Tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas: Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 10 mM, Nonidet P-40 1 %, glicerol 15 %, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 100 mM, leupeptina 100 µM y PMSF 1 mM.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 136,9 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 16 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM y KCl 2,68 mM, ajustado a pH 7,2-7,4.

Tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, Nonidet P-40 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, leupeptina 100 μ M y PMSF 1 mM, ajustado a pH 7,8.

Tampón Tris salino (TBS): Tris 50 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 7,4.

TBS-Tween: Tris 50 mM, NaCl 150 mM y Tween 0,05 %, ajustado a pH 7,4.

3.2. Métodos

3.2.1. Inmunodetección de proteómas

3.2.1.1. Obtención de extractos celulares

Con el fin de obtener los extractos celulares, se lavaron las células con PBS, se añadió tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas o tampón RIPA y se recogieron las células en hielo con un “rubber-policeman” en tubos de 1,5 ml. Posteriormente, las muestras se sometieron a 6-8 ciclos de congelación-descongelación, vorteadando en cada uno de los ciclos. A continuación, las mismas se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C para, de este modo, obtener el sobrenadante que contendrá las proteínas a analizar, quedando separado del sedimento (restos de membranas celulares).

3.2.1.2. Cuantificación de la concentración de proteína

Para determinar la cantidad de proteína contenida en los extractos celulares se utilizó el método Lowry (Lowry et al., 1951). Se trata de un método colorimétrico basado en la reducción de los grupos fenólicos de las proteínas. En primer lugar, se añade a la muestra una mezcla de las soluciones A y B (ver apartado 3.1.3.) en una proporción 1:1 (v/v) y se incuba durante 10 minutos. La solución A alcaliniza el medio y la solución B, que contiene Cu^{2+} que forma complejos con los enlaces peptídicos, produce un cambio conformacional en las proteínas de tal manera que quedan expuestos los grupos fenólicos de las tirosinas o triptófanos que contengan las proteínas presentes en el extracto celular. En segundo lugar, se añade solución Folin-Ciocalteu 1N durante 30 minutos; esta solución vira el color de la muestra del amarillo al azul al reducirse el ácido fosfomolibdotúngstico contenido en ella por la presencia de los fenoles de las proteínas.

La absorbancia de la muestra (750 nm) se mide en un espectrofotómetro UV-Visible Helios de Unicam (Cambridge, Reino Unido). Para poder cuantificar la cantidad de proteína presente en las muestras será necesario realizar una recta patrón o recta de calibrado, para lo que se utilizó seroalbumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

3.2.1.3. SDS-PAGE, transferencia electroforética e inmunodetección en membrana (“Western-blot”)

Los extractos celulares se diluyeron en tampón de carga (ver apartado 3.1.3.) teniendo en cuenta que se cargaría idéntica cantidad de proteína para todos los pocillos en un mismo gel y pudiendo variar la cantidad de proteína, dependiendo del experimento, entre 40 y 60 µg. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos a 95°C y, a continuación, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida varió entre el 10% y el 16% en función del peso molecular de la proteína de interés. Los geles se montaron sobre soportes verticales Mighty Small de Hoefer (San Francisco, CA, EE.UU.) y se sometieron a un voltaje continuo de 120 V. En todos los geles se utilizaron marcadores de peso molecular de Invitrogen (Benchmark prestained protein ladder).

Las proteínas, una vez separadas por su peso molecular a lo largo del gel, se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno, Amersham) en un tanque de transferencia húmeda (Bio-Rad Lab., Berkeley, CA, EE.UU.) con tampón de transferencia (ver apartado 3.1.3.). Las transferencias se realizaron a un voltaje constante de 30 V durante 16 horas a 4°C, o bien aumentando gradualmente el amperaje de este modo: 250 mA durante 30 minutos, 350 mA durante 30 minutos y, por último, 450 mA durante 3-4 horas, siempre a 4°C.

A continuación, se lavaron las membranas y se tiñeron con rojo Ponceau para comprobar la correcta transferencia de las proteínas. Tras lavarlas con TBS-Tween 0,01%, las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-Tween durante 1-2 horas y se volvieron a lavar con TBS-Tween. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-Tween, que contenía también BSA (seroalbúmina bovina) al 2% y azida sódica al 0,05%. El periodo de incubación fue a 4°C durante 16 horas, o bien a temperatura ambiente variando en este caso el tiempo, dependiendo del anticuerpo, de 2-4 horas. Después de la primera incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween durante 15 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo (ver apartado 3.1.3.), durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario iba dirigido contra la inmunoglobulina correspondiente (de conejo, rata o ratón) y conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) que permitió el revelado posterior. Para eliminar los restos de anticuerpo no unido a las proteínas de interés, las membranas se volvieron a lavar con TBS-Tween tres veces durante 15 minutos cada una de ellas.

La detección de las proteínas en las membranas se realizó por quimioluminiscencia, utilizando Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) o, para señales más débiles, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham GE Healthcare). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas, tras el revelado, en películas Kodak X-Ray de Carestream Health, Inc. (Rochester, NY, EE.UU.).

Para la detección de más de una proteína en la misma membrana de PVDF se realizó un “stripping” con HCl-guanidina 7M durante 25 minutos, tras lo que se lavó la membrana varias veces con TBS-Tween y se volvió a bloquear con la solución de bloqueo. Tras el bloqueo se continuó con las incubaciones de los anticuerpos correspondientes como se describe anteriormente.

3.2.2. Cuantificación de los niveles de mRNA

3.2.2.1. Extracción de RNA mediante TRIzol

Para la extracción del RNA total, las células sembradas en placas multipocillo de 6 pocillos al 100% de confluencia se lavaron con PBS en hielo y se lisaron añadiendo 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) por cada 10 cm² de área de cultivo. Se incubaron con el Trizol durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos y se recogieron las células con la ayuda de un raspador “rubber-policeman” en tubos libres de RNasas de 1,5 ml.

A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo por ml de TRIzol, se vorteoó de manera vigorosa durante 15 segundos, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 6-8 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Tras la centrifugación, los extractos se separaron en tres fases: una fase orgánica inferior y una interfase, que contenían el DNA y las proteínas, y una fase acuosa superior que contenía el RNA. Esta fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml libre de RNasas, se añadieron 0,5 ml de isopropanol por ml de TRIzol para la precipitación del RNA, se vorteoó varias veces, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 4°C y 12.000 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante para conservar el pellet que contenía el RNA.

Tras la precipitación del RNA, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% por ml de TRIzol, se vorteoó y se centrifugó a 7.500 g y 4°C de temperatura durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante de etanol y se repitió el lavado una segunda vez. Por último, se dejó secar el pellet al aire durante 10-15 minutos y se disolvió en agua libre de RNasas ajustando la cantidad (30-50 µl) según el tamaño del pellet. La concentración y calidad del RNA se midió usando el espectofotómetro NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Newark, EE.UU.) a 260 y 280 nm de absorbancia.

3.2.2.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para el diseño de los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) se utilizó la pagina web de la librería de sondas de Origene (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE.UU, <http://www.origene.com/qPCR/primers.aspx>) para *Homo sapiens* y *Mus musculus*, o bien se utilizó el programa *PrimerExpress* de Applied Biosystems. Se seleccionaron las sondas más adecuadas para la amplificación tanto de los genes candidatos para la regulación de la autofagia por glucosa como del gen control, en este caso β-Actina (ver Anexo 1). Todas las

sondas se comprobaron *in silico* basándose en la secuencia de cada uno de los genes obtenida a partir de la base de datos GenBank.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo por cuadruplicado utilizando el termociclador *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se llevaron a cabo las reacciones en un volumen final por reacción de 20 μ l, que contenía 30-300ng de RNA total obtenido de los extractos celulares. Las cantidades de cada uno de los componentes utilizados por reacción se especifican en la Tabla 5. Para la transcripción reversa del RNA utilizado como molde se añadió a los componentes de la reacción una enzima transcriptasa reversa (“MultiScribe Reverse Transcriptase”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y para evitar la destrucción del RNA por parte de enzimas RNasas, se añadió un inhibidor de RNasas (“RNase Inhibitor”, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). La detección del producto de PCR se llevó a cabo mediante SYBR Green, una molécula fluorescente que se une al DNA de doble cadena existiendo una relación lineal entre la fluorescencia emitida y la concentración de producto amplificado. El kit utilizado fue *Fast SYBR Green Master Mix 2X* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EE.UU.) que contiene: SYBR Green, *AmpliTaq Fast DNA* Polimerasa, molécula fluorescente ROX como referencia pasiva y dNTPs. La molécula fluorescente ROX proporciona una referencia interna a partir de la cual la señal reportera, SYBR Green, puede ser normalizada durante el análisis de datos para corregir fluctuaciones de fluorescencia debidas a cambios en la concentración o el volumen.

Tabla 4. Componentes empleados en la reacción de PCR cuantitativa.

Componente	Volumen por reacción	Concentración final
SYBR Green PCR Master Mix 2X	10	1X
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/μl)	0,1	0,25 U/ μ l
Rnase Inhibitor (20U/μl)	0,1	0,1 U/ μ l
Oligo sentido (10 μM)	0,2	100 nM
Oligo antisentido (10 μM)	0,2	100 nM
RNA	5	30-300 ng
Agua	4,4	-
Total	20	-

Las PCR cuantitativas se llevaron a cabo en placas para reacciones ópticas (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) de 48 pocillos, siguiendo los tiempos y temperaturas indicados en la Tabla 6. La reacción de PCR constó de tres fases: una fase inicial donde se llevó a cabo en primer lugar, la transcripción reversa del RNA y en segundo lugar la activación de la polimerasa que actuaría posteriormente; una segunda fase donde tuvo lugar la reacción de PCR propiamente dicha en la que la polimerasa activada amplificaría las cadenas de DNA; y una última fase, en la que se amplifica cualquier cadena sencilla de DNA que haya quedado.

Debido al empleo de SYBR Green, que se une de manera inespecífica a cualquier DNA de doble cadena, es importante verificar que el producto de la PCR es únicamente la amplificación del gen de interés. Por ello, para comprobar que los resultados de expresión de mRNA no se deben a la cuantificación de dímeros de sondas u otros productos no específicos, se añade en el programa de la reacción de PCR una última fase conocida como curva de disociación o “Melt curve”. Esta fase consiste en aumentar la temperatura hasta 95°C y obtener la medición de los cambios de fluorescencia en cada fracción de temperatura que aumenta: en el punto de fusión o “melting point” las dos cadenas de DNA se separan disminuyendo rápidamente la fluorescencia. Todos los productos de PCR de una pareja de sondas deben tener la misma temperatura de disociación.

Tabla 5. Fases y características de la reacción de PCR cuantitativa.

		Tiempo	Temperatura
Fase inicial	Transcripción reversa	30 min	48°C
	Activación DNA Polimerasa	10 min	95°C
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	15 s	95°C
	Hibridación/ Extensión	1 min	60°C
Fase final	Desnaturalización	15 s	95°C
	Hibridación/ Extensión	1 min	60°C
Curva de disociación	Desnaturalización dsDNA	20 min aprox.	Hasta 95°C

3.2.2.3. Curva estándar para la optimización de los oligos

Para la optimización de los oligos realizamos curvas estándar con diferentes concentraciones de RNA total. De este modo, pudimos evaluar qué concentración de RNA era la óptima para la correcta actividad de cada uno de los oligos con una eficiencia de amplificación de aproximadamente el 100%. Las curvas estándar fueron generadas

empleando diluciones decimales desde 300 ng hasta 3×10^{-2} ng de RNA total por reacción, que al añadir 5ul de RNA en cada reacción correspondería a concentraciones de RNA desde 60ng/ μ l hasta 6×10^{-3} ng/ μ l. La curva estándar se representó interpolando el valor C_T obtenido en cada caso en el eje de ordenadas y el logaritmo de la concentración de RNA en el eje de abscisas.

3.2.3. Análisis estadístico y otras herramientas informáticas

Para la cuantificación digital de las bandas de los diferentes “Western-blot” se utilizó el programa informático ImageQuant TL V.2005 de Amersham.

Todos los experimentos se repitieron tres veces de manera independiente. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante t de Student con el programa informático Microsoft Office Excell.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de los resultados obtenidos en PCR Array para la selección de genes candidatos reguladores de la autofagia por glucosa

Como se ha indicado en la Introducción, un estudio reciente (Moruno-Manchón *et al.*, 2013) evaluó el papel de la glucosa en la degradación de proteínas que tiene lugar mediante autofagia. Los resultados de este estudio, contrariamente a lo que muestran la mayoría de estudios realizados hasta el momento, demostraron que la glucosa inducía la autofagia al ser administrada a células de mamífero tras un periodo de ayuno de nutrientes. En ese mismo estudio se analizó la posible implicación de varias quinasas (AMPK, PKA, ERK1/2 y p38), incluyendo el sensor nutricional mTOR, en la regulación del proceso. Sin embargo, los resultados fueron negativos para la mayoría de ellas, a pesar de que estas quinasas se habían relacionado anteriormente con la regulación de la autofagia (Yang y Klionsky, 2009). Por el contrario, se obtuvieron resultados positivos para la quinasa p38 MAPK, mostrando un papel clave de esta quinasa en la inducción de la autofagia. Estos resultados se confirmaron no solo empleando inhibición química (SB203580, BIRB796), sino también supresión génica al transfectar células NIH/3T3 con siRNAs para p38 MAPK y empleando células MEFs *p38^{-/-}* y *p38^{+/+}*, “knock-out” y “wild-type”, respectivamente. En este trabajo también se sugiere que el mecanismo por el cual p38 MAPK induce autofagia puede ser mediante la fosforilación de algún factor de transcripción, ya que además observaron que p38 se trasloca al núcleo tras la adición de glucosa.

Debido a la importancia de la glucosa y de la autofagia en ciertas enfermedades metabólicas y en el desarrollo tumoral (ver apartado 1.3), nos planteamos seleccionar posibles genes candidatos que fueran responsables de la regulación del proceso para poder describir con detalle las vías de señalización implicadas en la misma. Para ello, analizamos los datos obtenidos tras la realización de un array comercial específico de autofagia para células de mamífero, en concreto para células de *Mus musculus*: RT² Profiler™ PCR Array Mouse Autophagy (Quiagen N.V., Venlo, Países Bajos). El array permite el análisis del perfil de expresión de 84 genes potencialmente involucrados en la regulación de la autofagia o que son componentes de la maquinaria molecular autofágica. Se compararon dos tipos celulares de *Mus musculus*: MEF *p38^{-/-}* y *p38^{+/+}*, ambos tipos en dos condiciones: con glucosa y sin glucosa; y se compararon cuatro combinaciones entre ellos (Tabla 6).

Tabla 6. Tipos celulares, condiciones y combinaciones evaluadas en el PCR Array.

1) p38^{+/+} Glucosa+ vs p38^{+/+} Glucosa-	2) p38^{-/-} Glucosa+ vs p38^{-/-} Glucosa-	3) p38^{+/+} Glucosa+ vs p38^{-/-} Glucosa+	4) p38^{+/+} Glucosa- vs p38^{-/-} Glucosa-
---	---	---	---

En el análisis de los resultados obtenidos en el array teníamos como objetivo seleccionar aquellos genes que estuvieran involucrados en la inducción de la autofagia por glucosa mediante la quinasa p38 MAPK. Para ello, los posibles genes candidatos debían

mostrar un perfil de expresión concreto: estar diferencialmente expresados en 1 y 3 y no mostrar diferencias en su expresión en 2 y 4 (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados esperados en el perfil de expresión de los posibles genes candidatos de la regulación de la autofagia por glucosa vía p38 MAPK.

	p38+/+ Glucosa+ vs p38+/+ Glucosa-	p38-/- Glucosa+ vs p38-/- Glucosa-	p38+/+ Glucosa+ vs p38-/- Glucosa+	p38+/+ Glucosa- vs p38-/- Glucosa-
Resultado	↑	↔	↑	↔
esperado	↓	↔	↓	↔

De este modo, los genes candidatos potencialmente reguladores del proceso, podrían encuadrarse en uno de los siguientes escenarios:

-genes inductores de la autofagia activados por p38 MAPK: su expresión estaría inducida en las células *p38+/+* con glucosa comparando con *p38+/+* sin glucosa (1) o *p38 -/-* con glucosa (3)

-genes inhibidores de la autofagia reprimidos por p38 MAPK: su expresión sería menor en las condiciones 1 y 3.

A su vez, esperaríamos que estos genes no mostrasen diferencias significativas en su perfil de expresión en las condiciones 2 y 4 puesto que en 2 ninguno de los dos tipos celulares comparados poseía la quinasa p38 MAPK involucrada en el proceso y en 4 ambas condiciones comparadas eran sin glucosa y por tanto, aunque la quinasa p38 MAPK estaba presente en uno de los dos tipos, la autofagia no se induciría sin la presencia de glucosa.

Al analizar los datos de todos los genes que se habían evaluado en el array, nos dimos cuenta que existía un único gen que seguía de manera exacta el patrón de expresión esperado para ser regulador de la autofagia por glucosa. Debido a ello, decidimos seleccionar el resto de genes candidatos fijándonos únicamente en las condiciones 1 y 3. De este modo, seleccionamos genes que presentaran una disminución en su expresión en la condición 1, serían inhibidores de la autofagia reprimidos por p38 MAPK; o genes que presentarán un aumento en su expresión en la condición 3, serían activadores de la autofagia inducidos por p38 MAPK. Antes de la selección definitiva, realizamos una revisión bibliográfica de los genes candidatos comparando los resultados obtenidos en el array con las funciones del gen, para cerciorarnos de que estos pudieran estar implicados en la regulación de la autofagia por glucosa dependiente de p38 MAPK. Teniendo en cuenta estos resultados esperados, seleccionamos cuatro genes: *AKT1*, *BCL2*, *IFNA4* y *RGS19* (Tabla 8).

Tabla 8. Genes seleccionados como posibles candidatos de la regulación de la autofagia por glucosa vía p38 MAPK. Se muestran sus perfiles de expresión obtenidos en el PCR Array. Los valores mostrados corresponden al ratio ($2^{-\Delta Ct}$) de las muestras en cada gen entre el ratio de la muestra control.

Genes	<i>p38</i> ^{+/+} Glucosa+	<i>p38</i> ^{-/-} Glucosa+	<i>p38</i> ^{+/+} Glucosa+	<i>p38</i> ^{+/+} Glucosa-
	vs <i>p38</i> ^{+/+} Glucosa-	vs <i>p38</i> ^{-/-} Glucosa-	vs <i>p38</i> ^{-/-} Glucosa+	vs <i>p38</i> ^{-/-} Glucosa-
AKT1	-2,9	-	-	2,7
BCL2	-2,6	-13,4	5,4	-
IFNA4	4	-	8,6	-
RGS19	-	-959,4	236,5	-2,4

De los cuatro genes, el único que cumplía de manera exacta el perfil de expresión esperado fue *IFNA4*. El gen *IFNA4*, interferón-alpha 4, codifica una citocina clasificada dentro de la familia de los interferones Tipo I (IFNs), que poseen actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomodulatorias (Bekisz *et al.*, 2004). Recientemente, un estudio ha demostrado la inducción de la autofagia en varias líneas celulares humanas tumorales (células Daudi o HeLa S3, por ejemplo) después de ser tratadas con IFN-Tipo I (Schmeisser *et al.*, 2013), añadiendo una nueva función a estas citocinas como activadoras de la autofagia. También, un estudio anterior analizó el papel de la quinasa p38 MAPK en la cascada de señalización del IFN-Tipo I, demostrando que la activación de esta quinasa por parte del IFN-alpha resulta esencial para la regulación de la inducción de las respuestas biológicas del IFN-Tipo I (Platanias, 2003).

El siguiente gen seleccionado fue *RGS19*, también conocido como *G-alpha interacting protein*, *GAIP*. *RGS19* pertenece a la familia de proteínas RGS que son reguladoras de la transducción de señales acopladas a proteínas G (GPCR). El perfil de expresión de este gen muestra un aumento elevado en la condición 3, poniendo de manifiesto su posible efecto inductor vía p38 MAPK, ya que se encuentra altamente expresado de manera diferencial en presencia de glucosa en las células *p38*^{+/+} en comparación con las células *p38*^{-/-}. Se ha demostrado en varios estudios la función inductora de la autofagia que posee *Rgs19*: al ser sobreexpresado en células HT-29 produce un efecto positivo sobre la autofagia (Ogier-Denis *et al.*, 1997) y esa inducción de la autofagia depende de la fosforilación de *RGS19* por parte de la quinasa ERK1/2, que conduce a la activación de GTPasas que modulan de manera positiva la autofagia (Ogier-Denis *et al.*, 2000).

Otro de los genes que seleccionamos fue *BCL2*, linfoma de célula B-2, que codifica una proteína antiapoptótica que, como comentamos en la Introducción, se une a BECLIN1 bloqueando la función proautofágica de este último. Se ha demostrado que la unión BCL2-BECLIN1 inhibe la autofagia inducida en condiciones de ayuno (Pattingre *et al.*, 2005). *BCL2* puede ser fosforilada por p38 MAPK una vez activa, permitiendo la disociación del complejo

y la liberación de BECLIN1 para iniciar la autofagia (De Chiara *et al.*, 2006). Analizando su perfil de expresión detectamos unos resultados contradictorios puesto que aumenta su expresión con glucosa en las células *p38^{+/-}* comparado con las células *p38^{-/-}*. Por el contrario, disminuye su expresión en la condición 1, sugiriendo un efecto inhibitorio de la autofagia y por tanto, reprimido por p38 MAPK. Por todo ello, nos propusimos analizar con detalle su posible implicación en la regulación del proceso.

El último gen que seleccionamos fue *AKT1*, homólogo 1 del oncogén viral *V-akt* que produce cáncer de timo en ratones, también conocido como PKB (*Protein Kinase B*). Se trata de una quinasa con un papel inductor de la autofagia que participa en la vía de señalización de PI3K, activada por factores de crecimiento o insulina, entre otros. PI3K activa a AKT1 que tras una serie de efectores corriente abajo, activan a mTOR inhibiendo la autofagia (Yang y Klionsky, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que AKT1 cataliza la fosforilación de FOXO1, que se transloca al citoplasma e induce la autofagia (Zhou *et al.*, 2012). Estos resultados contradictorios nos hicieron plantearnos el análisis de AKT1 en la regulación de la autofagia por glucosa, para determinar el papel de dicho gen en el proceso. Los resultados del PCR Array indican un posible papel inhibitorio del gen al encontrarse diferencialmente expresado de manera negativa en la condición 1.

Tras la selección de los diferentes genes posibles reguladores de la autofagia por glucosa, llevamos a cabo el análisis de cada uno de ellos de manera independiente en dos tipos celulares: NIH/3T3 y HEK293T. El análisis se llevo a cabo en estos tipos celulares debido a que buscamos resultados que se puedan comparar en varios tipos celulares tanto de humano como de ratón, y no que se trate de un resultado aislado en un único tipo celular. Por ello, quisimos evaluar los perfiles de expresión de los genes candidatos en tipos celulares distintos al utilizado en el PCR Array (MEFs) para comprobar, de este modo, que la expresión concordaba con la obtenida en este último tipo celular.

4.2. Estudio de la expresión del mRNA de los posibles genes candidatos reguladores de la autofagia por glucosa

La regulación de la autofagia por glucosa es un proceso que debe ser estudiado en detalle por su relevancia y relación con ciertas enfermedades (ver apartado 1.3), para determinar las vías de señalización que participan en él y el modo de acción de cada una de las proteínas que están involucradas. Por ello, tras la selección de los posibles genes candidatos, nos propusimos validar los resultados obtenidos en el PCR Array, para determinar la implicación de los productos que codifican en el proceso.

Se analizó la expresión de cada uno de los genes candidatos a partir de muestras de RNA total que se extrajeron mediante TRIzol tras 30 minutos de ayuno de nutrientes seguido de 2 horas de tratamiento con o sin glucosa y con o sin el inhibidor químico de p38 MAPK, SB203580 (ver apartado 3.2.2.1.), según se explica en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron en dos tipos celulares: NIH/3T3 (*Mus musculus*) y HEK293T (*Homo sapiens*). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de

cada uno de los genes se detallan en el apartado Anexos (Anexo 1). Todos los resultados de la expresión de los diferentes genes se calcularon como la media y desviación típica de al menos dos experimentos independientes de cada uno de los tipos celulares.

La técnica elegida para el análisis de la expresión del mRNA fue la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), que permite cuantificar el mRNA en cada muestra y así comparar los niveles de expresión en distintas condiciones. En primer lugar, para poner a punto la PCR cuantitativa para cada una de las parejas de oligos seleccionadas, realizamos una curva estándar utilizando diluciones decimales de una muestra de concentración conocida para cada uno de los genes problema, así como para el gen *ACTB*, que codifica la proteína β -actina, que se empleó como gen control al amplificarlo en la misma placa. El gen control o constitutivo se utiliza como referencia para normalizar los datos, puesto que son genes que se encuentran presentes en todas las muestras y cuya expresión no está condicionada por el tratamiento empleado.

Los datos de las curvas estándar se obtuvieron al representar los valores de C_T frente al algoritmo de la cantidad de RNA de cada dilución. Estos datos son utilizados para determinar la eficiencia de la amplificación en cada caso, que viene dada por los valores de la pendiente de la recta obtenida para cada gen, y el coeficiente de correlación R^2 , mostrados en la Tabla 10. La eficiencia de amplificación de cada gen se calculó mediante la fórmula $E=10^{-1/\text{pendiente}}$ y la eficiencia en porcentaje se calculó empleando la fórmula $E(\%)=(E-1) \times 100$. Para validar los resultados de los experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real, quisimos asegurarnos que las eficiencias de amplificación de los genes control comparadas con las de los genes candidatos eran similares para poder aplicar el método $\Delta\Delta C_T$. La eficiencia del gen control en *Homo sapiens* no se muestra en la Tabla 9 puesto que fue calculada con anterioridad en el laboratorio, obteniendo un resultado de eficiencia del 100%, lo que corresponde aproximadamente a una pendiente de -3,32. Como podemos observar en la Tabla 9, la diferencia entre la pendiente del gen control en *Mus musculus* y las de los genes candidatos en este mismo organismo es menor de 0,2. De manera similar ocurre en *Homo sapiens*, obteniendo una diferencia de alrededor de 0,2.

Una vez validados los resultados de la eficiencia de la amplificación, podemos emplear el método $\Delta\Delta C_T$ que consiste en obtener el valor ΔC_T al restar la media de los valores de C_T obtenidos para el gen control a la media de los valores C_T del gen candidato. A este valor ΔC_T se le resta el valor ΔC_T de la muestra calibradora (utilizada como base para los resultados relativos) y obtenemos el valor $\Delta\Delta C_T$. Este último valor junto con el valor de la eficiencia de la amplificación lo empleamos para obtener el ratio o RQ ($RQ=E^{\Delta\Delta C_T}$), que será el valor que tendremos en cuenta y que representaremos en los histogramas para establecer las diferencias de expresión relativas. Todos estos cálculos fueron realizados con el programa informático: StepOne™ Software v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El valor RQ de la muestra calibradora será 1 y para poder establecer diferencias significativas sobre la expresión de un gen en el resto de muestras que pertenecen a un mismo experimento, el valor de RQ debe ser mayor a 2, o menor a 0,5.

Tabla 9. Pendiente y coeficiente de correlación de la curva estándar obtenida para cada gen candidato y para el gen control en cada uno de los organismos.

	Gen	Organismo	Pendiente de la recta	R ²	Eficiencia de la amplificación	Eficiencia (%)
Gen control	<i>ACTB</i>	Mus musculus	-3,227	0,998	2,04	104
Gen candidato	<i>RGS19</i>	Homo sapiens	-3,148	0,997	2,08	108
		Mus musculus	-3,131	0,994	2,09	109
	<i>IFNA4</i>	Homo sapiens	-3,105	0,99	2,10	110
		Mus musculus	-3,157	0,991	2,07	107
	<i>AKT1</i>	Homo sapiens	-3,194	0,996	2,06	106
		Mus musculus	-3,298	0,998	2,01	101
<i>BCL2</i>	Mus musculus	-3,135	0,995	2,08	108	

4.2.1. Análisis de LC3-II para determinar los niveles de autofagia

La proteína LC3-II es la forma lipidada por una molécula de fosfatidiletanolamina de la proteína LC3-I. Como comentamos en la Introducción, LC3-II se emplea como marcador de los niveles de autofagosomas, e indirectamente de los niveles de autofagia, debido a que es la única proteína específica de estas estructuras membranosas.

Antes de realizar el análisis de la expresión de los diferentes genes seleccionados en los dos tipos celulares, decidimos analizar los niveles de la proteína LC3-II y, así, comprobar que el proceso autofágico inducido por glucosa había ocurrido de manera correcta, como ha sido descrito por Moruno-Manchón (2013). De este modo, nos aseguramos de que a la hora de analizar los niveles de expresión del mRNA (ver apartado 4.2.2.) en cada condición, estos se podrán relacionar con la regulación de la autofagia inducida por glucosa.

Como se observa en la Figura 3, tanto en las células NIH/3T3 (A), como en las células HEK293T (B), los niveles de la proteína LC3-II aumentan de manera significativa al añadir glucosa. Sin embargo, al inhibir la quinasa p38 MAPK con el inhibidor químico SB203580, permanecen prácticamente inalterados en presencia de glucosa. Al comparar las dos situaciones con/sin SB203580 en presencia de glucosa, observamos un aumento significativo de los niveles de LC3-II al no inhibir la quinasa.

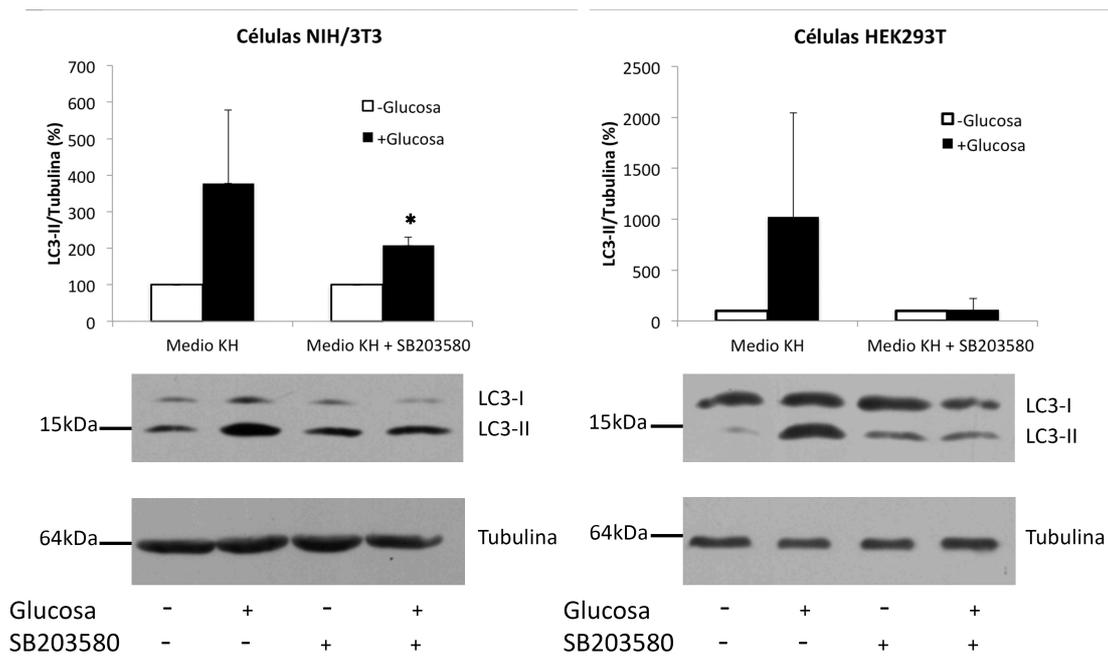


Figura 3. La autofagia es inducida por glucosa mediante la quinasa p38 MAPK. Las células NIH/3T3 (A) y HEK293T (B) fueron tratadas durante 30 minutos con el inhibidor SB203580 en medio Krebs-Henseleit (KH) sin glucosa y después incubadas durante 2 horas más añadiendo, o no, glucosa (10mM) e inhibidores de proteasas lisosomales: NH₄Cl (20mM) y leupeptina (100µM). Se lisaron las células en tampón RIPA, se procesaron los extractos por SDS-PAGE y se transfirió a membranas de PVDF donde se detectaron los niveles de la proteínas LC3-II y tubulina, como control. La posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa se indican a la izquierda y las bandas correspondientes a las proteínas (LC3-I, LC3-II y Tubulina) a la derecha. En los histogramas están representadas las medias y desviaciones estándar de los niveles de LC3-II relativos a los niveles de tubulina calculadas a partir de tres experimentos independientes y expresadas en porcentaje respecto a los valores en ausencia de glucosa. *P < 0,05.

4.2.2. Análisis de las diferencias relativas de expresión de los genes candidatos

El gen *IFNA4* fue analizado únicamente en células HEK293T mostrando un perfil de expresión diferencial, como podemos observar en la Figura 4A. Cuando la quinasa p38 MAPK está activa, la expresión de *IFNA4* no varía en presencia/ausencia de glucosa. Este resultado es sorprendente teniendo en cuenta que tanto los datos obtenidos en el array como la bibliografía comentada en el apartado 4.1. sugería una activación de la quinasa p38 por parte de *IFNA4* y por tanto un efecto inductor sobre la autofagia. Sin embargo, en presencia del inhibidor de la quinasa, SB203580, la expresión aumenta de manera significativa (250% aproximadamente) en presencia de glucosa comparado con los niveles de expresión en ausencia de glucosa y comparado también con los niveles en presencia de glucosa sin inhibidor. En ausencia de glucosa, la adición del inhibidor también produce un aumento en la expresión del gen, aunque en menor magnitud (50%), comparada con la expresión en ausencia de inhibidor. Estos resultados sugieren un papel represor de la quinasa p38 MAPK sobre *IFNA4*, inhibiendo su transcripción, ya que cuando inhibimos la quinasa tanto en presencia como en ausencia de glucosa se produce un aumento en la

expresión de *IFNA4*. Estos resultados se pueden deber a la capacidad de la quinasa de regular respuestas biológicas opuestas dependiendo del contexto celular, el estímulo específico o la isoforma de p38 activada (Platanias, 2003). Por todo ello, pese a que se ha descrito un papel inductor del interferón sobre la autofagia (Schmeisser *et al.*, 2013), no podemos establecer una relación directa entre el gen y la autofagia inducida por glucosa, ya que el resultado de su expresión no se puede relacionar ni con la inducción ni con la represión de la autofagia. Sin embargo, si que podemos sugerir una relación directa entre la quinasa y el *IFNA4*, como ya se ha descrito (Platanias, 2003), pero en este caso de manera opuesta al reprimir al interferón.

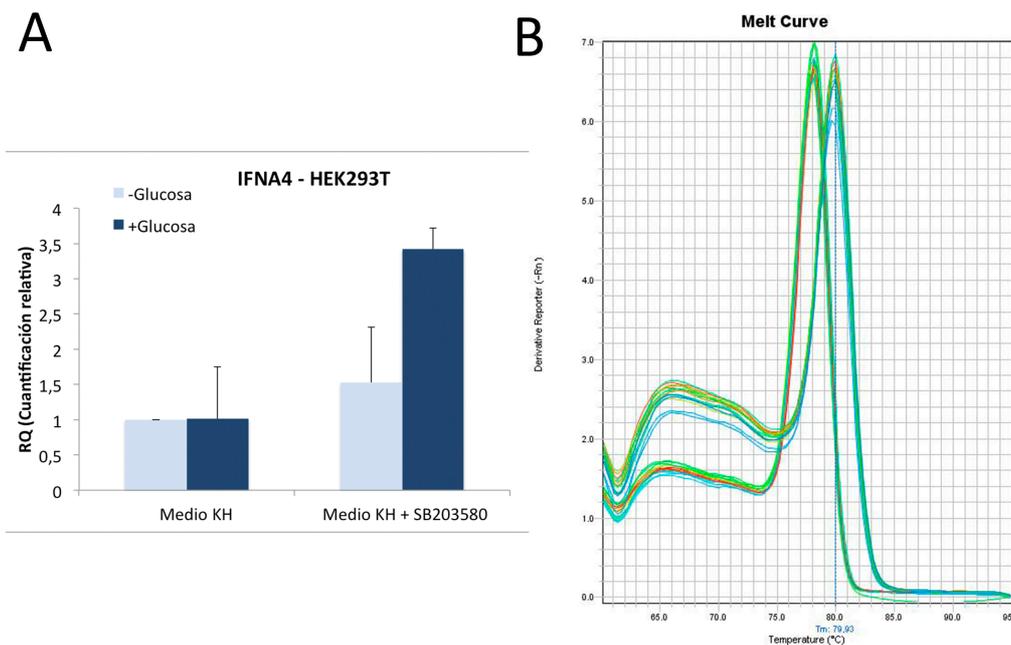


Figura 4. Expresión relativa del gen *IFNA4* en células HEK293T A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (80°C) y el gen *IFNA4* (78°C).

Otro de los genes analizados fue *RGS19*. La proteína RGS19 pertenece a la familia de las proteínas RGS que actúan como GAPs (*GTPase activating protein*), activando GTPasas que aceleran la hidrólisis de GTP a GDP en las subunidades alpha de las proteínas G activas (Siderovski *et al.*, 2005). Esta hidrólisis conduce a la unión de las tres subunidades que conforman las proteínas G, formando el trímero alpha-beta-gamma, y que se trata de la forma inactivada de la proteína. En concreto, RGS19 posee una alta afinidad por subunidades G-alpha_{i3} activadas, las cuales se han encontrado en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi (De Vries *et al.*, 1995). Estudios anteriores describieron el efecto inhibitorio de las subunidades G-alpha i sobre sus efectores, entre los que se encuentra la enzima adenilato ciclasa (Hunt *et al.*, 1994). Este efecto inhibitorio conduce a una disminución de los niveles de AMPc, segundo mensajero producido por dicha enzima. Al aumentar los niveles de expresión de *RGS19*, aumentarán los niveles de AMPc, y debido a que la subunidad G-alpha_{i3} se encontrará unida a las subunidades beta y gamma por el efecto de RGS19 sobre ella, y no se llevará a cabo el efecto inhibitorio de esta subunidad sobre la enzima adenilato ciclasa y por tanto los niveles de AMPc serán mayores. Altas

concentraciones de AMPc producen la activación de la proteína quinasa A, PKA, que posee un papel inhibitorio sobre la autofagia.

Como podemos observar en las Figuras 5 y 6, en ambos tipos celulares en ausencia de glucosa hay una mayor expresión de *RGS19* comparada con la expresión en presencia de glucosa. Esta diferencia de expresión podría explicar la inducción de la autofagia en presencia de glucosa. Sin embargo, esta expresión es independiente de p38 MAPK puesto que las diferencias se mantienen cuando añadimos el inhibidor SB203580. Además, no podemos considerar significativa la diferencia de expresión, que se trata de un 40% aproximadamente en las células HEK293T (Figura 6A) y de un 15% aproximadamente en las células NIH/3T3 (Figura 5A), puesto que el valor de RQ no es mayor a 2 (ver apartado 4.1.). Por todo ello, pese a que se ha descrito su papel como inductor de la autofagia (Ogier-Denis *et al.*, 1997 y 2000), al ser fosforilado por ERK1/2, y como sugerían los resultados obtenidos en el PCR Array, podemos descartar la implicación del gen en la regulación de la autofagia por glucosa mediante p38 MAPK.

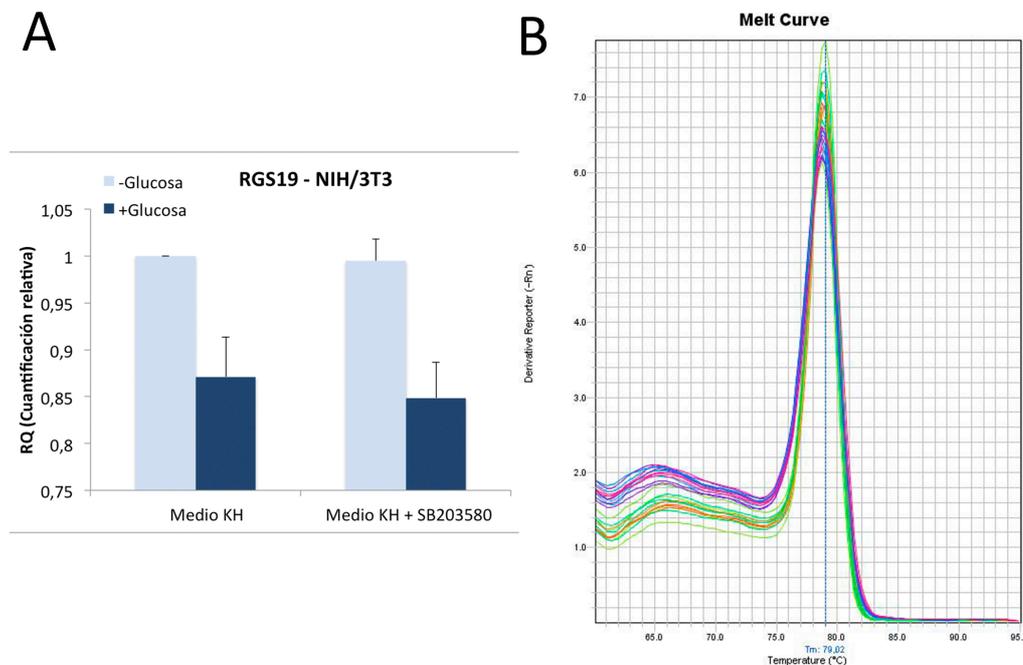


Figura 5. Expresión relativa del gen *RGS19* en células NIH/3T3. A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (79°C) y el gen *RGS19* (79°C).

El gen *BCL2* codifica la proteína BCL2 que, como comentamos en el apartado 4.1., es fosforilada por p38 MAPK, liberando a BECLIN1 e induciendo la autofagia. Sin embargo, en el análisis de los niveles de expresión del gen *BCL2*, que se evaluó en células NIH/3T3 únicamente, no se pueden observar diferencias significativas puesto que la expresión del gen permanece prácticamente inalterada en presencia o ausencia de glucosa y en presencia o ausencia del inhibidor SB203580 (Figura 7A). Estos resultados nos llevan a descartar el gen como regulador autofágico de la inducción por glucosa mediante la quinasa p38 MAPK.

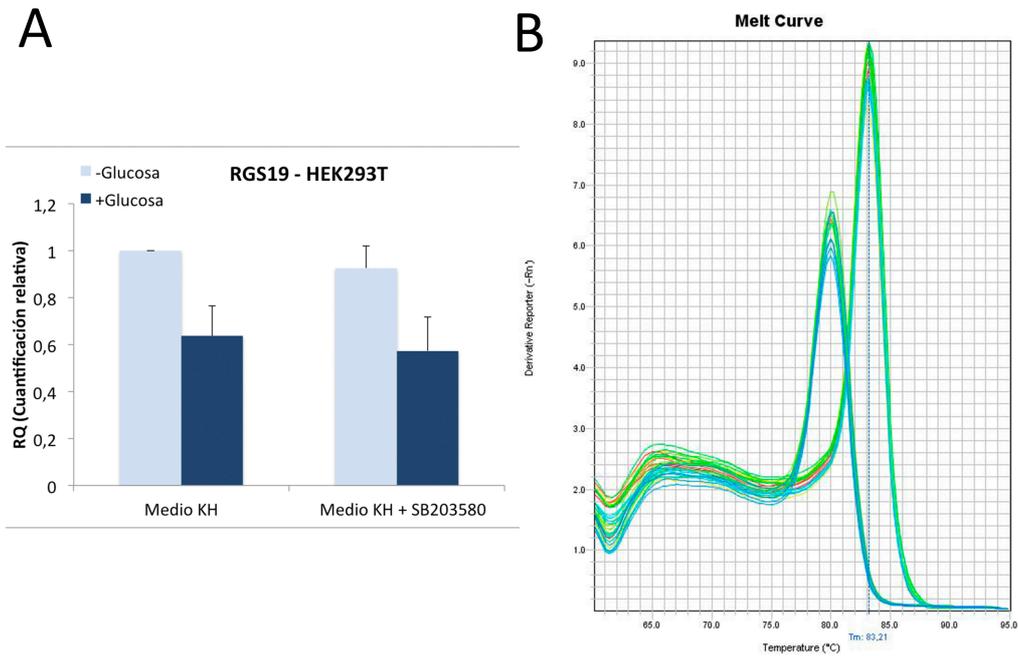


Figura 6. Expresión relativa del gen *RGS19* en células HEK293T. A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (80°C) y el gen *RGS19* (83°C).

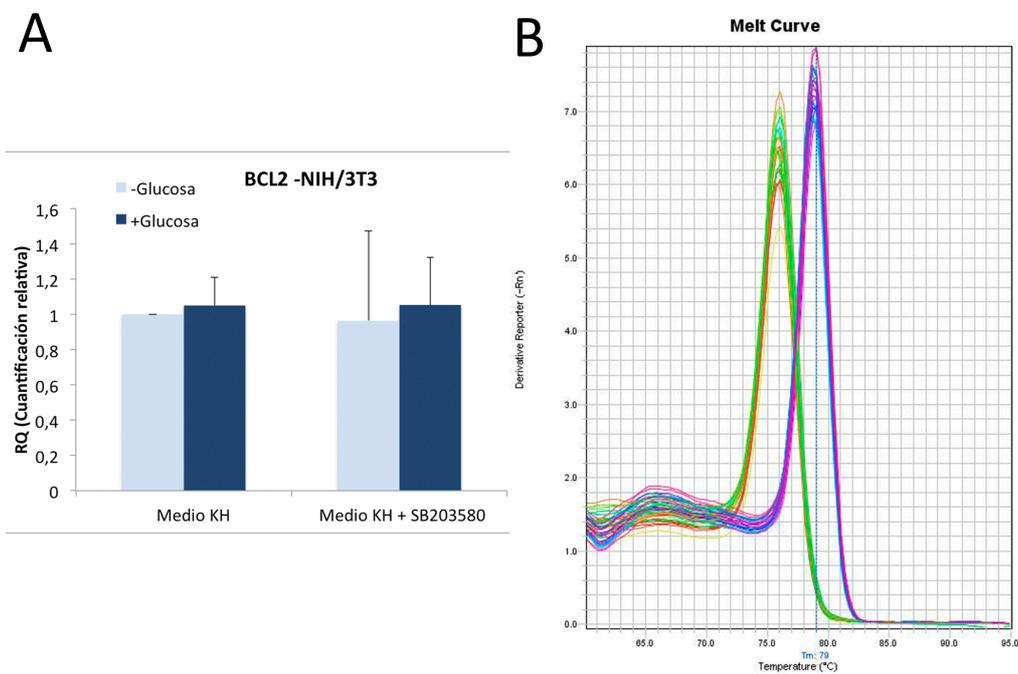


Figura 7. Expresión relativa del gen *BCL2* en células NIH/3T3. A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (79°C) y el gen *BCL2* (76°C).

El siguiente gen analizado fue *AKT1*, que tras su activación por parte de la quinasa PI3K, activa a mTOR y este último inhibe la autofagia. Sin embargo, la inducción de la autofagia por glucosa se ha descrito como un proceso independiente de mTOR (Moruno-Manchón *et al.*, 2013), y por ello el posible efecto inhibitor que sugieren los datos del PCR Array debía ser también independiente de mTOR.

El gen *AKT1* mostró una expresión muy similar en ambos tipos celulares y en todas las condiciones, como muestran las Figuras 8 y 9. En las células NIH/3T3 (Figura 8A) no se encontraron diferencias en la expresión en ninguna condición. La diferencia de expresión entre presencia/ausencia de glucosa en las células HEK293T (Figura 9A) tuvo un valor alrededor de un 20-30% más en ausencia de glucosa, y como ocurría con el gen anterior esa diferencia en la expresión se mantiene cuando añadimos el inhibidor SB203580. Por ello, queda descartado *AKT1* como posible regulador de la autofagia inducida por glucosa vía p38 MAPK.

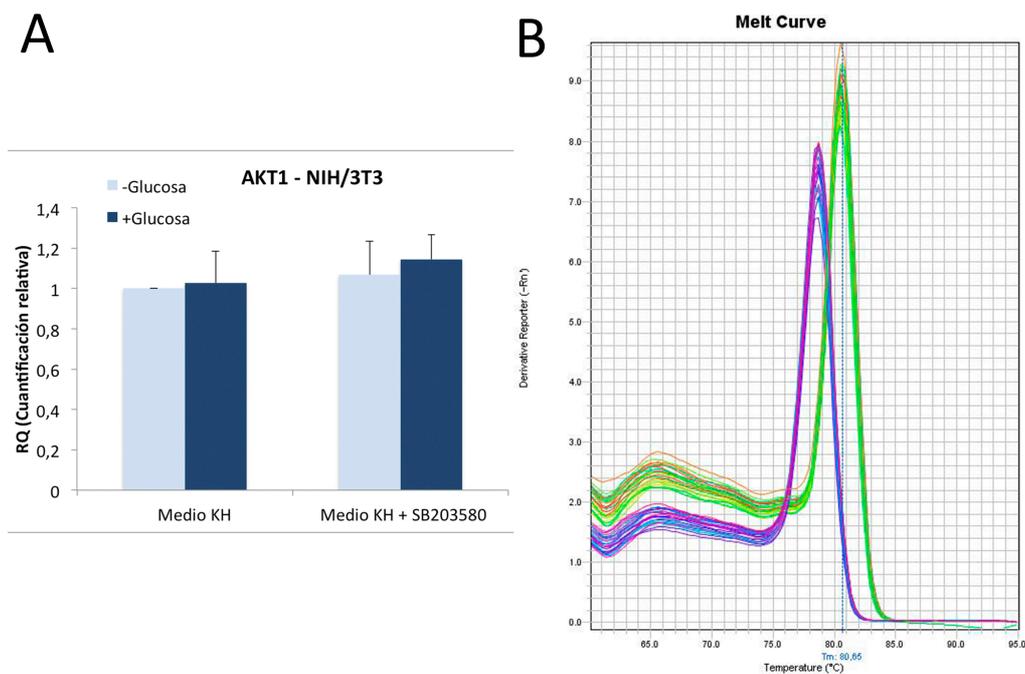


Figura 8. Expresión relativa del gen *AKT1* en células NIH/3T3. A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (79°C) y el gen *AKT1* (81°C).

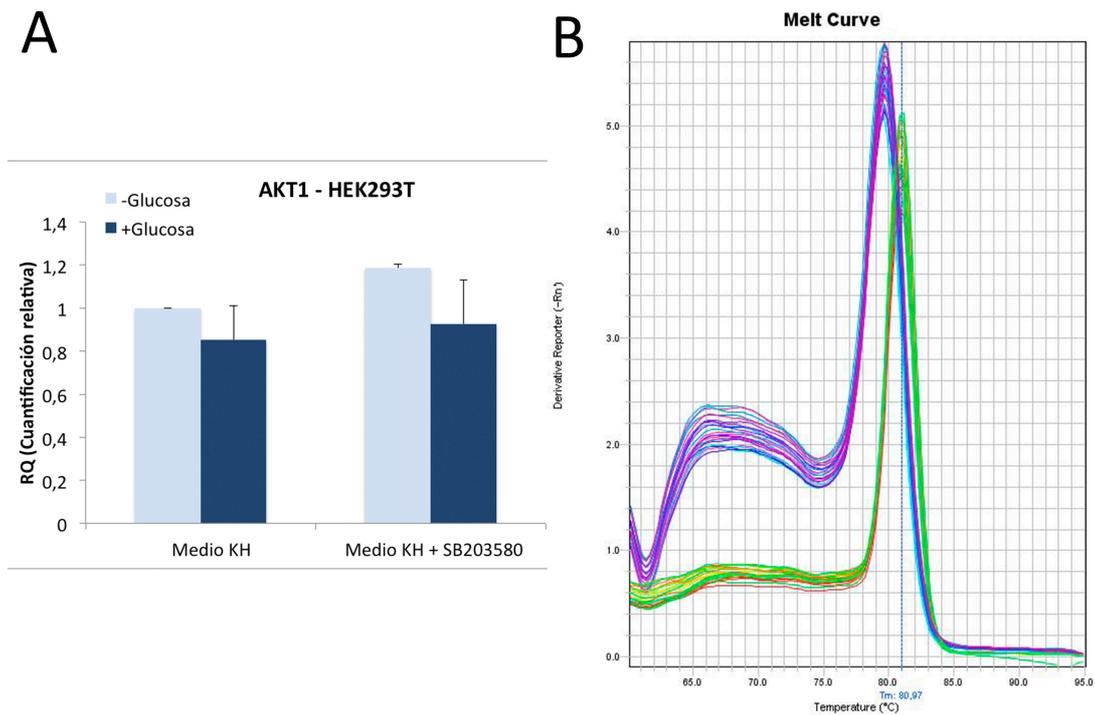


Figura 9. Expresión relativa del gen *AKT1* en células HEK293T. A) Histograma representativo de la cantidad de mRNA relativa. B) La curva de disociación muestra dos productos: el gen control actina (80°C) y el gen *AKT1* (81°C).

4.3. Estudio de los mecanismos que activan la proteína p38 MAPK

A continuación quisimos estudiar el mecanismo por el que se producía la activación de p38 MAPK. Al tratarse de una quinasa típica de estrés, analizamos si existía algún tipo de estrés en la célula que pudiera producir su activación, en concreto estrés oxidativo y estrés de retículo.

El incremento de los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) tiene lugar cuando aumenta el transporte electrónico en las mitocondrias, y generalmente este aumento en el nivel de estrés oxidativo permite la activación de ERKs, JNKs o p38 MAPKs (Son *et al.*, 2011). Por ello, en el laboratorio se estudiaron los niveles de ROS tras la adición de glucosa, para comprobar si se producía un aumento en los niveles de ROS que pudiera ser responsable de la activación de la quinasa en el proceso. Sin embargo, los resultados fueron negativos, sin obtener un aumento significativo en los niveles de ROS cuando se añadía glucosa (resultados no mostrados).

Por otro lado, varios estudios han descrito el efecto inductor del estrés de retículo endoplasmático (RE) sobre la autofagia mediante la activación de p38 MAPK (ver por ejemplo: Shimada *et al.*, 2011). Por ello, una vez descartado el estrés oxidativo como responsable de la activación de la quinasa, nos propusimos evaluar los niveles de estrés de retículo endoplasmático.

Procesos patológicos o fisiológicos que interfieren en el plegamiento de las proteínas en el RE causan estrés de RE y activan la vía de señalización UPR (respuesta a proteínas mal plegadas). Una de las proteínas más utilizadas para evaluar el estrés de RE es CHOP (proteína homóloga de C/EBP). CHOP se encarga de la regulación de varios factores de transcripción de la familia C/EBP, suprimiendo o activando la expresión de ciertos genes que promueven las síntesis proteica, por ejemplo, aunque poco se conoce acerca de los mecanismos que activa CHOP. Debido a que recientemente se ha puesto de manifiesto la variabilidad en la especificidad de los anticuerpos que detectan CHOP, añadimos un control positivo para comprobar la especificidad del anticuerpo por CHOP. El control positivo fue la molécula tapsigargina (1 μ M durante 5 horas) que bloquea la bomba ATPasa del RE y de este modo, inducimos de manera artificial el estrés de RE (Samali *et al.*, 2010).

Antes de analizar los niveles de CHOP, comprobamos que los niveles de LC3-II correspondían a la inducción de la autofagia por glucosa (Figura 10A) como ha sido descrito por Moruno-Manchón (2013) para asegurar que la posible inducción de CHOP estaba relacionada con la inducción del proceso autofágico por glucosa. En la Figura 10C observamos que esta inducción se correlaciona con el aumento de los niveles de p38 activa. Como podemos observar en la Figura 10B la presencia de glucosa induce la señalización de UPR mediante el aumento de CHOP.

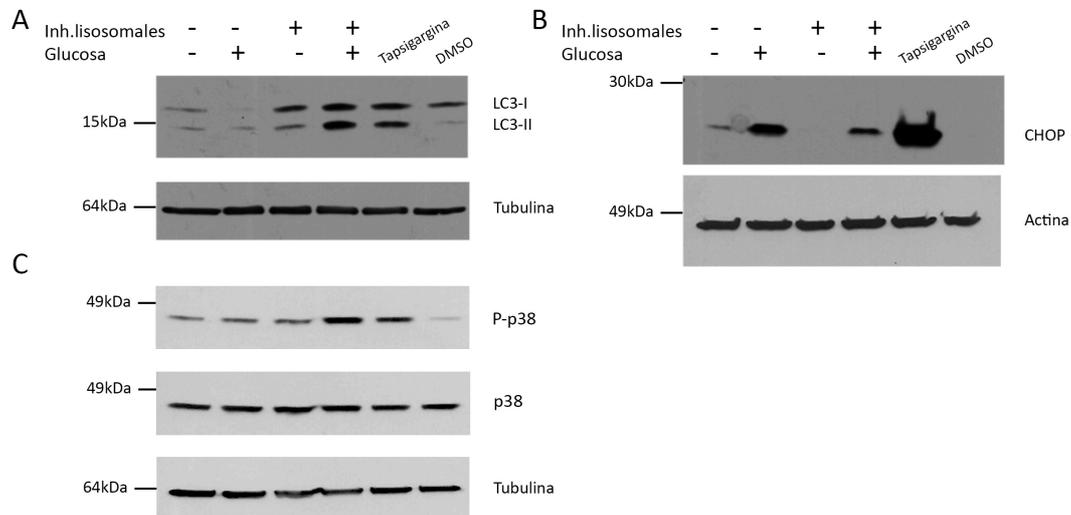


Figura 10. La inducción de la autofagia por glucosa aumenta los niveles de CHOP y activa la señalización UPR.

Discusión

5. DISCUSIÓN

En un trabajo previo se había puesto de manifiesto que la administración de glucosa a células de mamífero tras un periodo de ayuno induce la autofagia, y que esta inducción depende de la activación de la quinasa activada por mitógeno p38 MAPK (Moruno-Manchón *et al.*, 2013). Sin embargo, no se conocen en detalle las vías de señalización involucradas en la regulación del proceso. En este trabajo, nos planteamos investigar los mecanismos de regulación implicados en la inducción de la autofagia por glucosa. Con esta finalidad, en primer lugar analizamos los resultados de un PCR Array en el que se comparó la expresión de células MEFs (*Mus musculus*) “knock-out” y “wild-type” para el gen *p38 MAPK*, en presencia o ausencia de glucosa. A partir de estos datos seleccionamos cuatro genes: *Ifna4*, *Rgs19*, *Akt1* y *Bcl2*, posibles candidatos de la regulación de la autofagia por glucosa. Mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) realizamos el estudio de la expresión relativa de cada uno de los genes en las diferentes condiciones y en distintas líneas celulares.

Estudios previos mostraron que la acción de p38 sobre la autofagia puede tener lugar al fosforilar BCL2 (De Chiara *et al.*, 2006), permitiendo la disociación de BECLIN1 del complejo BCL2-BECLIN1 para iniciar la autofagia. Nuestros resultados muestran que, en presencia de glucosa, la expresión relativa de *BCL2* en células NIH/3T3 no cambia, por lo que no pudimos confirmar su implicación en la regulación del proceso. No obstante, aunque p38 no regule la expresión de *BCL2*, no podemos descartar que actúe a nivel postraduccional, fosforilando BCL2, aunque datos preliminares no apoyan esta función (datos no mostrados). Por ello, sería necesario investigar más en profundidad la fosforilación de BCL2 en presencia de glucosa.

Los datos obtenidos en el array parecían indicar un efecto inhibitorio por parte de AKT1 sobre la autofagia. AKT1, tras ser activada por PI3K, conduce a la activación del complejo mTORC1 que inhibe la autofagia (Yang y Klionsky, 2010). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, la activación de la autofagia por glucosa es independiente de mTOR (Moruno-Manchón *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el análisis de su expresión relativa en células NIH/3T3 Y HEK293T no nos permitieron poder vincularlo a la regulación del proceso, en concordancia con los estudios previos.

Un estudio reciente ha demostrado un efecto inductor de los interferones tipo I (*IFNA4*, entre otros) sobre la autofagia (Schmeisser *et al.*, 2013). Estos datos, en concordancia con los obtenidos en el array, demuestran una nueva actividad por parte de los IFNs, no conocida hasta el momento. Sin embargo los resultados de su expresión relativa no muestran la misma relación con la autofagia, ya que observamos una inducción de la expresión de *IFNA4* en células HEK293T en presencia de glucosa cuando p38 está inhibido, sugiriendo un efecto inhibitorio por parte de la quinasa sobre la citocina. Sin embargo, estos resultados están en oposición con otros estudios en los que se muestra que la fosforilación de p38 induce la producción de citocinas (Platanias, 2003).

El regulador de la señalización de proteínas G, *RGS19*, ha mostrado un efecto inductor sobre la autofagia (Ogier-Denis *et al.*, 1997). Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos en el array, los cuales sugerían un efecto inductor de *RGS19* sobre la autofagia al mostrar una expresión diferencial elevada en presencia de glucosa y p38 comparada con la situación en ausencia de la quinasa. Por el contrario, nuestros resultados muestran una inducción en la expresión de *RGS19* en ausencia de glucosa, siendo este efecto independiente de la actividad de p38.

Tras el análisis de la expresión relativa de los genes seleccionados como posibles candidatos, creemos necesario avanzar en el estudio de los mismos. Para ello, consideramos esencial el análisis de la expresión en células *p38^{+/+}* y *p38^{-/-}* de al menos *IFNA4*, *BCL2* y *RGS19*, puesto que los datos bibliográficos y los obtenidos en el array demuestran la implicación de los mismos en la regulación de la autofagia. De este modo, descartaríamos resultados enmascarados que pueda provocar el empleo del inhibidor de p38, SB203580. A su vez, para poder determinar si realmente están o no implicadas en la regulación de la autofagia por glucosa, proponemos estudiar el efecto de su silenciamiento mediante RNA de interferencia en la inducción de autofagia.

Quisimos estudiar también el mecanismo por el que se produce la activación de la quinasa p38 MAPK. Al tratarse de una quinasa típica de estrés analizamos diferentes tipos de estrés que pudieran estar implicados. Estudios previos realizados en el laboratorio por Moruno-Manchón descartaron el estrés oxidativo como posible activador de la quinasa; por ello, nos propusimos analizar los niveles de estrés de retículo endoplasmático. Nuestros resultados mostraron una activación de UPR mediante el aumento de los niveles de CHOP en presencia de glucosa, en concordancia con la activación de p38. En levaduras, estudios previos han puesto de manifiesto la activación de p38 MAPK tras un estrés de RE prolongado donde la señalización UPR no es suficiente para restaurar el correcto plegamiento de las proteínas en el RE (Bicknell *et al.*, 2010). En ese mismo estudio se observó una translocación de p38 al núcleo sugiriendo una regulación génica para activar la autofagia. En mamíferos, también se ha relacionado el estrés de RE con la inducción de la fosforilación de p38 (Kim *et al.*, 2010). Estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos tanto en la translocación de p38 al núcleo como en el aumento de los niveles de estrés de RE.

Tanto la señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas como la autofagia inducida por glucosa son procesos de gran relevancia debido a su implicación en ciertas situaciones patológicas, como comentamos en la Introducción. Están siendo desarrolladas multitud de terapias antitumorales, entre las que se encuentran los agentes anticancerígenos dirigidos a modular la respuesta a proteínas mal plegadas/autofagia. Por todo esto, consideramos esencial la investigación de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa, entre los que se encuentra la señalización a proteínas mal plegadas, como hemos demostrado. Al determinar los genes y vías de señalización involucrados en el proceso permitiríamos un avance en el diseño de nuevas terapias.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

A partir de los objetivos planteados inicialmente en este trabajo podemos resumir las conclusiones en los siguientes puntos:

1. La quinasa activada por mitógeno p38 es activada por la señalización de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), inducida por el estrés de retículo endoplasmático (RE) en presencia de glucosa.
2. La expresión de BCL2 y AKT1 no varía de manera diferencial en presencia y ausencia de glucosa y, por tanto, no pueden ser considerados reguladores de la autofagia inducida por este nutriente.
3. El gen RGS19 aumenta su expresión en ausencia de glucosa, manteniendo esta expresión diferencial cuando p38 MAPK está inhibida. Por ello, la expresión de RGS19 se puede considerar independiente de esta quinasa, o bien puede actuar en la misma cascada de señalización corriente arriba p38 MAPK.
4. La expresión de IFNA4 aumenta de manera significativa en presencia de glucosa cuando p38 MAPK no esta activada, por lo que descartamos su implicación en la regulación de la autofagia por glucosa. Este resultado podría explicarse si p38 MAPK reprimiese la expresión de IFNA4 cuando la quinasa esta activada.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

ALERS, S.; LOFFLER, A. S.; WESSELBORG, S. Y STORK, B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell Biol.*, 32(1): 2-11.

AXE, E. L.; WALKER, S. A.; MANIFAVA, M.; CHANDRA, P.; RODERICK, H. L.; HABERMANN, A.; GRIFFITHS, G. Y KTISTAKIS.N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 182(4): 685-701.

BEKISZ, J.; SCHMEISSER, H.; HERNANDEZ, J.; GOLDMAN, N.D. Y ZOON, K.C. (2004) Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors*, 22(4): 243-251.

BICKNELL, A.A.; TOURTELLOTE, J. Y NIWA, M. (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J. Biol. Chem.*, 285(23): 17545-17555.

CASAREJOS, M. J.; SOLANO, R. M.; GÓMEZ, A.; PERUCHO, J.; DE YEBENES, J. G. Y MENA, M.A. (2011) The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.*, 58: 512-520.

CHEN, Y. Y KLIONSKY, D. J. (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 124: 161-170.

CHEUNG, Z.H. Y IP, N.Y. (2009) The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. *Mol. Brain*, 2: 29.

CORBATÓN-ANCHUELO, A.; CUERVO-PINTO, R. Y SERRANO-RÍOS, M. (2007) La diabetes mellitus tipo 2 como enfermedad cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*, 7(A): 9-22.

CUADRADO, A. Y NEBREDÁ, A.R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.*, 429(3): 403-417.

DE CHIARA, G.; MARCOCCI, M.E.; TORCIA, M.; LUCIBELLO, M.; ROSINI, P.; BONINI, P.; HIGASHIMOTO, Y.; DAMONTE, G.; ARMIROTTI, A.; AMODEI, S.; PALAMARA, A.T.; RUSSO, T.; GARACI, E. Y COZZOLINO, F. (2006) Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: Identification of target sites and biologic consequences. *J. Biol. Chem.*, 281(30): 21353-21361.

DE VRIES, L.; MOUSLI, M.; WURMSER, A. Y FARQUHAR, M.G. (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(25): 11916-11920.

EBRAHIMI-FAKHARI, D.; WAHLSTER, L. Y MCLEAN, P.J. (2012) Protein degradation pathways

in Parkinson's disease—curse or blessing. *Acta Neuropathol.*, 124(2): 153-172.

EZAKI, J.; MATSUMOTO, N.; TAKEDA-EZAKI, M.; KOMATSU, M.; TAKAHASHI, K.; HIRAOKA, Y.; TAKA, H.; FUJIMURA, T.; TAKEHANA, K.; YOSHIDA, M.; IWATA, J.; TANIDA, I.; FURUYA, N.; ZHENG, D.; TADA, N.; TANAKA, K.; KOMINAMI, E. Y UENO, T. (2011) Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*, 7(7): 727-736.

GODIN, J.D.; POIZAT, G.; HICKEY, M.A.; MASCHAT, F. Y HUMBERT, S. (2010) Mutant huntingtin-impaired degradation of β -catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *Embo J.*, 29: 2433-2445.

GONZÁLEZ, C. D.; LEE, M. S.; MARCHETTI, P.; PIETROPAOLO, M.; TOWNS, R.; VACCARO, M.I.; WATADA, H. Y WILEY, J.W. (2011) The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*, 7(1): 2-11.

HARIHARAN, N., MAEJIMA, Y., NAKAE, J., PAIK, J., DEPINHO, R. A. Y SADOSHIMA, J. (2010) Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ Res.*, 107: 1470-1482.

HERSHKO, A. AND CIECHANOVER, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 425-479.

HUNT, T.W.; CARROLL, R.C. Y PERALTA, E.G. (1994) Heterotrimeric G proteins containing G α i3 regulate multiple effector enzymes in the same cell. Activation of phospholipases C and A2 and inhibition of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 269(47): 29565-29570.

IHARA, Y.; MORISHIMA-KAWASHIMA, M. Y NIXON, R. (2012) The ubiquitin proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(8): a006361

IP, A.K.C.; TSO, P.H.; LEE, M.M.K. Y WONG, Y.H. (2012) Elevated expression of RGS19 impairs the responsiveness of stress-activated protein kinases to serum. *Mol. Cell. Biochem.*, 362: 159-168.

KANE, P.M. (2006). The Where, When, and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(1): 177-191.

KANETO, H.; NAKATANI, Y.; KAWAMORI, D.; MIYATSUKA, T. Y MATSUOKA, T. (2004) Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Rev. Diabet. Stud.*, 1(4): 165-174.

KANG, R.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. Y TANG, D. (2011) The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 18(4): 571-580.

KIM D.S.; KIM J.H.; LEE G.H.; KIM H.T.; LIM J.M.; CHAE S.W.; CHAE H.J. Y KIM H.R. (2010) p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(4): 545-549.

KIMURA, S.; NODA, T. Y YOSHIMORI, T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.*, 33: 109-122.

KNECHT, E.; AGUADO C.; CARCÉL J.; ESTEBAN, I.; ESTEVE J.M.; GHISLAT, G.; MORUNO, J.F.; VIDAL, J.M. Y SÁEZ, R. (2009). Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 2427-2443.

KOBAYASHI, S.; XU, X.; CHEN, K.; AND LIANG, Q. (2012) Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8, 577-592.

KRAFT, C.; DEPLAZES, A.; SOHRMANN, M. Y PETER, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.*, 10: 602-610.

LANG, M.J.; MARTINEZ-MARQUEZ, J.Y.; PROSSER, D.C.; GANSER, L.R.; BUELTO, D.; WENDLAND, B. Y DUNCAN, M.C. (2014). Glucose starvation inhibits autophagy via vacuolar hydrolysis and induces plasma membrane internalization by down regulating recycling. *J. Biol. Chem.* 289(24): 16736-16747.

LIANG, X.H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKES, B.; HIBSHOOSH, H. Y LEVINE, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1. *Nature*. 402(6762)

LIU B.; CHENG Y.; ZHANG B.; BIAN H.J. Y BAO J.K. (2009) Polygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett.*, 275: 54-60.

MAH, L.I. Y RYAN, K.M. (2012) Autophagy and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4(1): a008821.

MAJESKI, A.E. Y DICE, J. F. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 2435-2444.

MOREAU, K.; FLEMING, A.; IMARISIO, S.; LOPEZ-RAMIREZ, A.; MERCER, J.L.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, M.; BENTO, C.F.; PURI, C.; ZAVODSKY, E.; SIDDIQI, F.; LAVAU, C.P.; BETTON, M.; O'Kane, C.J.; WECHSLER, D.S. Y RUBINSZTEINA, D.C. (2014) PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat. Commun.* 5: 4998.

MORUNO-MANCHÓN, J.F.; PÉREZ, E. Y KNECHT, E. (2013). Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway. *Biochem. J.*, 449: 497-506.

OGIER-DENIS, E.; PATTINGRE, S.; EL BENNA, J. Y CODONGO, P. (2000) Erk1/2-dependent phosphorylation of Gα-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, 275: 39090-39095.

OGIER-DENIS, E.; PETIOT, A.; BAUVY, C. Y CODONGO, P. (1997) Control of the expression and activity of the Gα-interacting protein (GAIP) in human intestinal cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 24599-24603.

PALMER, A.; RIVETT, A. J.; THOMSON, S.; HENDIL, K. B.; BUTCHER, G. W.; FUERTES, G. Y KNECHT, E. (1996) Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.*, 316: 401-407.

PAPINSKI, D. Y KRAFT, C. (2014) Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9. *Autophagy*, 10(7): 1338-1340.

PATTINGRE, S.; TASSA, A.; QU, X.; GARUTI, R.; LIANG, X. H.; MIZUSHIMA, N.; PACKER, M.; SCHNEIDER, M. D. Y LEVINE, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6): 927-939.

PLATANIAS, L.C. (1995) Interferons: laboratory to clinic investigations. *Curr. Opin. Oncol.*, 7(6): 560-565.

PLATANIAS, L.C. (2003) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. *Pharmacol. Ther.*, 98: 129-142.

RAVIKUMAR, B.; STEWART, A.; KITA, H.; KATO, K.; DUDEN, R.; ET AL. (2003) Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 985-994.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, J. A.; RODRÍGUEZ, L.; CASAREJOS, M. J.; SOLANO, R. M.; GÓMEZ, A.; PERUCHO, J.; CUERVO, A.M.; GARCÍA DE YÉBENES, J. Y MENA, M.A. (2010) Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol. Dis.*, 39: 423-438.

RUBINSZTEIN1, D.; CODOGNO2, P. Y LEVINE, B. (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Na.t Rev. Drug Discov.*, 11(9): 709-730.

SAKAI, Y.; OKU, M.; VAN DER KLEI, I.J. Y KIEL, J.A. (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763: 1767-1775.

SAMALI, A.; FITZGERALD, U.; DEEGAN, S. Y GUPTA, S. (2010) Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Intern. J. Cel. Biol.*, 2010: 830307.

SARKAR, S.; DAVIES, J. E.; HUANG, Z.; TUNNAcliffe, A. Y RUBINSZTEIN, D. C. (2007) Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J. Biol. Chem.*, 282: 5641-5652.

SCHMEISSER, H.; FEY, S.B.; HOROWITZ, J.; FISCHER, E.R.; BALINSKY, C.A.; MIYAKE, K.; BEKISZ, J.; SNOW, A.L. Y ZOON, K.C. (2013) Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy* 9(5): 683-696.

SCHWORER, C.M. Y MORTIMORE, G.E. (1979) Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76(7): 3169-3173.

SHIBUTANI, S.T. Y YOSHIMORI, T. (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Research*, 24: 58-68.

SHIMADA, Y.; KOBAYASHI, H.; KAWAGOE, S.; AOKI, K.; KANESHIRO, E.; SHIMIZU, H.; ETO, Y.; IDA, H. Y OHASHI, T. (2011) Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38 MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546>T mutation. *Mol. Genet. Metab.*, 104(4): 566-573.

SIDEROVSKI, D.P. Y WILLIARD, F.S. (2005) The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.*, 1(2): 51-66.

SON, Y.; CHEONG, Y.; KIM, N.; CHUNG, H.; KANG, D. Y PAE, H. (2011) Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways?. *J. Signal Transduct.*, 2011: 792639.

WEBBER, J.L. Y TOOZE, S.A. (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.*, 29(1): 27-40.

YAMAMOTO, H.; KAKUTA, S.; WATANABE, T.M. KITAMURA, A.; SEKITO, T.; KONDO-KAKUTA, C.; ICHIKAWA, R.; KINJO, M. Y OHSUMI, Y. (2014) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.*, 198(2): 219-233.

YANG, Z. Y KLIONSKY, D.J. (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 335: 1-32.

ZHANG, H.; CHEN, G.G.; ZHANG, Z.; CHUN, S.; LEUNG, B.C. Y LAI, P.B. (2012) Induction of autophagy in hepatocellular carcinoma cells by SB203580 requires activation of AMPK and DAPK but not p38 MAPK. *Apoptosis*, 17: 325-334

ZHOU, J.; LIAO, W.; YANG, J.; MA, K.; LI, X.; WANG, Y.; WANG, D.; WANG, L.; ZHANG, Y.; YIN, Y.; ZHAO, Y. Y ZHU, W. (2012) FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signalling pathway. *Autophagy*, 8(12): 1712-1723.

Anexos

ANEXO 1. Oligonucleótidos de cada gen y organismo empleados en la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

	Gen	Organismo	Sentido/Antisentido	Secuencia (5'-3')	Origen	Referencia GenBank
Gen control	β-Actina	Homo sapiens	Sentido	TGAGCGCGGCTACAGCTT	*PrimerExpress	NM_001101.3
			Antisentido	TCCTTAATGTCACGCACGATT		
		Mus musculus	Sentido	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	*PrimerExpress	NM_007393.2
			Antisentido	ACCAGAGGCATACAGGGACA		
Gen candidato	RGS19	Homo sapiens	Sentido	GGCTCATCTACGAGGACTACGT	OriGene-HP203282	NM_001039467.1
			Antisentido	CGGTGCATGAGCGTGTAGATCT		
		Mus musculus	Sentido	GCAATCCCTGCTGCTTATGC	*PrimerExpress	NM_026446.4
			Antisentido	GTTGCCGTTCTTGTTCCA		
	IFNA4	Homo sapiens	Sentido	GTTCCAGAAGGCTCAAGCCATC	OriGene-HP214028	NM_021068.2
			Antisentido	TAGGAGGCTCTGTTCCCAAGCA		
		Mus musculus	Sentido	AAGGACAGGAAGGATTTGGATT	*PrimerExpress	NM_010504.2
			Antisentido	GAGCCTTCTGGATCTGTTGGTTAT		
	AKT1	Homo sapiens	Sentido	TGGACTACCTGCACTCGGAGAA	OriGene-HP230218	NM_005163.2
			Antisentido	GTGCCGCAAAGGTCTTCATGG		
		Mus musculus	Sentido	GGACTACTTGCACTCCGAGAAG	OriGene-MP216949	NM_001165894.1
			Antisentido	CATAGTGGCACCGTCCTTGATC		
BCL2	Mus musculus	Sentido	TGGGATGCCTTTGTGGA ACTA	*PrimerExpress	NM_009741.4	
		Antisentido	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA			