



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO  
MOLECULAR DE UN TIPO DE MUERTE  
CELULAR NO APOPTÓTICA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A**

P R E S E N T A:

**JIMENA BOUZAS RODRÍGUEZ**

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN



2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Bouzas  
Rodríguez  
Jimena  
Tel 5550 6797  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Susana  
Castro  
Obregón

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Luis Fernando  
Covarrubias  
Robles

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Julio  
Morán  
Andrade

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Susana  
Lopez  
Charreton

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Alejandro  
Zentella  
Dehesa

### 7. Datos del trabajo escrito

“Caracterización del mecanismo molecular de un tipo de muerte celular no apoptótica”.

67 pp.  
2006

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
2. Tipos de muerte celular programada.....	5
3. Autofagia.....	9
3.1 Características y función.....	9
3.2 Mecanismo molecular y regulación de la autofagia.....	11
3.2.1 Regulación de la autofagia por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K).....	12
3.2.2 Sistemas de conjugación.....	13
a) <i>Conjugación de Atg12 con Atg5.....</i>	<i>13</i>
b) <i>Procesamiento postraduccional de LC3.....</i>	<i>15</i>
3.3 Técnicas para monitorear la autofagia.....	15
3.3.1 Microscopía electrónica.....	16
3.3.2 Métodos bioquímicos.....	16
a) <i>Cuantificación de la degradación de proteínas.....</i>	<i>16</i>
b) <i>Cuantificación del transporte de material citoplásmico hacia el lisosoma.....</i>	<i>16</i>
c) <i>Inhibidores de la PI3K.....</i>	<i>16</i>
3.3.3 Marcadores específicos de autofagia.....	17
a) <i>Tinción con monodansilcadaverina (MDC).....</i>	<i>17</i>
b) <i>Localización de GFP-LC3.....</i>	<i>17</i>
3.3.4 Inhibición específica de genes de autofagia.....	18
<b>III. ANTECEDENTES.....</b>	<b>19</b>
1. Modelos de MCP vesicular no apoptótica.....	19
1.1 Muerte inducida por SP/NK <sub>1</sub> R.....	19
1.1.1 Regulación de la MCP por Nur77.....	22
1.2 Muerte inducida por IGFIR.....	23
1.3 Muerte autofágica inducida por inhibición de la caspasa 8.....	24
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
1. Líneas y cultivos celulares.....	26

2. Modelos de MCP.....	28
3. Interferencia de RNA (iRNA).....	30
4. <i>Western Blot</i> .....	31
5. Análisis de la distribución intracelular de LC3.....	34
6. Análisis estadístico.....	35
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
1. Estandarización de los modelos de MCP.....	37
2. Efecto de LY294002 en la muerte inducida por SP/NK <sub>1</sub> R e IGFIR.....	37
3. Inhibición de la maquinaria autofágica por iRNA.....	39
4. Modificación de LC3.....	42
4.1 Localización intracelular de LC3.....	42
4.2 Procesamiento de LC3.....	43
5. Participación de Nur77 en la autofagia inducida por inhibición de caspasas..	44
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
1. La inhibición química de la PI3K-III.....	48
2. La inhibición por iRNA de la PI3K-III previene la muerte inducida por NK <sub>1</sub> R e IGFIR.....	49
3. Modificación postraduccional de LC3.....	51
4. La muerte autofágica inducida por inhibición de caspasas requiere de Nur77.....	53
5. La autofagia como mecanismo de muerte y supervivencia.....	55
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>X. PESPECTIVAS</b> .....	<b>57</b>
<b>XI. APÉNDICE: MEDIOS Y SOLUCIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b> .....	<b>62</b>

## I. RESUMEN

La muerte celular programada (MCP) que se observa durante el desarrollo embrionario se clasifica por su morfología en tres tipos: Tipo I, también conocida como apoptosis, Tipo II o muerte autofágica, y Tipo III o muerte citoplásmica. La MCP que ocurre durante el envejecimiento y en asociación a enfermedades neurodegenerativas no es predominantemente apoptótica, sino que se asemeja a los tipos II y III. Entender el mecanismo molecular de estas formas alternativas de MCP es crucial en el estudio del desarrollo y para la generación de nuevos fármacos con potencial impacto en el tratamiento del cáncer y la degeneración.

Estudiamos dos modelos de MCP no apoptótica, iniciados por la actividad de receptores pertenecientes a familias diferentes: el receptor de neuroquininas tipo 1 (NK<sub>1</sub>R), acoplado a proteínas G, y receptor del factor de crecimiento I tipo insulina (IGFIR), que posee actividad de cinasa de tirosinas. Ambos inducen una forma de MCP similar a los tipos II o III, que está mediada por una cascada de cinasas que culmina en la fosforilación del receptor nuclear huérfano Nur77, cuya actividad es esencial en la progresión de la muerte. Se pretende determinar si la MCP inducida por estos receptores es de tipo autofágico específicamente, además de evaluar la capacidad de Nur77 para modular la muerte en un modelo de autofagia inducida por inhibición de caspasas.

Nuestros resultados sugieren que los receptores NK<sub>1</sub>R e IGFIR inducen muerte autofágica, dado que inhibir la cinasa promotora de autofagia PI3K-III químicamente o por interferencia de RNA se reduce la muerte. Además, ocurre una redistribución intracelular del marcador de autofagosomas LC3, que es característica de este tipo de muerte.

Dado que la expresión de mutantes dominantes negativas de Nur77 impide la muerte autofágica inducida por inhibición de caspasas, parece ser que este receptor nuclear funciona como un modulador central en la activación de diferentes programas de MCP.

*"Où est elle la Mort?  
Toujours future ou passée.  
À peine est elle présente  
que déjà elle n'est plus"*  
Anónimo

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Muerte celular programada

Durante el desarrollo de los organismos multicelulares es esencial que exista un balance adecuado entre el crecimiento, la división y la muerte celular, dado que la coordinación entre estos procesos asegura que los órganos, así como el individuo, alcancen un tamaño normal y funcionen adecuadamente. En el organismo adulto también ocurre muerte celular para mantener la homeostasis y como un evento terminal de muchas enfermedades degenerativas.

En este escrito denominaremos *muerte celular programada* (MCP) al proceso que ocurre de manera organizada, siguiendo un mecanismo molecular en el que la célula participa activamente en la ejecución de su propia muerte. En contraste, el término de *necrosis* se refiere a una forma de muerte celular pasiva y descontrolada.

La MCP en los animales está involucrada en la formación y degeneración de estructuras durante el desarrollo, el control del número celular y la eliminación de células dañadas o anormales. Para que se lleve a cabo, requiere en general de síntesis de proteínas activa y puede ser inhibida al interferir con la señalización intracelular, lo cual está lejos de ser una muerte accidental como la necrosis (revisado por Baehrecke, 2005).

La necrosis ocurre, por ejemplo, cuando el nivel de ATP celular no es suficiente para mantener a la célula viva. Esta forma de muerte se caracteriza por la presencia de edema celular, por la pérdida de balance iónico y la disrupción de la membrana plasmática, que ocasionan la liberación de componentes celulares, generando la activación de la respuesta inflamatoria. Durante este proceso ocurren cambios en la morfología nuclear, pero no se observa condensación de la cromatina (revisado por Edinger, *et al.*, 2004; **Figura 1d**).

Anteriormente se consideraba la apoptosis como sinónimo de MCP, ya que fue caracterizada, con base en criterios morfológicos, como una forma de muerte distinta a la necrosis. Sin embargo, actualmente se reconoce que estos dos conceptos no son suficientes para describir todos los tipos de muerte celular que se observan durante el desarrollo, y que durante el envejecimiento el tipo de muerte predominante no es la apoptosis. Por ejemplo, la mayor parte de la muerte neuronal que ocurre en la neurodegeneración no presenta características apoptóticas, como es el caso de la enfermedad de Huntington (Turmaine, *et al.* 2000) o la Esclerosis Amiotrófica Lateral (ALS) (Dal Canto y Gurney, 1994). De igual modo, la muerte celular que se induce por isquemia no tiene morfología apoptótica (Majno y Joris, 1995).

La muerte no apoptótica es esencial en procesos de diferenciación y desarrollo en organismos diversos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Debido a su amplia distribución a lo largo de la escala animal, se ha propuesto que este tipo de muerte precedió al surgimiento de la apoptosis (revisado por Levine, 2004).

No se conocen del todo las bases bioquímicas de estas formas alternativas de MCP, por lo que su estudio tiene implicaciones en la comprensión de aspectos evolutivos de los programas de muerte, así como en el conocimiento de los procesos que ocurren durante el desarrollo, la neurodegeneración y el cáncer.

El aumento en la expectativa de vida de los humanos ha ocasionado el incremento de enfermedades asociadas a la senilidad, como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, por lo que es de actual relevancia estudiar los mecanismos moleculares de la muerte celular para el diseño de nuevas terapias contra estas enfermedades.

## **2. Tipos de muerte celular programada**

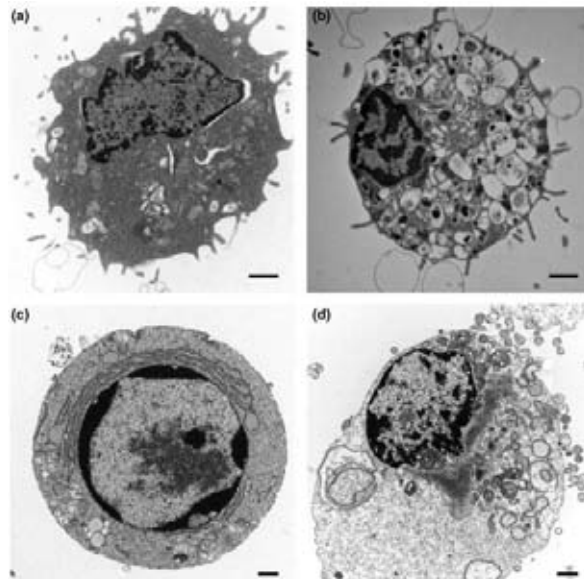
En un estudio ultraestructural de tejidos embrionarios de ratón se describieron, basándose en criterios morfológicos y en la función que desempeñan los lisosomas como organelos encargados de la degradación, tres tipos distintos de muerte celular que ocurren durante el desarrollo: la muerte tipo I, o apoptosis; la



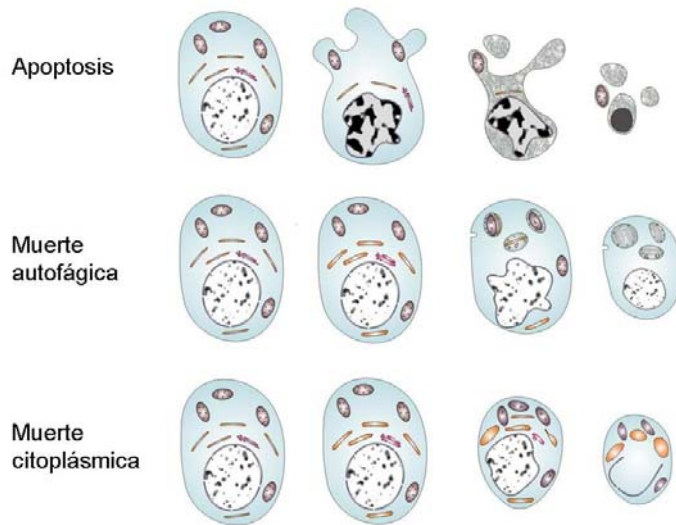
muerte tipo II, denominada autofagia y la muerte tipo III, conocida como muerte citoplásmica (Clarke, 1990; **Figura 2**).

La muerte tipo I, que previamente se había nombrado *apoptosis* o muerte nuclear, es la mejor caracterizada. Inicia con la condensación del núcleo y del citoplasma, posteriormente, la membrana plasmática se pliega y se exponen residuos de fosfatidilserina en la capa externa; hay una reducción en el volumen citoplásmico; el DNA se fragmenta y finalmente se forman cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas (revisado por Thornberry y Lazebnik, 1998).

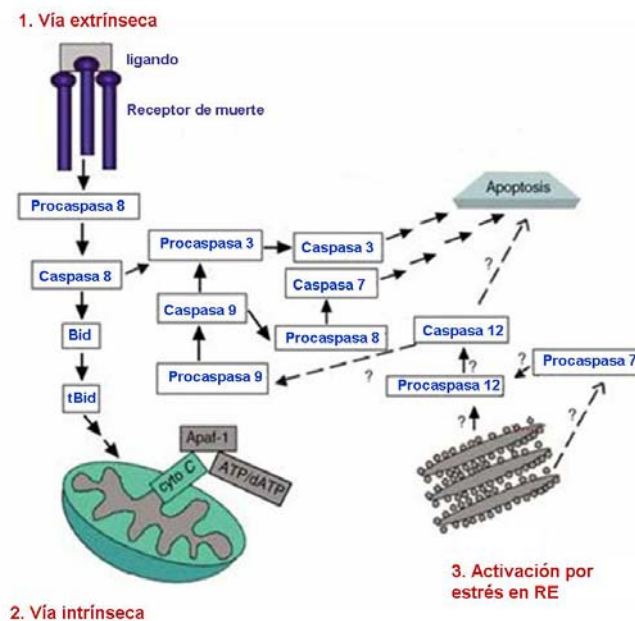
La apoptosis se inicia a través de tres rutas principales que convergen en la activación de una familia de cisteín proteasas conocidas como caspasas: *i*) la vía extrínseca, a través de la activación de receptores de muerte en respuesta a la unión con su ligando, que provoca la activación de la caspasa 8 o 10 (Salvesen y Dixit, 1997); *ii*) la vía intrínseca, que ocurre mediante la liberación del citocromo *c* de la mitocondria y la subsecuente activación de la caspasa 9; *iii*) una tercera vía, que se origina del retículo endoplásmico y que resulta en la activación de la caspasa 12 (Morishima *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2002) (**Figura 3**).



**Figura 1. Imágenes representativas de diferentes tipos de muerte celular. (a) Célula normal, (b) muerte autofágica, (c) apoptosis, (d) necrosis. Barra de escala 1 $\mu$ M. (Edinger, *et al.* 2004).**



**Figura 2.** Representación esquemática de los tres tipos de muerte celular programada. (Basado en Clarke, 1990).



**Figura3. Mecanismos de activación de la apoptosis.** La apoptosis puede iniciar a través de tres rutas que convergen en la activación de caspasas: 1) la vía extrínseca es inducida por la unión de ligandos específicos a sus receptores de muerte y ocasiona la activación de la caspasa 8. 2) la vía intrínseca, que ocurre mediante la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa 9. 3) La acumulación de proteínas plegadas erróneamente genera estrés en el retículo endoplásmico (RE) y esto promueve la activación de la caspasa 12 (modificado de Rao et al., 2004).

La muerte tipo II o *muerte autofágica* (**Figura 1b**) se caracteriza por la aparición de vesículas autofágicas que rodean componentes citoplásmicos. Además, se observa una dilatación de organelos como la mitocondria y el retículo endoplásmico y un aumento en la actividad lisosomal (revisado por Levine y Yuan, 2005).

La muerte tipo III o *muerte citoplásmica* es el proceso menos estudiado, del cual se desconoce por completo el mecanismo molecular. Se distingue morfológicamente por la dilatación de los organelos, la formación de cavidades vacías en el citoplasma que se conectan entre sí y con el espacio extracelular; la formación de vesículas de origen desconocido y la fragmentación de la célula sin que ocurra fagocitosis detectable. En algunos casos se ha observado desintegración nuclear tardía (Bröker *et al.*, 2005).

Una característica distintiva entre los tres tipos de MCP es el papel que desempeñan los lisosomas en dicho proceso. En el primer tipo, los lisosomas de la célula que muere no tienen una función detectable, sino que los fragmentos celulares son destruidos por lisosomas secundarios de células vecinas (heterofagocitosis) o macrófagos. La muerte tipo II se caracteriza por la activación primaria del aparato lisosomal, dentro del cual ocurre la degradación (autofagocitosis) y en el tercer tipo de muerte, la célula es destruida sin que los lisosomas tengan una función aparente.

A pesar de que tanto la apoptosis como la autofagia ocurren durante el desarrollo y en la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas, en diversos estudios recientes se ha observado un papel relevante de la muerte vesicular con características autofágicas (Kuma *et al.*, 2004). El estudio de la autofagia ha tomado fuerza permitiendo el avance en el entendimiento del mecanismo molecular subyacente de este proceso. Por el contrario, se ha investigado poco sobre la muerte no lisosomal y a la fecha no existen marcadores moleculares que permitan identificarla.

Aun está en discusión si estas son todas las formas de MCP, e incluso se ha propuesto que la necrosis pudiera ser programada bajo algunas circunstancias en las que responde a señales específicas, más que de modo accidental. Como

evidencia de esto se sabe que en respuesta a un estímulo apoptótico, las células pueden morir incluso en presencia de inhibidores de apoptosis, presentando características de la muerte necrótica. Sin embargo, esto sólo se ha observado cuando la apoptosis es inhibida química o genéticamente, por lo que se desconoce la relevancia de este tipo de muerte en condiciones naturales (revisado por Edinger, *et al.*, 2004).

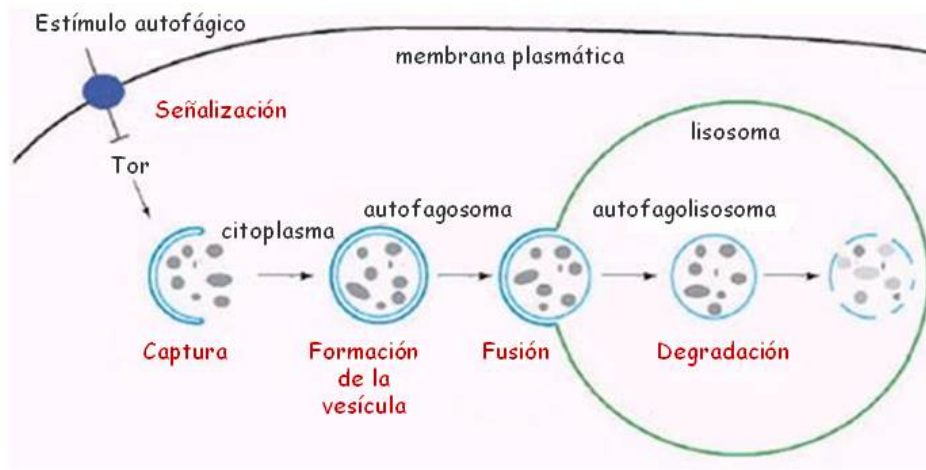
### **3. Autofagia**

#### **3.1 Características y función**

La degradación y el reciclaje de proteínas y otros componentes del citoplasma son procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular. Existen dos mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo: la ruta de ubiquitina-proteosoma, que está encargada de la destrucción de proteínas reguladoras de vida media corta y la autofagia, que se define como una ruta de degradación vesicular, involucrada en el reciclaje de proteínas de vida media larga y organelos como ribosomas y mitocondrias (revisado por Meijer y Codogno, 2004; revisado por Levine y Yuan, 2005).

Existen tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (revisado por Mizushima, 2004). La microautofagia implica la captura de fragmentos del citoplasma directamente en la membrana de la vacuola o del lisosoma, a partir de la formación de estructuras que los envuelven, o por invaginación de la membrana limitante. La macroautofagia ocurre mediante un evento de encapsulamiento independiente de la membrana del lisosoma. Comienza con la formación de un compartimiento de doble membrana, llamado autofagosoma o vesícula autofágica inmadura, que envuelve fracciones del citoplasma que posteriormente son llevadas a un compartimiento lítico como el lisosoma. Se piensa que la membrana del autofagosoma deriva de una estructura preautofagosomal que se expande debido a que se ensamblan nuevos componentes al inducir autofagia (Noda, *et al.*, 2002). Tanto en la microautofagia como en la macroautofagia se forma finalmente un

cuerpo autofágico o autofagosoma con una sola membrana, en donde ocurre la degradación por hidrolasas lisosomales (**Figura 4**) (revisado por Wang y Klionsky, 2003; revisado por Meijer y Codogno, 2004).



**Figura 4. Mecanismo general de la macroautofagia.** En respuesta a una señal de inducción de autofagia se forman vesículas autofágicas de doble membrana que contienen elementos del citoplasma incluyendo organelos completos. Éstas se fusionan con el lisosoma, dando lugar a un cuerpo autofágico o autofagolisosoma, donde el contenido es degradado por enzimas líticas. (Modificado de Wang y Klionsky, 2003)

La macroautofagia (referida en adelante como autofagia), es un proceso fisiológico evolutivamente conservado en las células que contienen un compartimiento lisosomal. Es inducida en respuesta a diferentes situaciones de estrés como falta de nutrientes, cambio en el volumen celular, estrés oxidativo, acumulación de proteínas plegadas erróneamente, señalización hormonal, radiación y tratamientos con algunas drogas (revisado por Levine y Klionsky, 2004). Se ha propuesto que la autofagia culmina en muerte tipo II cuando se degrada un nivel crítico de factores citoplásmicos esenciales para la sobrevivencia, cuando se degradan selectivamente moléculas reguladoras u organelos vitales, o como consecuencia de la acumulación de material que no puede ser destruido (revisado por Cuervo, 2004).

De forma general, las funciones de la autofagia se han clasificado en tres categorías: remodelación durante el desarrollo embrionario y la diferenciación,

producción de aminoácidos en condiciones de escasez de nutrientes y eliminación de macromoléculas y organelos dañados o no funcionales. Durante el desarrollo y la diferenciación, la muerte autofágica es esencial en los procesos de remodelación, debido a su capacidad de degradación masiva. Se ha observado que ocurre principalmente en etapas caracterizadas por escasez de nutrientes, como en la formación de esporas en *Sacharomyces cerevisiae*; la formación del cuerpo fructífero en *Dictyostelium discoideum*; el en arresto del desarrollo de *Caenorhabditis elegans* debido a condiciones de estrés y la metamorfosis en *Drosophila melanogaster*. Durante la vida adulta su importancia radica en la eliminación de estructuras dañadas y macromoléculas (revisado por Mizushima, N. *et al.*, 2005)

La desregulación de los niveles normales de autofagia está asociada con el surgimiento del cáncer, con miopatías como la enfermedad de Danon y con enfermedades neurodegenerativas, como el Huntington y el Parkinson. Consecuentemente, al inducir autofagia bloqueando las vías normales de inhibición de este proceso, se reduce el daño neurodegenerativo en modelos de enfermedad de Huntington en mosca y ratón (Ravikumar, *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la autofagia está involucrada en el retraso del envejecimiento y en procesos infecciosos virales y bacterianos (revisiones de Cuervo, 2004; Bergamini, *et al.*, 2004; Levine y Yuan, 2005). Sin embargo, aun está en discusión si el papel de la autofagia es favorecer la supervivencia en condiciones de estrés, o si se trata de un mecanismo ejecutor de muerte, dado que comúnmente en situaciones en las que se observa autofagia el proceso no culmina en muerte celular (revisado por Shintani y Klionsky, 2004).

### **3.2 Mecanismo molecular y regulación de la autofagia**

A partir de estudios de pérdida de función en organismos modelo, principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se empezó a dilucidar el mecanismo molecular de este proceso y el papel específico de un creciente número de proteínas, además de identificar las rutas de señalización que regulan la activación de la autofagia (revisado por Meijer y Codogno, 2004). Posteriormente se

descubrieron y caracterizaron genes homólogos en células de *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, ratón y humano (revisado por Levine y Klionsky, 2004). Esto sugiere que el mecanismo de autofagia ha sido conservado a lo largo de la evolución. Recientemente la nomenclatura de los genes descritos como ortólogos de los de levadura, se ha unificado nombrándolos ATG (Klionsky, *et al.*, 2003).

### **3.2.1 Regulación de la autofagia por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)**

La autofagia está regulada por la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) clase I y III (**Figura 5**). La PI3K clase I es un regulador negativo de autofagia que es activado por el receptor de insulina y por las proteínas sustrato del receptor de insulina. La cascada de señalización de la PI3K clase I, que incluye a la cinasa de residuos de serinas y treoninas Akt y a la cinasa TOR, desempeña un papel complejo en el mantenimiento de la homeostasis celular, dado que está involucrada en la regulación de diferentes procesos como la síntesis de proteínas, la incorporación de nutrientes, el ciclo celular y la inhibición tanto de la apoptosis como de la autofagia. Esto indica que la regulación de la autofagia está relacionada con otros procesos celulares fundamentales (revisado por Baehrecke, 2005; revisado por Levine y Yuan, 2005). La degradación de proteínas mediante autofagia produce aminoácidos y otros elementos necesarios para el metabolismo y las rutas biosintéticas, por lo que no es sorprendente que la disponibilidad de aminoácidos funcione como regulador de este proceso. Dado que el crecimiento depende del balance entre los procesos catabólicos y anabólicos, como la degradación y síntesis de proteínas, es lógico que ambos procesos estén regulados por una ruta común.

La expansión de las membranas de aislamiento que forman las vesículas autofagosomales depende del complejo de señalización de la PI3K clase III, que incluye a Beclin 1, homólogo de Atg6 de levadura que fue inicialmente identificado como un supresor de tumores que interactúa con Bcl-2 (Liang *et al.*, 1999). Dicho complejo se localiza en la última cisterna del aparato de Golgi y es indispensable en el transporte vesicular y en la autofagia, dado que facilita la localización de

otras proteínas en las estructuras preautofagosomales (Kihara, *et al.*, 2001) (**Figura 5**).

### 3.2.2 Sistemas de conjugación

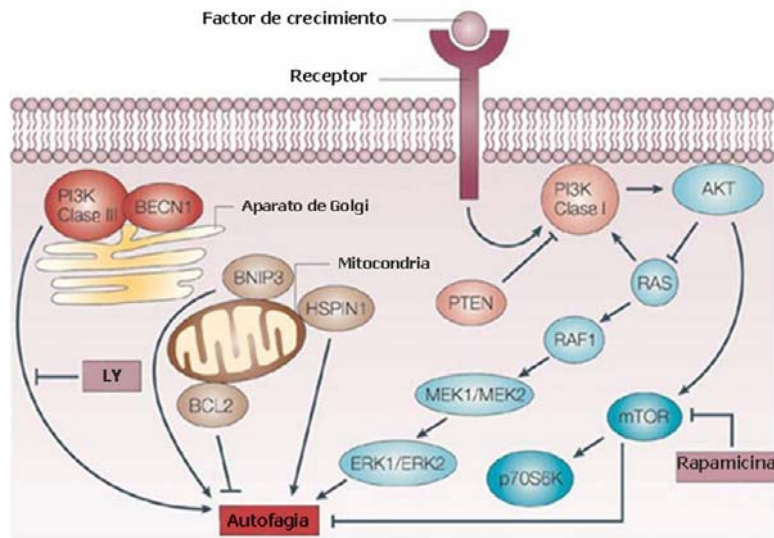
Existen aproximadamente 17 genes ATG regulados por la cascada de señalización de TOR, que codifican para proteínas necesarias en la inducción de la autofagia y la generación, maduración y reciclaje de los autofagosomas. La mayoría están involucradas en dos mecanismos de modificación de proteínas similares a la ubiquitinación: la conjugación de Atg12 con Atg5, esencial en la formación del preautofagosoma, y la modificación de LC3 (Atg8), indispensable en la formación del autofagosoma (revisado por Meijer y Codogno, 2004) (**Figura 6**).

#### *a) Conjugación de Atg12 con Atg5*

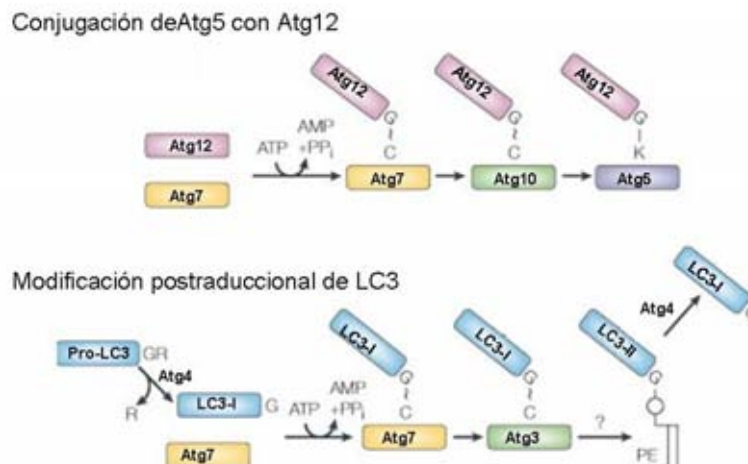
Atg12 es una proteína hidrofílica que a pesar de no ser homóloga a la ubiquitina, forma un conjugado con moléculas señal mediante un sistema tipo ubiquitinación. La conjugación de Atg12 inicia con la activación de la glicina carboxilo terminal, mediada por Atg7, una enzima homóloga a las enzimas tipo E1. Posteriormente Atg12 se transfiere a Atg10, enzima tipo E2 que cataliza la unión covalente con Atg5. Finalmente Atg16 se une a dicho complejo, al parecer solamente estabilizando la interacción. Después de su traducción, Atg12 se conjuga constitutivamente con Atg5, siendo un proceso que no depende de la inducción de autofagia por falta de nutrientes, por lo que en condiciones normales la mayor parte de Atg12 presente en las células se encuentra conjugado (revisado por Ohsumi, Y., 2001).

La mayoría del conjugado Atg12-Atg5 se ubica en el citoplasma, formando un complejo con Atg16L. Sólo una pequeña fracción se asocia con la membrana de aislamiento durante el proceso de elongación, pero se disocia cuando se completa la formación del autofagosoma.





**Figura 5. Regulación genética de la autofagia.** En presencia de factores de crecimiento, la señalización de sus receptores activa la PI3K tipo I, regulando negativamente la autofagia mediante la activación de AKT y mTOR. La sobre expresión de la fosfatasa homóloga de tensina (PTEN) bloquea esta vía, induciendo autofagia. RAS tiene un efecto dual: cuando activa la PI3K tipo I, inhibe la autofagia, pero cuando activa selectivamente la cascada de MAP cinasas (RAF1-MEK-ERK), la induce. La rapamicina es un inhibidor de mTOR, por lo tanto induce autofagia. Por otro lado, la asociación de la PI3K-III con beclin1 (BECN1) se requiere en la activación de este proceso, cuya vía de señalización se bloquea con el inhibidor LY294002. BCL-2 previene la autofagia, mientras que BNIP3 y HSPIN1, miembros de la familia de BCL-2, la inducen. (Modificado de Kondo, *et al.*, 2005)



**Figura 6. Sistemas de conjugación.** La conjugación de Atg 12 con Atg 5 se lleva a cabo por Atg 7 y Atg 10, mientras que la modificación de Atg 8 requiere de Atg 7 y Atg 3. Ambas reacciones son indispensables para la formación de los autofagosomas (Levine y Yuan, 2005).

### *b) Procesamiento postraduccional de LC3*

Kabeya, Y. *et al.* (2000) analizaron la localización intracelular y el sistema de conjugación de la cadena ligera 3 (LC3) de la proteína de rata asociada a microtúbulos, que es homóloga a la proteína de levadura Atg8.

Inmediatamente después de su síntesis, pro-LC3 sufre un corte en la región carboxilo terminal (22 aminoácidos en rata y 5 en humano), dejando expuesto un residuo de glicina mediante una reacción catalizada por la proteasa Atg4, que da lugar a LC3-I, una proteína citoplásmica con una movilidad aparente de 18kDa en geles desnaturalizantes. Ésta se asocia con Atg7 y es transferida a Atg3, enzimas de tipo E1 y E2 respectivamente, generándose así LC3-II, proteína con movilidad aparente de 16kDa que se une a fosfolípidos como la fosfetidiletanolamina (PE) y de este modo se asocia fuertemente con la membrana autofagosomal. Después de la fusión del autofagosoma con el lisosoma, LC3-II intra-autofagosomal es degradado por enzimas hidrolíticas lisosomales (Kirisako, *et al.*, 2000).

Ambas modificaciones ocurren en forma independiente, sin embargo existe evidencia de intercomunicación entre estas vías, dado que en una línea de células troncales embrionarias (ES) de ratón deficientes para Atg5 no sucede la conjugación con Atg12 y también se bloquea la modificación de LC3 (Mizushima *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha visto que en presencia de cantidades excesivas del conjugado Atg5-Atg12 se inhibe la modificación de LC3, mientras que la sobre-expresión de Atg12 favorece su procesamiento, demostrando que hay una regulación negativa entre ambos mecanismos (revisión de Tanida, *et al.*, 2004).

### **3.3 Técnicas para monitorear la autofagia.**

Inicialmente, la autofagia fue identificada basándose solamente en criterios morfológicos; sin embargo, con el avance del estudio de este proceso y del mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo, se han desarrollado nuevos métodos para reconocerla y estudiarla específicamente (revisado por Mizushima, 2004)

### **3.3.1 Microscopía electrónica**

A nivel ultraestructural, el principal criterio para reconocer la autofagia es la presencia de vacuolas intracelulares de doble membrana, que contienen componentes citoplásmicos como fragmentos de retículo endoplásmico y mitocondrias. Sin embargo, es difícil distinguir las vacuolas autofágicas de otras estructuras basándose únicamente en la morfología. Además, cuando las células son sometidas a estrés, es común que se hinchen algunos organelos como el retículo endoplásmico y la mitocondria, que pueden confundirse con estructuras autofágicas.

### **3.3.2 Métodos bioquímicos**

#### *a) Cuantificación de la degradación de proteínas*

Se ha propuesto cuantificar la degradación de proteínas de vida media larga para establecer una correlación con la actividad autofágica a partir del uso de aminoácidos marcados radiactivamente, no obstante, este método no es específico para macroautofagia, e incluso no es específico para proteólisis lisosomal.

#### *b) Cuantificación del transporte de material citoplásmico hacia el lisosoma*

Otra técnica bioquímica para determinar la actividad autofágica, consiste en medir el transporte de material citostólico al lisosoma, pero esto se ha realizado con éxito únicamente en levaduras y tampoco es específico para este proceso.

#### *c) Inhibidores de la PI3K*

Comúnmente se utilizan compuestos como 3-metil adenina (3-MA), Wortmanina o LY294002, que impiden la captura de los componentes citoplásmicos mediante la inhibición de la PI3K tipo III, probablemente bloqueando la formación del complejo que contiene a Beclin 1 (Atg6) (Blommaert *et al.*, 1997). Sin embargo, se sabe que el efecto de estos inhibidores no es específico pues inhiben también otras PI3K; adicionalmente se ha observado que afectan el tráfico de membranas en general,

incluyendo la endocitosis, además de alcalinizar el lumen lisosomal e interferir con otras vías de proteólisis independientes de la autofagia.

### **3.3.3 Marcadores específicos de autofagia**

#### *a) Tinción con monodansilcadaverina (MDC)*

Se ha propuesto la tinción con monodansilcadaverina (MDC) como marcador de vesículas autofágicas, dado que mediante un análisis de fraccionamiento celular se demostró que las estructuras positivas para MDC contenían enzimas lisosomales, pero carecían de marcadores de endosomas. El número de estructuras fluorescentes aumenta al inducir autofagia por falta de aminoácidos y éstas coinciden con marcadores de endosomas tardíos y lisosomas, pero son prácticamente indistinguibles de los lisosomas (Munafo y Colombo, 2001). Además, la señal de fluorescencia de MDC se encuentra principalmente en la región perinuclear, mientras que los autofagosomas se encuentran dispersos en todo el citoplasma (Mizushima, 2004).

Por otro lado, en una línea de células ES deficientes en Atg5, que carece totalmente de actividad autofágica (Mizushima et al., 2001), se mantiene la señal de estructuras positivas para MDC (Mizushima, 2004), lo que sugiere que aunque en algunos casos la señal de MDC se correlaciona con la actividad autofágica y probablemente se trata de autofagolisosomas, la MDC no es un marcador específico de vesículas autofágicas.

#### *b) Localización de GFP-LC3*

Debido a su localización en las membranas de estructuras autofágicas, el conjugado Atg12-Atg5 y Atg16 son marcadores específicos de las membranas de aislamiento, mientras que LC3-II permite detectar la presencia de membranas autofágicas en general. A partir de la formación de proteínas quiméricas fusionadas con la proteína verde fluorescente (GFP) es posible dar seguimiento a la ubicación de estas proteínas.

La sobre expresión de la proteína de fusión LC3-GFP (Kabeya, *et al.*, 2000) se ha utilizado por varios grupos para estudiar la autofagia, dado que permite

observar el cambio en la distribución intracelular de LC3, que se correlaciona con la modificación de la forma LC3-I citoplásmica a la forma LC3-II, que se asocia fuertemente con la membrana de aislamiento en forma dependiente de Atg5 y se mantiene incluso después de completarse la formación de los autofagosomas. Es importante tomar en cuenta que la señal de fluorescencia en los autofagolisosomas es más débil o ausente, dado que en éstos también ocurre la degradación de LC3 (Mizushima, 2004).

Al caracterizar un ratón transgénico que expresa GFP-LC3 de forma ubicua (Mizushima *et al.*, 2004), se observó que cuando los ratones están bien alimentados GFP-LC3 se encuentra distribuido difusamente en el citoplasma, pero al someterlos a una dieta escasa, la fluorescencia se ubica en estructuras punteadas que corresponden a los autofagosomas y autofagolisosomas. En algunos tejidos como el timo se encontraron vacuolas autofágicas independientemente de las condiciones de alimentación y de la actividad física, indicando que la autofagia en esos tejidos es constitutiva. Estos resultados indican que la sobre expresión de GFP-LC3 no afecta la autofagia endógena.

Adicionalmente, es posible separar en un gel desnaturizante de proteínas, las dos formas de LC3 y de este modo determinar y cuantificar la autofagia, dado que la cantidad de LC3-II y la proporción de LC3-II/LC3-I se correlacionan con el número de autofagosomas presentes. Estas evidencias apoyan la idea de que LC3 funciona como un marcador confiable de membranas autofágicas, que puede ser de gran utilidad en la interpretación de los procesos en los que la autofagia parece estar involucrada.

#### **3.3.4 Inhibición específica de genes de autofagia**

Finalmente, para inhibir la autofagia a nivel molecular, se ha utilizado el sistema de interferencia de RNA (RNAi) para bloquear la traducción de proteínas esenciales como *Atg5*, *Atg7* y *Beclin1*, demostrando en diferentes modelos de muerte vesicular que la inhibición específica de la autofagia reduce significativamente la muerte (Shimizu, *et al.*, 2004; Boya, *et al.* 2005).

## II. ANTECEDENTES

### 1. Modelos de MCP vesicular no apoptótica

#### 1.1 Muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R

Castro-Obregón, *et al.* (2002) caracterizaron una forma de MCP neuronal no apoptótica, inducida por la unión del neurotransmisor sustancia P (SP) con el receptor de neuroquininas tipo 1 (NK<sub>1</sub>R). Este tipo de muerte requiere de transcripción y traducción activa y tiene una morfología similar a los tipos de muerte II (autofagia) o III (muerte citoplásmica), ya que se observa la formación de vesículas citoplásmicas y fagolisosomas. Durante este proceso, el citoplasma y la membrana nuclear se mantienen intactos, no ocurre fragmentación nuclear, plegamiento de la membrana ni traslocación de fosfatidilserina; no requiere de la activación de caspasas ni se previene en presencia de inhibidores de caspasas (zVAD.fmk, Boc-aspartil.fmk) o de la proteína antiapoptótica Bcl-xL.

La activación del receptor NK<sub>1</sub>R por la SP está involucrada en patologías donde ocurre muerte neuronal, como en la epilepsia y la isquemia, dado que la pérdida de la función de cualquiera de ellos por métodos genéticos o farmacológicos reduce la magnitud de la muerte neuronal (Liu, *et al.*, 1999; Zachrisson, *et al.*, 1998; Yu, *et al.*, 1997). Por otro lado, hay una disminución de células positivas a SP en la sustancia nigra de pacientes con Parkinson, así como en la corteza de enfermos de Alzheimer (Raffa, R., 1998). Las características morfológicas de la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R observada en cultivos primarios de neuronas del hipocampo, la corteza cerebral y el cuerpo estriado, asemejan la muerte que ocurre durante la neurodegeneración. Adicionalmente, la expresión de NK<sub>1</sub>R en células no neuronales las vuelve sensibles a la SP, reproduciéndose la morfología de la muerte neuronal y siendo, de este modo, un modelo accesible para el estudio del mecanismo molecular de la muerte neuronal no apoptótica (**Figura 7b**).

NK<sub>1</sub>R es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) que se ha visto implicado en la regulación de diferentes procesos biológicos como la transmisión del dolor en la columna vertebral; la regulación de las funciones respiratoria y

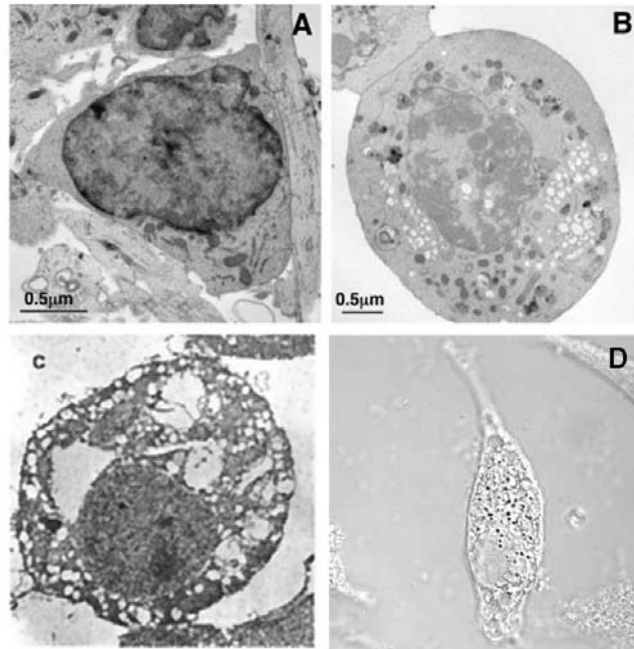
cardiovascular en el sistema nervioso central, así como la activación del reflejo emético y la regulación de respuestas conductuales como la depresión y esquizofrenia. Se piensa que está involucrado en diferentes funciones debido a que modula la liberación de otros neurotransmisores. NK<sub>1</sub>R puede activar una cascada de fosforilación de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) mediante su interacción con la proteína Arrestina 2, en forma independiente al acoplamiento con una proteína G. La Arrestina 2 pertenece al grupo de  $\alpha$  arrestinas, proteínas de andamiaje que funcionan como adaptadores de señalización que capturan moléculas del tipo de las GPCR.

En este modelo de muerte, tras la unión de la SP con el receptor NK<sub>1</sub>R, el extremo carboxilo terminal de éste interactúa con la Arrestina 2, permitiendo la formación de un complejo multiprotéico que activa a la cinasa Raf-1 y que induce la activación de una vía de señalización de MAPK, que involucra a MEK2 y ERK2. Finalmente, ERK2 fosforila al receptor nuclear esteroideo huérfano Nur77 (también llamado NR4A1, TR3, NGFI-B o NAK1), quien ejecuta la muerte mediante un mecanismo hasta ahora desconocido (Castro, *et al.*, 200; **Figura 8**).

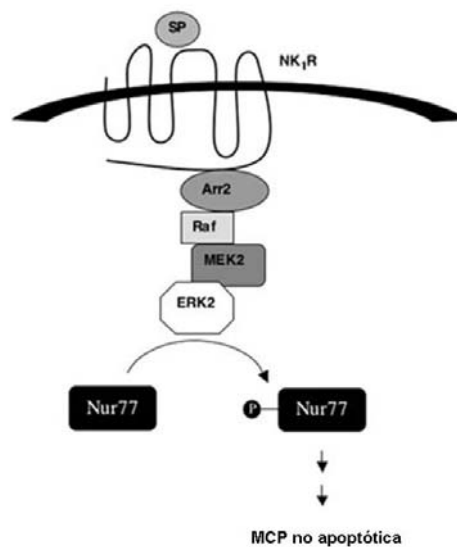
Nur77, junto con Nor-1 y Nurr1 conforman una familia de receptores tiroideos, cuya transcripción es controlada por estímulos externos. Nur77 está conformado por un dominio de transactivación AF1 N-terminal, un dominio de unión al DNA (DBD) con dos dedos de zinc y un dominio de unión a ligando C-terminal (LBD) con homología a dominios de unión a hormonas. Puede actuar como activador transcripcional uniéndose como monómero al elemento responsivo NBRE (Wilson, *et al.*, 1991; Wilson, *et al.*, 1993) o como dímero, uniéndose al elemento responsivo NurRE (Philips, *et al.*, 1997), o bien como represor, al asociarse, por ejemplo, al receptor de ácido retinoico RXR en forma de heterodímero (Katagari, *et al.*, 2000).

Se ha relacionado la actividad de Nur77 con la regulación del ciclo celular y la diferenciación celular; por ejemplo, en células PC12, Nur77 es fosforilado por miembros de la familia de las MAPK, induciendo así la formación de un heterodímero con el receptor de retinoides X (RXR) y su transporte al citoplasma,

para inducir diferenciación neuronal en respuesta al factor de crecimiento neuronal (NGF) (Katagari, *et al.*, 2000).



**Figura 7. Características morfológicas de los modelos de MCP vesicular no apoptótica. (a)** Célula HEK293T normal. **(b)** MCP inducida con SP/NK<sub>1</sub>R (Castro, *et al.* 2002) **(c)** Muerte inducida por IGFIR (Sperandio, *et al.* 2000). **(d)** Autofagia inducida por inhibición de caspasas en la línea celular L929.



**Figura 8. Mecanismo molecular de la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R (Castro, *et al.*, 2004).**



La expresión de mutantes dominantes negativas de Nur77 inhibe la MCP en diferentes estudios que se describen más adelante. Dichas mutantes inhiben la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, lo cual fue confirmado mediante el silenciamiento de Nur77 por interferencia de RNA (iRNA) (Castro, *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Regulación de la MCP por Nur77

Distintas evidencias muestran que Nur77 puede modular la MCP a través de diferentes mecanismos, dependiendo del tipo celular y del estímulo inductor de muerte:

#### *a) Nur77 regula positiva y negativamente la activación de la apoptosis*

- Nur77 puede actuar como factor transcripcional en la activación de apoptosis. Por ejemplo, en timocitos inmaduros y en la selección negativa de células T, Nur77 induce la vía extrínseca mediante la transcripción Fas y FasL, independientemente de la liberación de citocromo c. La expresión de una mutante dominante negativa de Nur77 que carece del DBD inhibe la muerte (Woronitz, *et al.*, 1994; revisado en Winoto y Littman, 2002). El análisis de los genes inducidos por Nur77 en este proceso sugiere la activación de nuevas rutas moleculares apoptóticas independientes de Bcl-2 (Rajpal, *et al.*, 2003).
- Nur77 puede inducir apoptosis al trasladarse a la mitocondria. En células cancerosas pulmón LNCaP, tratadas con el retinoide sintético AHPN, la interacción con Bcl-2 promueve la traslocación de Nur77 a la mitocondria e induce apoptosis. La sobre expresión del RNA antisentido de Nur77 inhibe la muerte (Li, *et al.*, 1998; Lin, *et al.*, 2004).
- Por el contrario, Nur77 actúa como factor inhibidor de la muerte inducida por ceramida (Bras, *et al.*, 2000) y por el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Suzuki, *et al.*, 2003).

#### *b) Nur77 puede modular la MCP no apoptótica*

- En situaciones donde ocurre muerte neuronal dependiente de SP, por ejemplo en respuesta a isquemia (Walton, *et al.*, 1999) y durante la epilepsia inducida por la administración de ácido kaínico (Honkaniemi y Sharp, 1999), se ha observado un aumento en la expresión de Nur77.

- La muerte de macrófagos independiente de caspasas requiere de Nur77, dado que en el ratón *knockout* de Nur77 disminuye la muerte de estas células. Se propone que otros miembros de la familia compensan su función (Kim, *et al.*, 2003).

## 1.2 Muerte inducida por IGFIR

Sperandio, *et al.*, (2000) describieron otra forma de MCP no apoptótica, denominada *paraptosis*, que también presenta vesículas citoplásmicas y otras características morfológicas y moleculares semejantes a la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R (**Figura 7c**). Esta forma de muerte es inducida por la expresión del receptor del factor de crecimiento I tipo insulina (IGFIR), requiere transcripción y traducción de proteínas y es resistente a inhibidores de apoptosis como zVAD.fmk, BAF, p35 y Bcl-x<sub>L</sub>.

En estudios anteriores se había reportado la función de IGFIR en la activación de muerte celular. Durante el desarrollo parece ser necesario en la inducción de MCP, dado que el ratón nulo para IGFIR posee una densidad neuronal muy alta. Por otro lado, la expresión de una mutante dominante negativa en el dominio intracelular de IGFIR en células cancerosas, reduce la tumorigenicidad y el índice de muerte celular (Liu, *et al.*, 1998). Se sabe que el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) actúa como factor de sobrevivencia en fibroblastos cultivados en ausencia de suero, lo cual es congruente con la idea de que la presencia de receptores de IGF-I sin ligando, induce muerte celular (Bredesen, 2005).

La interferencia de la expresión de MEK2 o ERK2, o bien la expresión de las mutantes dominante negativas de Nur77 inhiben este tipo de muerte (Castro-Obregón *et al.*, datos no publicados), lo cual sugiere que tanto la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R como la muerte inducida por IGFIR pudieran tener elementos moleculares en común, siendo dos vías alternativas que responden a estímulos distintos y que convergen en la activación de Nur77. Dadas las características morfológicas de ambas formas de MCP es posible que se trate de muerte tipo II o

tipo III, sin embargo, es necesario hacer estudios moleculares que permitan discernir entre ellas, o bien, si se trata de una forma alternativa de MCP.

### **1.3 Muerte autofágica inducida por inhibición de caspasa 8**

Diversos estudios recientes sugieren una posible interacción entre las rutas alternativas de MCP, ya sea a través de mecanismos moleculares y de activación comunes (Shimizu, *et al.*, 2004; Furuya, *et al.*, 2005; Pattingre, *et al.*, 2005), o por la presencia de características distintivas de apoptosis, como la activación de caspasas, en modelos de muerte que presentan morfología vesicular como la autofagia (González-Polo, *et al.*, 2005).

Por ejemplo, Yu, *et al.* (2004) mostraron que al inhibir la caspasa 8 en la línea L929 de fibroblastos de ratón, se induce un tipo de muerte celular que se caracteriza por la presencia de vacuolas autofágicas y que es posible prevenir mediante la inhibición de los genes de autofagia Atg6 y Atg7 (**Figura 7d**). Dado que la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR tiene semejanzas morfológicas con la autofagia y que Nur77 es esencial para que ocurra, sería interesante saber si Nur77 está involucrado en la ejecución de la muerte autofágica. De ser así, ésta sería la primera evidencia de que este receptor nuclear regula también la MCP de tipo autofágico, además de sugerir semejanzas entre la paraptosis y la autofagia.

## **IV. HIPÓTESIS**

Las diversas formas de muerte vesicular pueden ser variaciones de muerte autofágica, debido a sus similitudes morfológicas y a que comparten elementos moleculares. Nur77 regula tanto la apoptosis como la muerte vesicular, por lo que puede ser un modulador central de los distintos mecanismos de muerte celular programada.

## **V. OBJETIVOS**

### **Generales**

1. Determinar si la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR es de tipo autofágico.
2. Determinar si Nur77 modula la muerte autofágica.

### **Particulares**

- 1.1 Analizar el efecto de inhibidores de autofagia en la progresión de la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y por IGFIR.
- 1.2 Inhibir la expresión genes específicos de autofagia por iRNA para evaluar su participación en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y por IGFIR.
- 1.3 Determinar si al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR ocurre el procesamiento postraducciona l y la redistribución intracelular del marcador de autofagosomas LC3.
- 2.1 Analizar si Nur77 participa en la autofagia inducida por inhibición de caspasas, mediante la expresión de mutantes dominantes negativas.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

(Los detalles sobre la preparación y composición de medios y soluciones se describen en el apéndice).

### 1. Líneas y cultivos celulares

#### 1.1 Cultivo de células HEK293T y L929

Se utilizó la línea celular HEK293T proveniente de células endoteliales de riñón de embrión humano y la línea de fibroblastos de ratón L929.

1. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Añadir 1 ml de una solución de tripsina al 0.25% a cada plato de 10 cm (Corning #430167) e incubar a 37°C por 3 min.
4. Agregar un volumen de medio de crecimiento, para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml (Corning #430790) y centrifugar 4 min a  $220 \times g$ .
6. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
7. Resuspender el pellet en 10 ml de medio. Tomar una alícuota de 10  $\mu$ l para cuantificar la densidad y viabilidad celular por exclusión de azul tripano al 10% (GIBCO #15250-061), utilizando una cámara de Neubauer.
8. Sembrar  $1 \times 10^6$  células en 10 ml de medio, por plato de 10 cm para mantener la línea;  $3.5 \times 10^5$  células en 2 ml de medio en cajas de 6 pozos (Costar #3506) para realizar transfecciones transitorias; ó  $1.5 \times 10^5$  células en 1 ml de medio en cajas de 12 pozos (Costar #3512) para transfectar siRNAs.
9. Incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 1.2 Transfección transitoria de células HEK293T

Para estandarizar las condiciones de transfección transitoria con cloruro de calcio, se utilizó el plásmido pQBI25-GFP, que expresa la proteína verde fluorescente

(GPF), bajo el control del promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV). Se obtuvo una eficiencia de transfección mayor al 80%.

1. Sembrar  $3.5 \times 10^5$  células por pozo en 2 ml de medio de crecimiento en cajas de 6 pozos, 24 h antes de la transfección.
2. Cambiar el medio.
3. Mezclar, para cada muestra, 6.25  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2M, 5  $\mu$ g de DNA y 38.75  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 50  $\mu$ l de HBS 2X pH 6.95 e incubar 2 min a 37°C.
5. Agregar la mezcla a cada pozo por goteo e incubar a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ .
6. Cambiar el medio 17 h después de la transfección.

### **1.3 Transfección transitoria de células L929**

Se estandarizaron las condiciones de transfección utilizando el plásmido pQBI25-GFP. Se obtuvo una eficiencia de transfección del 40%. Se realizó mediante lipofección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen #11668-019), de acuerdo con las instrucciones del proveedor:

1. Sembrar  $3.5 \times 10^5$  células por pozo en 2 ml de medio (D-MEM + SFB 10%) sin antibióticos, en cajas de 6 pozos, 24 h antes de la transfección.
2. Para cada muestra preparar el complejo de transfección:
  - a. Diluir 4  $\mu$ g de DNA en 250  $\mu$ l de D-MEM. Mezclar gentilmente.
  - b. Agitar suavemente la Lipofectamina antes de usarla. Diluir 12  $\mu$ l en 250  $\mu$ l de D-MEM. Incubar por 4 min a temperatura ambiente.
  - c. Mezclar suavemente el DNA y la Lipofectamina e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
3. Reemplazar el medio por 1ml de D-MEM. Añadir los 500  $\mu$ l de mezcla a cada pozo.
4. Incubar las células a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 h.
5. Reemplazar el medio por medio de crecimiento sin antibióticos.
6. Transcurridas 24 h después de la transfección cambiar el medio por 1 ml de medio de crecimiento. Incubar a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ .

## **1.4 Mantenimiento y almacenaje de líneas celulares**

### *a) Congelamiento de líneas celulares*

1. Tripsinizar las células en la forma habitual.
2. Centrifugar 4 min a  $220 \times g$ .
3. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
4. Cuantificar la densidad y viabilidad celular por exclusión de azul tripano y resuspender el pellet de células para obtener una densidad de  $6 \times 10^6$  células/ml.
5. Agregar un volumen de medio de congelación 2X gradualmente por la pared del tubo, mezclando constantemente la suspensión celular.
6. Alicuotar en viales de congelación (Corning #2028), colocando 1 ml ( $3 \times 10^6$  células) por vial.
7. Congelar a  $-70^\circ\text{C}$ . Al día siguiente transferir al tanque de nitrógeno líquido para su almacenaje.

### *b) Descongelamiento de líneas celulares*

1. Descongelar un vial con  $3 \times 10^6$  células en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$  durante 1-2 min.
2. Transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml. Añadir 5 ml del medio correspondiente, agitando constantemente.
3. Centrifugar 4 min a  $220 \times g$ .
4. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
5. Resuspender el pellet de células en 4 ml del medio correspondiente y sembrar en un plato de 6 cm (Costar #430166).
7. Cambiar el medio al día siguiente para eliminar las células muertas.

## **2. Modelos de MCP**

### **2.1 Muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R**

1. Sembrar las células HEK293T y realizar la transfección transitoria como se indica en el punto 1.2. Se utilizó el vector vacío pcDNA3.1<sup>+</sup> como control negativo y la secuencia de NK<sub>1</sub>R clonada en dicho vector.

2. Agregar SP disuelta en H<sub>2</sub>O (Sigma #s6883) a una concentración final de 100 nM, 24 h después de la transfección. En caso de utilizar el inhibidor de autofagia LY294002 (Calbiochem #440202), agregarlo en una concentración 5 µM disuelto en DMSO (Sigma #D2650), 30 min antes de la SP.
3. 24 h después, cuantificar el número total de células muertas en cada condición:
  - Recuperar sobrenadantes y centrifugar 5 min a 2000 rpm para cuantificar el número de células flotando.
  - Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet de células en 50 µl de azul tripano.
  - Cuantificar en la cámara de Neubauer el número de células muertas por µl de dilución, para estimar el número total. Se contaron un mínimo de 100 células.

## **2.2 Muerte inducida por IGFIR**

1. Sembrar las células HEK293T y realizar la transfección transitoria como se indica en el punto 1.2. Se utilizó el vector vacío pcDNA3.1<sup>+</sup> como control negativo y la secuencia de IGFIR clonada en dicho vector.
2. En caso de utilizar LY294002, agregarlo en una concentración 5 µM 17 h después de la transfección.
3. Cuantificar el número total de células muertas 48 h después de la transfección del mismo modo que en el punto anterior.

## **2.3 Muerte inducida por inhibición de caspasas**

1. Sembrar la línea celular L929 como se indica en el punto 1.1.
2. Después de 24 h agregar Z-Val-Ala-Asp-(OCH<sub>3</sub>)-fluorometilcetona (zVAD.fmk) (Biomol #P416) a una concentración final 20 µM, disuelto en DMSO.
3. 24 h después realizar los conteos de células muertas del mismo modo que en el punto anterior.



Para analizar el papel de Nur77 en este modelo de muerte celular se realizaron transfecciones transitorias del vector vacío pcDNA3.1<sup>+</sup> como control negativo, y de dos mutantes dominantes negativas de Nur77:Nur77 $\Delta$ DBD:GFP y Nur77 $\Delta$ N152:GFP (Li, *et al.*, 2000), como se indica en el punto 1.3.

### 3. Interferencia de RNA (iRNA)

#### 3.1 Diseño de oligonucleótidos y síntesis de siRNAs

Para interferir la expresión de Beclin 1 y PI3K III se sintetizaron RNAs interferentes pequeños (siRNAs) *in vitro* con el kit de construcción de siRNA *Silencer* (Ambion #1620), siguiendo las instrucciones del proveedor, para lo cual se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- Becn1-A sentido: 5'- AAG ATC CTG GAC CGT GTC ACC CCT GTC TC -3'
- Becn1-A antisentido: 5'- AAG GTG ACA CGG TCC AGG ATC CCT GTC TC - 3'
  
- Becn1-B sentido: 5'- AAC TCA GGA GAG GAG CCA TTT CCT GTC TC - 3'
- Becn1-B antisentido: 5'- AAA AAT GGC TCC TCT CCT GAG CCT GTC TC - 3'

Correspondientes a los nucleótidos 227-247 y 320-340 respectivamente, de la secuencia de humano con número de acceso en *GenBank* NM\_003766 (Shimizu, *et al.*, 2004 y Boya, *et al.* 2005).

- PI3K-A sentido: 5'- AAG GTG ATG AAT CAT CTC CAA CCT GTC TC - 3'
- PI3K-A antisentido: 5'- AAT TGG AGA TGA TTC ATC ACC CCT GTC TC - 3'
  
- PI3K-B sentido: 5'- AAG GAA CCT ACC AAG AAG GAT CCT GTC TC -3'
- PI3K-B antisentido: 5'- AAA TCC TTC TTG GTA GGT TCC CTT GTC TC - 3'

Correspondientes a los nucleótidos 776-794 y 1150-1168 respectivamente, de la secuencia de humano con número de acceso en *GenBank* NM\_002647 (Madden, D., comunicación personal).

### **3.2 Transfección de siRNAs y plásmidos**

Para estandarizar las condiciones de transfección de siRNAs se usó un siRNA control contra una secuencia del gen de luciferasa, que no es homóloga a ningún gen de mamífero, acoplado a fluoresceína (siRNA-luc).

Se realizó mediante lipofección con Lipofectamina 2000, siguiendo las indicaciones del proveedor.

- Sembrar  $1.5 \times 10^5$  células por pozo, en 1ml de medio (D-MEM + SFB 10%) sin antibióticos, en cajas de 12 pozos.
- Diluir 3  $\mu$ g de siRNA y 6  $\mu$ l de lipofectamina en 50  $\mu$ l de D-MEM.
- Reemplazar el medio de crecimiento por 400  $\mu$ l de medio sin antibióticos y agregar los 100  $\mu$ l de mezcla a cada pozo.
- Incubar durante 4 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.
- Transcurridas las 4 h transfectar los plásmidos NK<sub>1</sub>R, IGFIR y el vector pcDNA3.1<sup>+</sup> e inducir muerte celular como se describe en los puntos 2.1 y 2.2.

La inhibición de la transcripción de los genes blanco se verificó mediante *Western Blot*.

## **4. Western Blot**

### **4.1. Extractos de proteína**

1. Despegar las células con la pipeta y transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar 5 min a 2000 rpm.
3. Lavar el pellet de células con PBS y volver a centrifugar.
4. Agregar un volumen de buffer de lisis frío igual al volumen del pellet de células.
5. Colocar las células en hielo y lisarlas por sonicación (tres ciclos de 20 segundos con una amplitud del 35%).
6. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Recuperar el sobrenadante.
7. Determinar la concentración de proteínas en el espectrofotómetro mediante una curva patrón de albúmina empleando el método de Bradford.

## 4.2. SDS-PAGE (electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes)

1. Para preparar simultáneamente 4 geles desnaturalizantes de poliacrilamida con un gradiente del 10 al 15% en la cámara *Hoefler* (Amersham Biosciences):

	Gel separador (11%)	Gel separador (15%)	Gel concentrador (4%)	Solución tapón
Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)	8 ml	12 ml	1.04 ml	-
Buffer*	6 ml	6 ml	2 ml	5 ml
SDS 10%	240 µl	240 µl	80 µl	100 µl
Sacarosa	-	3.5 g	-	10 g
Persulfato de amonio 10%	120 µl	120 µl	40 µl	-
TEMED	12 µl	12 µl	4 µl	-
H <sub>2</sub> O	cbp 24 ml	cbp 24 ml	cbp 8 ml	cbp 20 ml
Total	24 ml	24 ml	8 ml	20 ml

\*Gel separador y solución tapón: Tris-HCl 1.5M, pH 8.8. Gel concentrador: Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

- Preparar la solución taponadora y ponerla en una jeringa insertada en la válvula de tres direcciones que conecta la cámara para hacer el gradiente, con la parte inferior de la cámara *Hoefler*.
- Preparar las soluciones para los geles y ponerlas en hielo.
- Poner la cámara para hacer el gradiente sobre una placa de agitación magnética, agregar la solución ligera en el compartimiento derecho, junto un agitador magnético, y la solución pesada al compartimiento izquierdo.
- Abrir la válvula interna de la cámara para que empiecen a mezclarse las soluciones y posteriormente abrir la válvula externa ligeramente para llenar la cámara de los geles lentamente.
- Cerrar la válvula antes de que se formen burbujas y llenar la parte inferior de la cámara con la solución taponadora.
- Dejar polimerizar.
- Agregar la solución del gel concentrador por la parte superior y colocar los peines. Dejar polimerizar.
- Los geles se pueden almacenar hasta por un mes en una cámara húmeda a 4 °C.

2. Agregar solución amortiguadora de carga a 30 µg de cada muestra (el volumen final no debe exceder 20 µl), calentar a 95 °C por 4 min y cargar el gel.
3. Correr el gel a 100 V hasta que el colorante llegue al final.

#### **4.3 Western Blot**

1. Correr el gel de proteína.
2. Transferir las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinileno (PVDF) (Millipore #IPVH00010) en la cámara *Hoefler miniVE* (Amersham Biosciences) durante 1 h a 100 V, 350 mA a temperatura ambiente, o 12 h a 30 V, 90 mA a 4 °C.
  - Previamente preparar la solución amortiguadora de transferencia y enfriarla a 4 °C.
  - Prehumedecer la membrana con metanol.
  - Equilibrar el gel y sumergir la membrana, el papel filtro y las fibras en solución amortiguadora de transferencia por 15 min.
3. Terminada la transferencia, lavar la membrana 2 veces con agua destilada.
4. Verificar la transferencia y el cargado de proteína tiñendo la membrana durante 5 min con rojo Ponceau (0.1% rojo Ponceau en 5% de ácido acético) (Sigma #70K9346). La intensidad de las bandas debe ser similar en todos los carriles.
5. Lavar con TBST hasta eliminar el colorante.
6. Bloquear con una solución de leche descremada al 5% en TBST durante 48 h a 4 °C (esto ayuda a disminuir la aparición de bandas inespecíficas).
7. Incubar con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (**Tabla 2**) en una solución de leche al 5% en TBST durante 12 h a 4 °C.
8. Lavar con TBST 10 min 3 veces.
9. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en TBST (**Tabla 3**) durante 45 min a temperatura ambiente.
10. Lavar con TBST durante 5 min dos veces.
11. Lavar con TBS.

12. Revelar con los reactivos de detección para quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences #RPN2106), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron películas BioMax Kodak (Sigma #Z370398).
13. Para probar las membranas utilizando un anticuerpo primario distinto:
  - Incubar la membrana en la solución para limpiar anticuerpos 30 min a 50 °C agitando ocasionalmente.
  - Lavar la membrana 2 veces por 10 min con TBST.
  - Bloquear en una solución al 5% de leche en TBST y continuar a partir del paso 7.

Se determinó la intensidad de las bandas con el programa *ImageJ*.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Especie hospedera	Dilución	Fuente
Anti-GAPDH	Conejo (monoclonal)	1:2000	Research Diagnostics #RDI-TRK5G4-6C5
Anti-Beclin1	Conejo (policlonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology #sc11427
Anti-PI3K clase III	Conejo (policlonal)	1:500	Abcam #ab5451-100
Anti-LC3	Ratón (monoclonal)	1:1000	Southwestern Medical School #A0973
Anti-GFP	Ratón (monoclonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology #sc9996

**Tabla 3.** Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Dilución	Fuente
HRP Anti-conejo IgG (H + L)	1:2500	Zymed #62-6120
HRP Anti-ratón IgG	1:2500	Amersham Biosciences #NA931

## 5. Análisis de la distribución intracelular de LC3

Para analizar la localización intracelular de LC3 y cuantificar el número de células en las que se observa un cambio en la distribución, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal, o utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300).

- Las células fueron cultivadas en laminillas con 8 divisiones (Nunc #154534).
- Se realizó la transfección e inducción de muerte siguiendo los protocolos arriba descritos, pero cotransfectando con el plásmido pCAG-GFP-LC3 (Mizushima, *et al.* 2004), que expresa LC3 fusionada a GFP. Se utilizaron 3 µg de cada plásmido.

- Se fijaron las células con PFA 4% durante 10 min y se tiñeron los núcleos con DAPI (Molecular Probes #D-1306) o yoduro de propidio (YP) (0.2 µg/ml) por 2 min.
- Tras despegar las divisiones de la laminilla se agregó solución de montaje y se cubrió la laminilla con un cubreobjetos.

## 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa *STATISTICA 6.0*.

Los datos de los conteos de células muertas (positivas para azul tripano) se normalizaron respecto a la suma total de células muertas recuperadas en los sobrenadantes de cada experimento, para obtener la proporción de células muertas en cada condición. Las gráficas y las pruebas estadísticas se hicieron a partir de los datos normalizados.

### a) Efecto de LY294002 en la MCP

En el caso de la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R se realizó una ANOVA de Friedman para comparar los resultados obtenidos en los controles negativos (pcDNA, pcDNA+LY, pcDNA3+SP). Debido a que no existen diferencias  $\chi^2(N=3, df=2)=0.54, p=0.76$ , se consideró solamente el vector vacío como control. De forma análoga se compararon los controles negativos para la muerte inducida por IGFIR (pcDNA, pcDNA+LY) mediante una prueba de Wilcoxon y no se encontraron diferencias ( $p=0.1088$ ).

Se aplicó una ANOVA de Kruskal-Wallis en la que se obtuvieron diferencias significativas para la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R:  $H(4, N=15)=12.71, p=0.0128$  y por IFGIR:  $H(3, N=12)=10.38, p=0.0156$ . Posteriormente, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para muestras pareadas independientes, para determinar los tratamientos entre los cuales existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

### b) Inhibición de la PI3K por iRNA

Se verificó que no hubiera diferencias entre los controles pcDNA y pcDNA+siRNA-GAPDH, mediante una prueba de Wilcoxon ( $p=0.28$ ). Posteriormente, se realizó

una ANOVA de Kruskal-Wallis para la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R: H(5, N=18)=16.1, p=0.0065 y por IGFIR: H(4, N=15)=12.36, p=0.014, y se identificaron los tratamientos entre los que existen diferencias significativas (p<0.05) utilizando una prueba de Mann-Whitney.

*c) Localización intracelular de LC3*

Se realizó una prueba de  $\chi^2$  para comparar el número de células positivas para LC3 (con distribución punteada). Se obtuvieron diferencias significativas ( $\chi^2=891.9$ , gl=3, p<0.05).

*d) Efecto de las dominantes negativas de Nur77 en la autofagia*

Se compararon las proporciones obtenidas con y sin zVAD.fmk para cada plásmido (pcDNA, Nur77 $\Delta$ DBD y Nur77 $\Delta$ N152) mediante una prueba de Wilcoxon para muestras pareadas y se obtuvieron diferencias significativas (p=0.007690). Posteriormente, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar los tres tratamientos, con y sin zVAD.fmk entre sí. No existen diferencias cuando no se induce muerte (p=0.5775), pero al agregar zVAD.fmk sí hay diferencias significativas (p=0.0429).

Finalmente, se realizó una prueba de Mann-Whitney para pruebas independientes, para determinar entre cuáles tratamientos existen diferencias (p<0.05), tomando en cuenta únicamente los casos en los que se indujo muerte.

## VI. RESULTADOS

### 1. Estandarización de los modelos de MCP

Dado que los modelos de MCP utilizados en este trabajo no se habían implementado en el laboratorio, inicialmente se establecieron las condiciones más favorables para el cultivo, transfección e inducción de muerte en las líneas celulares HEK293T y L929, como se describe en la metodología, con el objetivo de reproducir la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, IGFIR y zVAD.fmk, publicadas anteriormente (Castro, *et al.*, 2002; Sperandio, *et al.*, 2000; Yu, *et al.*, 2004).

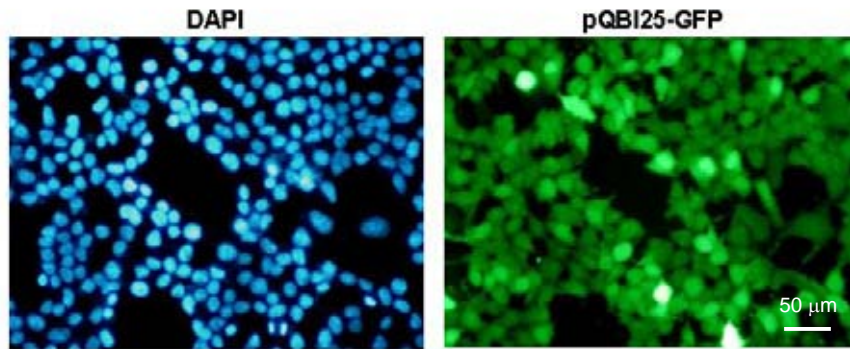
Para estandarizar las condiciones de transfección con cloruro de calcio en la línea celular HEK293T (**Figura 9**) y por lipofección para la línea L929, se utilizó el plásmido pQBI25-GFP, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), bajo el control del promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV). Se obtuvo una eficiencia de transfección mayor al 85% en células HEK293T y del 40% en células L929.

### 2. Efecto de LY294002 en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR

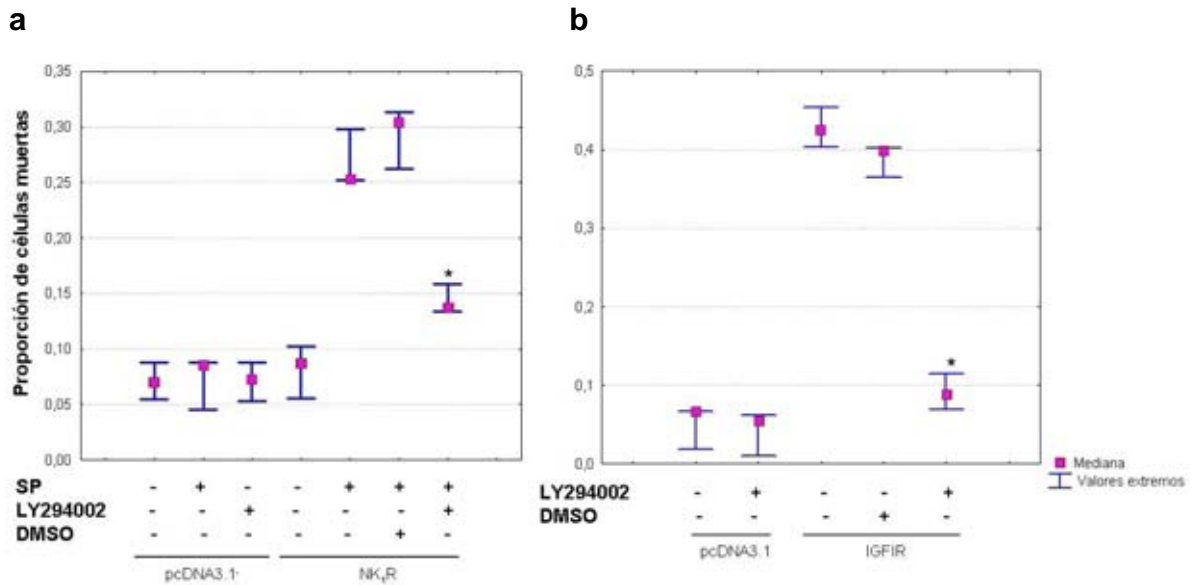
Para determinar si la señalización de la PI3K-III es necesaria en nuestros modelos de muerte no apoptótica, se evaluó el efecto del inhibidor de las PI3K, LY294002, (**Figura 10**). Se utilizó el vector vacío pcDNA3.1<sup>+</sup> como control de la transfección, y las secuencias de cDNA de ambos receptores clonadas en dicho vector.

Se estimó el número total de células muertas, que se encuentran flotando en el medio, utilizando el colorante vital azul tripano. La gráfica muestra la proporción de células muertas en cada condición, respecto al número total de células muertas en cada uno de tres experimentos independientes, realizados por duplicado. Se observa que la transfección de receptor NK<sub>1</sub>R, así como la adición de SP o LY294002 no tuvieron ningún efecto sobre los niveles basales de muerte evaluados al transfectar el vector vacío. LY294002 previno la muerte en ambos modelos de manera significativa, en comparación con el DMSO, vehículo en el cual se disolvió dicho inhibidor.





**Figura 9.** La línea celular HEK293T se transfecta con una eficiencia mayor al 85%. Micrografías de fluorescencia que muestran los núcleos teñidos con DAPI (azul) y las células transfectadas en forma transitoria con el plásmido pQBI25-GFP (verde).



**Figura 10.** LY294002 (5  $\mu$ M) previene la muerte inducida por SP(100 nM) /NK<sub>1</sub>R (a) e IGFIR (b). Células HEK293T fueron transfectadas con los vectores indicados, e incubadas en presencia de los compuestos señalados durante 24hrs. Se cuantificó la muerte celular como se indica en la sección de Material y Métodos. La gráfica muestra la mediana y los valores extremos de los datos obtenidos en tres experimentos independientes. Se aplicó una ANOVA de Kruskal-Wallis en la que se obtuvieron diferencias significativas para la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R:  $H(4, N=15)=12.71, p=0.0128$  y por IGFIR:  $H(3, N=12)=10.38, p=0.0156$ . El asterisco indica los casos en los que existen diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney para muestras pareadas independientes. ( $p<0.05$ ), respecto a los valores obtenidos al inducir muerte y respecto a los controles negativos.

### 3. Inhibición de la maquinaria autofágica por iRNA

Para corroborar que la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR requiere de la maquinaria autofágica, buscamos inhibir dos genes que codifican para proteínas indispensables en la formación de vesículas autofágicas: *beclin1* y *PI3K-III*. Se utilizó el sistema de interferencia de RNA (iRNA) para bloquear la traducción de los mRNAs de ambos genes, debido a su alta especificidad. Se sintetizaron *in vitro* siRNAs contra dos blancos distintos para cada gen (Becn1-A y Becn1-B; PI3K-A y PI3K-B, respectivamente), cuyas secuencias se describen en la metodología.

Posteriormente, se estandarizaron las condiciones para transfectar los siRNAs en la línea celular HEK293T, para lo cual se utilizó un siRNA contra la luciferasa (siRNA-luc), cuya secuencia no se encuentra en el genoma de células de mamífero, previniendo que esto tenga algún efecto en la síntesis de proteínas general. Para determinar el número de células que incorporan el siRNA, se sintetizó químicamente el siRNA-luc acoplado a fluoresceína. En las células transfectadas se observan agregados verde fluorescentes (**Figura 11a**).

Para verificar que los siRNAs sintetizados *in vitro* inhibieran la expresión del gen blanco se sintetizó un siRNA contra la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se expresa constitutivamente, a partir de los oligonucleótidos proveídos por el kit, cuya secuencia se sabe que funciona. Se seleccionaron tres de las condiciones de transfección donde se obtuvo una mayor eficiencia, utilizando la menor cantidad de reactivos para disminuir la toxicidad:

1. 2 µg de siRNA + 6 µl de lipofectamina en 10 µl de D-MEM.
2. 3 µg de siRNA + 6 µl de lipofectamina en 100 µl de D-MEM.
3. 2 µg de siRNA + 6 µl de lipofectamina en 50 µl de D-MEM.

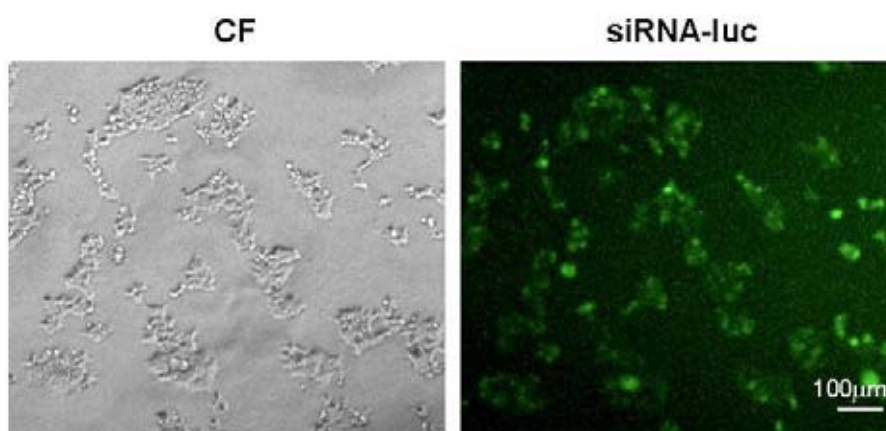
Se evaluó la disminución de la proteína a las 72 h, mediante *Western Blot*. Se obtuvo una mejor interferencia en las primeras dos condiciones de transfección, por lo que fueron las que se utilizaron en adelante (**Figura 11b**).

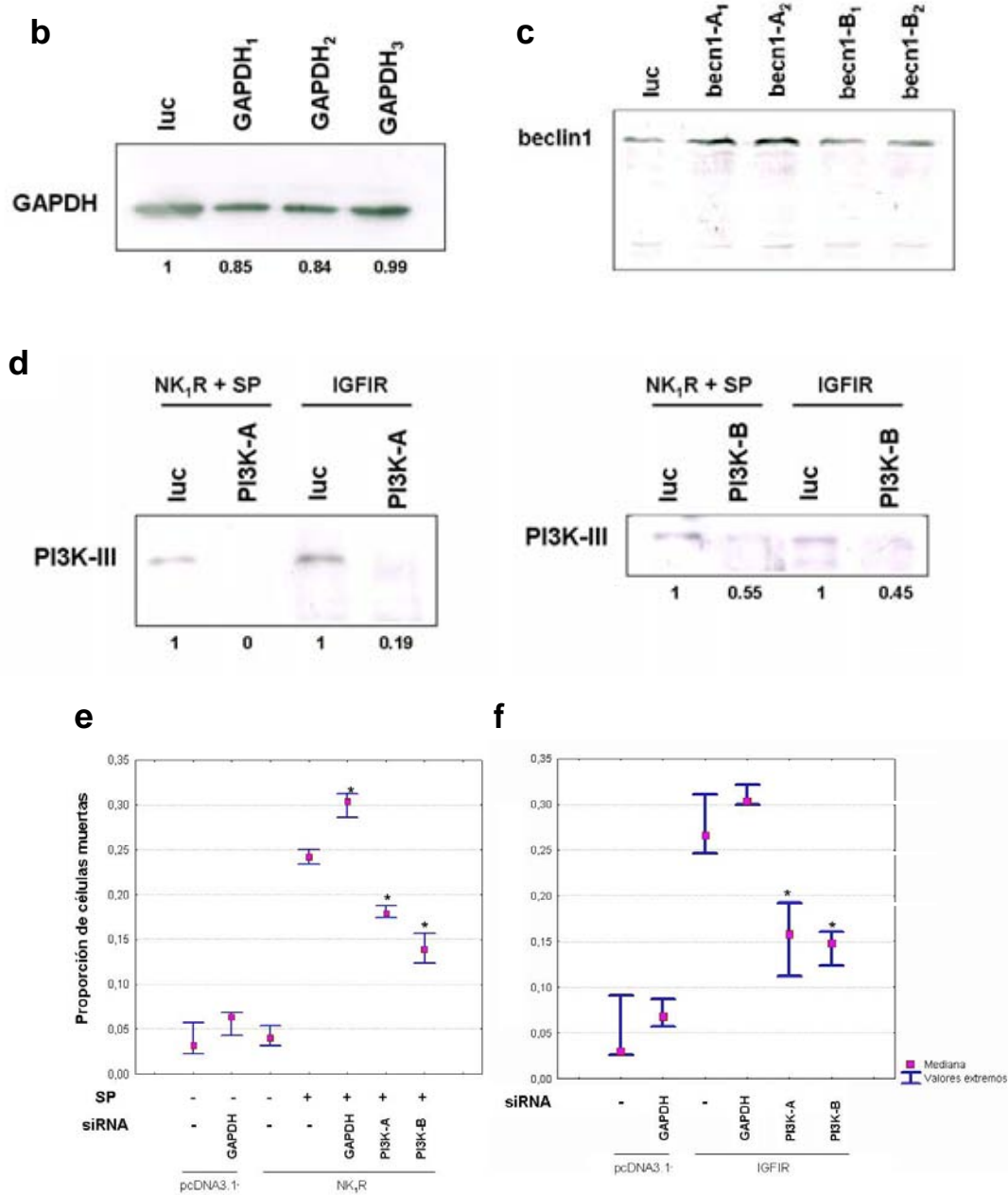
En el caso de la PI3K-III se utilizó un anticuerpo específico, con el cual observamos la desaparición de la banda de 100 kD correspondiente a la PI3K-III, 72 h después de transfectar cualquiera de los dos siRNAs diseñados para este gen. La síntesis de la PI3K-III no se afecta al transfectar el siRNA-luc como control. Por

el contrario, no fue posible silenciar beclin1 a pesar de que las dos secuencias utilizadas fueron tomadas de reportes anteriores en los que dichos blancos funcionaron exitosamente (**Figura 11c**). Por esta razón solamente se evaluó el efecto de la inhibición de la PI3K clase III en nuestros modelos de muerte no apoptótica, para lo cual fue necesario buscar las condiciones óptimas para transfectar, en un mismo cultivo de células HEK293T, los siRNAs, junto con los plásmidos con los receptores NK<sub>1</sub>R e IGFIR, sin que el proceso de transfección en sí fuera tóxico para el cultivo. Se utilizó el plásmido pcDNA3.1-RFP que expresa la proteína roja fluorescente y el siRNA-luc. Se obtuvo una eficiencia de transfección del plásmido mayor al 70% y más del 80% de las células incorporaron el siRNA. La eficiencia de la interferencia de los siRNAs se verificó al cotransfectar con los receptores NK<sub>1</sub>R e IGFIR (**Figura 11d**).

Finalmente, se determinó el efecto del silenciamiento de la PI3K-III en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R (**Figura 11e**) e IGFIR (**Figura 11f**). Las gráficas muestran la cuantificación del número de células muertas, realizada del mismo modo que en los experimentos anteriores. Ambas secuencias (PI3K-A y PI3K-B) disminuyeron la muerte de manera significativa. Como control se utilizó el siRNA-GAPDH, debido a que esta proteína no está involucrada en los mecanismos de muerte celular. Adicionalmente se transfectó el siRNA-luc para verificar la eficiencia de transfección en cada experimento.

**a**





**Figura 11. El silenciamiento de la PI3K-III por iRNA inhibe la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR.** (a) Micrografías representativas que muestran la eficiencia de transfección del siRNA-luc (verde) en comparación con el contraste de fases (CF), con una amplificación de 40X. (b) *Western Blot* anti-GAPDH, (c) anti-beclin1 y (d) anti-PI3K-III, del cual se obtuvieron los lisados de células cotransfectadas con NK<sub>1</sub>R + SP y con IGFIR. Los números inferiores indican la intensidad de la banda respecto al control. La gráfica muestra la proporción de células muertas al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R (e) e IGFIR (f); se indican la mediana y los valores extremos de los datos obtenidos en tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de Kruskal-Wallis para la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R:  $H(5, N=18)=16.1, p=0.0065$ ; y por IGFIR:  $H(4, N=15)=12.36, p=0.014$ . El asterisco indica los casos en los que se observan diferencias significativas ( $p<0.05$ ) respecto a los valores obtenidos al inducir muerte y a los controles negativos, utilizando una prueba de Mann-Whitney.

A pesar de la reducción en la proporción de células muertas recuperadas en los sobrenadantes al inhibir la PI3K, en muchas de las células que se mantuvieron adheridas al plato de cultivo se observaron vesículas citoplásmicas, tratándose probablemente de un estadio temprano de autofagia.

## 4. Modificación de LC3

### 4.1 Localización intracelular de LC3

Para analizar la distribución intracelular de LC3 al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR en comparación con un modelo de autofagia, se cotransfectaron los receptores con el plásmido pCAG-GFP-LC3 (Mizushima, *et al.* 2004), que expresa la proteína LC3 fusionada a GFP.

Está reportado que en condiciones normales, esta proteína de fusión LC3-GFP se encuentra dispersa en el citoplasma y durante la autofagia se distribuye de manera punteada, lo cual indica el procesamiento de la forma LC3-I citoplásmica, a la forma LC3-II, que se asocia con la membrana de los autofagosomas.

En contraste con lo anterior, observamos que en algunas células LC3-GFP se encuentra en el núcleo, tanto en las líneas celulares que aquí manejamos, HEK293T y L929, como en la línea COS-7, proveniente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Probablemente la alteración en su localización es consecuencia de la fusión con GFP, que es una proteína de tamaño considerable (30kDa), y podría afectar la distribución de LC3. Sin embargo, al inducir muerte con NK<sub>1</sub>R e IGFIR ocurre un cambio en la localización intracelular de LC3-GFP, que ahora se distribuye en forma punteada (**Figura 12a**), de modo similar a lo que ocurre al inducir autofagia con el inhibidor de caspasas zVAD.fmk (**Figura 12b**).

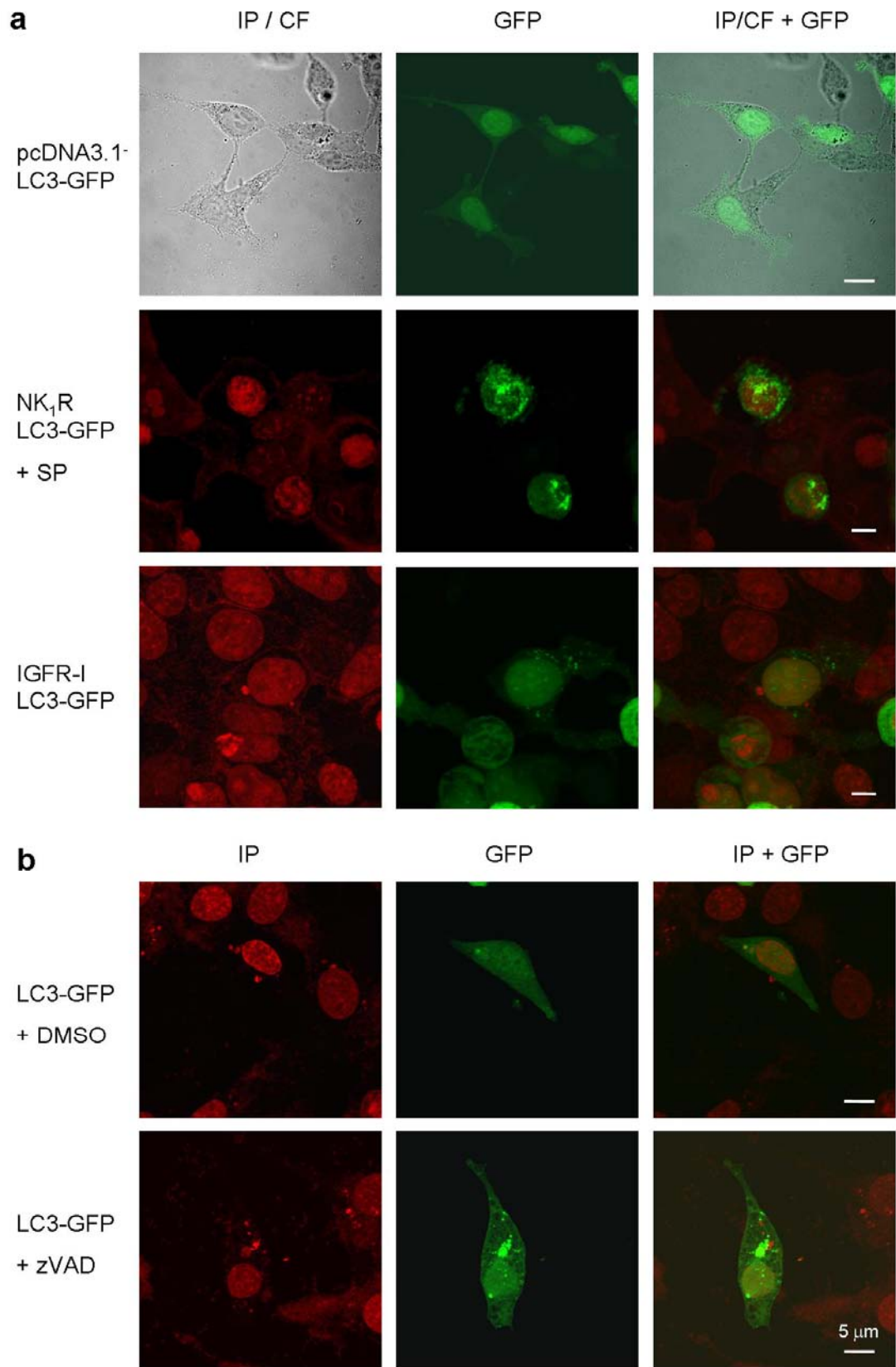
Para determinar el porcentaje de células en las que LC3 se redistribuye, se cuantificó el número de células en las que LC3-GFP se encuentra en forma punteada, en relación al número total de células fluorescentes verdes. Se analizaron 4 campos por condición en tres experimentos independientes, cada uno por duplicado (**Figura 12c**). En la gráfica se aprecia un incremento significativo en

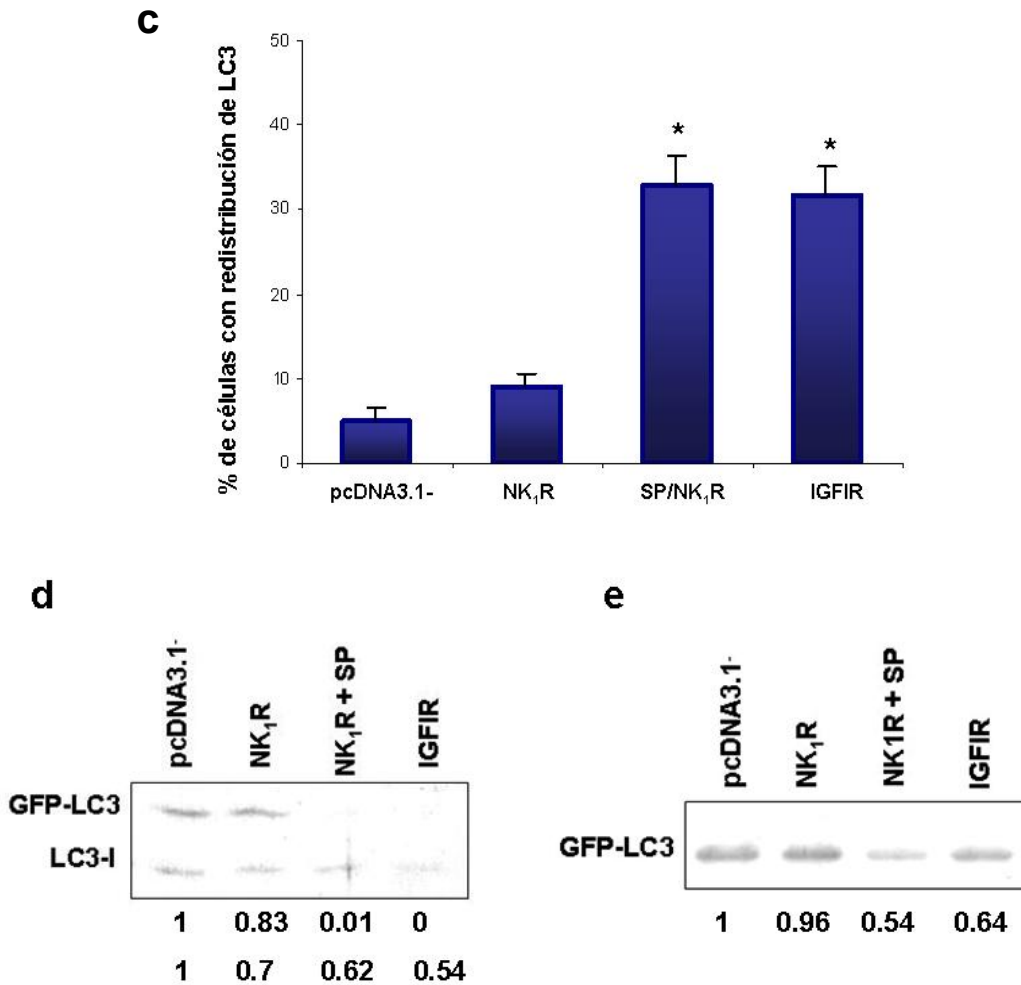
el porcentaje de células con distribución de LC3-GFP punteada al inducir muerte, en comparación con la transfección del vector vacío pcDNA 3.1<sup>+</sup> y del receptor NK<sub>1</sub>R sin agregar SP.

#### **4.2 Procesamiento de LC3**

Posteriormente, se evaluó mediante *Western Blot* si durante la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR ocurre el procesamiento postraduccional de LC3. Para esto se cotransfectaron células con GFP-LC3 y los receptores o el vector vacío como control. Los extractos de proteína total se obtuvieron 24 h después de la inducción de muerte con SP y 48 h después de inducir muerte por la transfección de IGFIR.

Al utilizar el anticuerpo primario anti-LC3 se observaron tres bandas. La primera corresponde a la fusión GFP-LC3 (38kD), lo cual fue verificado probando la membrana con un anticuerpo primario anti-GFP, dado que en este caso solamente se observa dicha banda. Las otras dos bandas coinciden con las formas LC3-I y LC3-II de la proteína endógena (18 y 16kD, respectivamente). La señal de la tercera banda no fue consistente en las réplicas realizadas, por lo que no podemos concluir nada al respecto y no se muestra. Sin embargo, en reportes anteriores se menciona que en algunos casos es difícil detectar la señal de las dos formas de LC3, ya que LC3-II se degrada en los autofagolisosomas y por lo tanto tiene una vida media corta (revisado en Mizushima, 2004). Suponiendo que la banda detectada de 18kD en realidad corresponde a LC3-I, se determinó la intensidad de las bandas de GFP-LC3 y LC3-I endógena, demostrando que al inducir muerte disminuye la cantidad de LC3-I en ambos casos (**Figura 12d-e**). Esto sugiere que en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR, LC3-I se procesa, lo cual es característico de la muerte autofágica, aunque éste es un resultado preliminar que requiere confirmación.





**Figura 12. LC3 se procesa al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR.** (a) Redistribución intracelular de la proteína de fusión LC3-GFP al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R, IGFIR y (b) al inducir autofagia por inhibición de caspasas con zVAD.fmk 20  $\mu$ M. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP). Las imágenes de fluorescencia y contraste de fases (CF) fueron tomadas por microscopía confocal con un aumento de 63X. (c) Cuantificación del porcentaje de células con redistribución punteada de LC3 en relación al total de células fluorescentes. *Western Blot* anti-LC3 (d) y anti-GFP (e), donde se observa una disminución en la cantidad de LC3-I al inducir muerte. Los números inferiores indican la intensidad de la banda en cada condición, en comparación con la intensidad al transfectar el vector vacío como control. En todos los casos se cotransfectó con GFP-LC3.

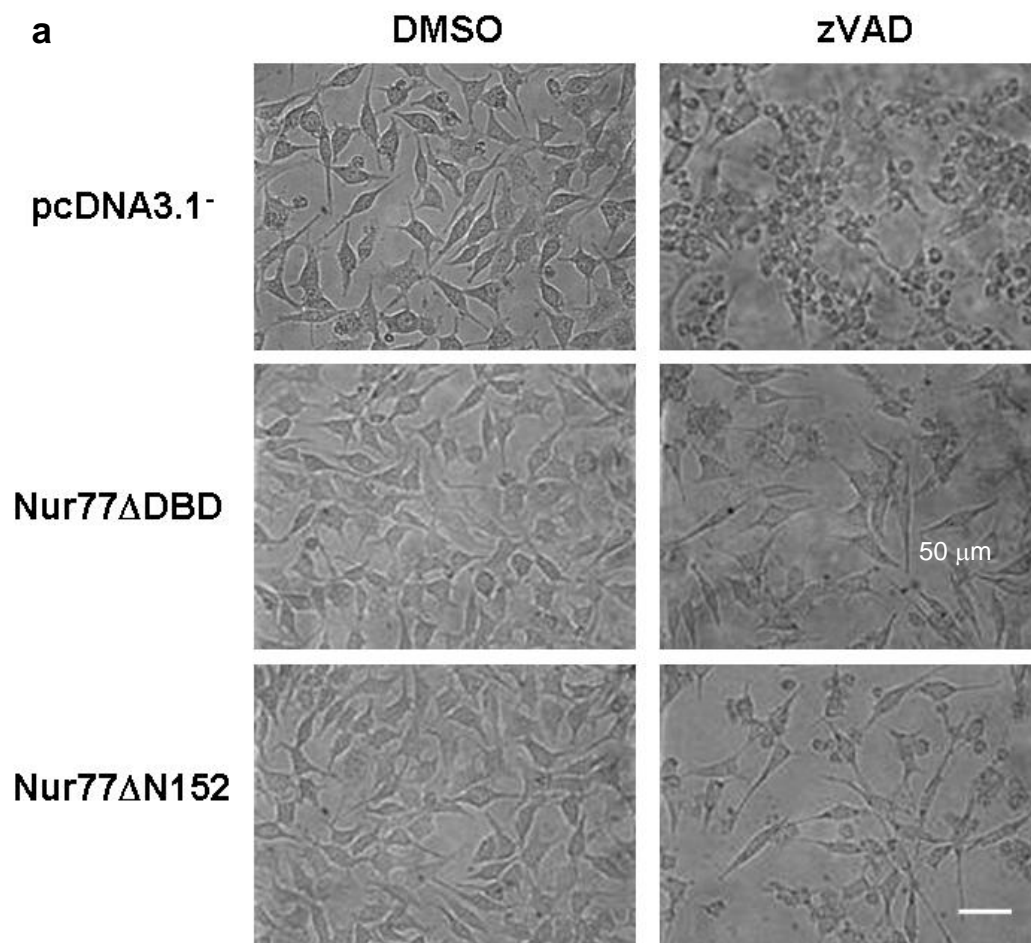
## 5. Participación de Nur77 en la autofagia inducida por inhibición de caspasas

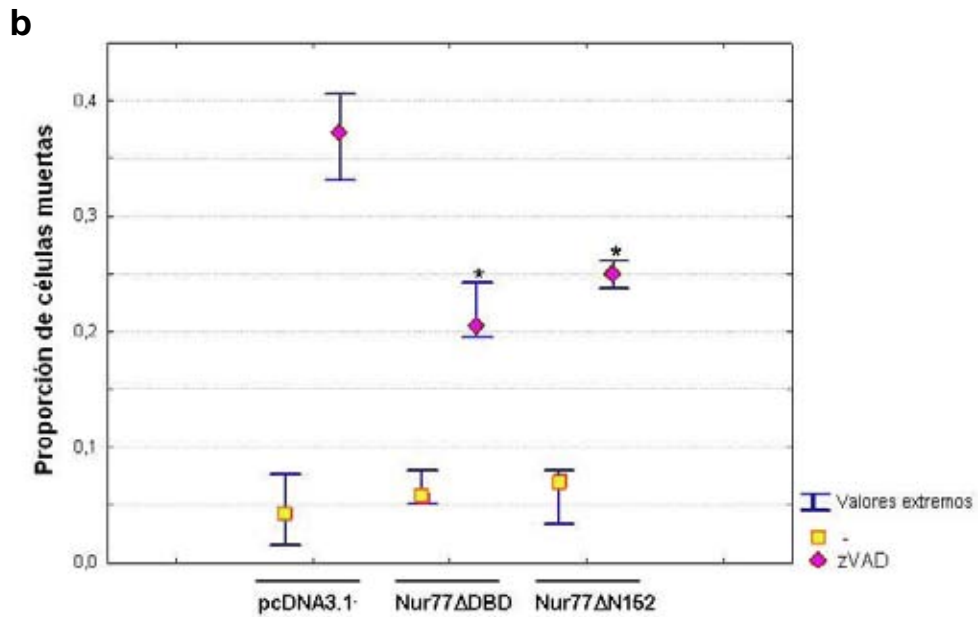
A partir de la observación de que Nur77 modula la muerte vesicular inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y por IGFIR, surgió el interés de analizar la función de Nur77 en la autofagia. Se utilizó como modelo la muerte de células L929 inducida por



inhibición de caspasas descrita por Yu, L., *et al.* (2004). Se expresaron de manera transitoria dos mutantes dominantes negativas de Nur77. Una mutante carece del dominio de unión al DNA (Nur77 $\Delta$ DBD), lo que impide su localización nuclear y la otra carece del dominio de transactivación (Nur77 $\Delta$ N152), impidiendo su traslocación a la mitocondria. La transfección de ambos plásmidos se llevó a cabo por lipofección, con una eficiencia de transfección del 40%.

La transfección de ambas mutantes disminuyó la muerte autofágica en forma significativa a pesar de la baja eficiencia de transfección (**Figura 13a**). Se estimó el número total de células muertas flotando en el medio, utilizando el colorante vital azul tripano. La gráfica (**Figura 13b**) muestra la proporción de células muertas en las diferentes condiciones, respecto al número total de células muertas recuperadas en los sobrenadantes en cada uno de tres experimentos independientes realizados con duplicado.





**Figura 13. La expresión de mutantes dominantes negativas de Nur77 previene la muerte autofágica inducida por inhibición de caspasas.** (a) Micrografías representativas de contraste de fases con un aumento de 40X. (b) Cuantificación de la proporción de células muertas en cada condición, en relación al número total de células muertas. La gráfica muestra la mediana, las barras indican los valores extremos superior e inferior. El asterisco indica las condiciones en las que se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a la proporción de células muertas obtenida al inducir muerte, utilizando una la prueba de Mann-Whitney para muestras pareadas independientes.

## VII. DISCUSIÓN

### 1. La inhibición química de la PI3K-III

Como parte inicial e indispensable para este trabajo fue necesario implementar en el laboratorio los protocolos de los modelos de muerte no apoptótica utilizados, que implican la transfección de plásmidos en dos líneas celulares distintas. Esto fue realizado exitosamente, dado que nuestras observaciones respecto a las características morfológicas de las células que mueren así como la incidencia de muerte, coinciden con los datos de los reportes donde fueron descritos (Castro, *et al.*, 2002; Sperandio, *et al.*, 2000; Yu, *et al.*, 2004).

Se tenía como antecedente que la muerte inducida tanto por SP/NK<sub>1</sub>R, como por IGFIR son ejemplos de MCP no apoptótica y que por sus características morfológicas podía tratarse de autofagia, de muerte citoplásmica, ó probablemente, de un mecanismo alternativo de muerte. Dado que se desconoce el mecanismo molecular de la muerte citoplásmica, optamos por analizar el efecto de la inhibición de la maquinaria autofágica, además de evaluar la presencia de marcadores de autofagia para determinar si en nuestros modelos de estudio está involucrado este tipo de muerte y si las vesículas observadas son autofágicas.

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del inhibidor bioquímico de autofagia LY294002 en el progreso de la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR. Dicho compuesto bloquea la actividad de la PI3K-III, cuya función es imprescindible en la formación de los autofagosomas. Nuestros resultados indican que ambos modelos de muerte requieren la cascada de señalización de la PI3K, dado que al inhibirla disminuye la muerte, lo cual sugiere que pudiera tratarse de muerte autofágica.

A pesar de que la reducción en la proporción de células que mueren al agregar LY194002 es estadísticamente significativa, no fue posible inhibir por completo la muerte, en comparación con los niveles basales observados en el control donde se transfectó solamente el vector vacío. Esto puede deberse en parte a que la concentración o el fármaco utilizado no son los ideales. Sin embargo, se ha visto que al inhibir autofagia inducida por falta de nutrientes, ya sea mediante iRNA de *Atg5*, *Atg6* o *beclin1*, ó utilizando fármacos como 3-MA, se

induce apoptosis (Boya, P *et al.*, 2005). Por el contrario, en ratones deficientes en genes de apoptosis como Apaf1, caspasa 3 y caspasa 9, otras formas de MCP pueden compensarla. Estas evidencias nos sugieren que al inhibir la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR bloqueando la actividad de la PI3K-III, probablemente se active un mecanismo alternativo de MCP. Para evaluar esta posibilidad decidimos utilizar simultáneamente el inhibidor genérico de caspasas zVAD.fmk. Resultados preliminares indican que al bloquear la autofagia y la apoptosis, la proporción de células muertas se reduce aún más, no obstante es necesario confirmarlo con experimentos adicionales.

Por otro lado, aunque se ha visto que el inhibidor LY294002 en concentraciones de hasta 50  $\mu$ M (mayor a la que aquí utilizamos), tiene un efecto específico sobre la PI3K (Gullon-Munos, *et al.*, 2005), se sabe poco respecto a su acción en las diferentes clases de PI3K, lo cual tiene implicaciones en la interpretación de nuestros resultados, dado que, como se menciona en la introducción, solamente la clase III participa en la autofagia, mientras que la clase I la inhibe. Por esta razón se optó por inhibir específicamente la PI3K-III mediante iRNA.

## **2. La inhibición por iRNA de la PI3K-III previene la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR**

A continuación, optamos por bloquear la maquinaria autofágica inhibiendo la expresión de *Beclin 1* y de la *PI3K-III*, genes esenciales para este proceso, mediante interferencia de RNA. Esta técnica ha sido una herramienta útil para determinar la función de muchos genes, dado que permite silenciarlos a nivel postranscripcional en forma específica y relativamente sencilla.

De acuerdo con las características de nuestros experimentos, consideramos factible utilizar pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) sintetizados *in vitro*, dado que contamos con una línea celular en la que se pueden transfectar con alta eficiencia en forma transitoria, lo cual permite inhibir la expresión de los genes de interés durante algunos días, siendo suficiente para evaluar su efecto. En el caso de *Beclin 1*, a pesar de que se utilizaron dos

secuencias blanco publicadas, no disminuyó la cantidad de proteína detectada mediante *Western Blot* ni a las 48 ni a las 72 h de la transfección. Por el contrario, las dos secuencias diseñadas para silenciar la PI3K-III funcionaron exitosamente.

Actualmente no se sabe con certeza de qué depende la eficiencia de un siRNA para bloquear la expresión de un gen. Empíricamente se han determinado algunos criterios que deben tomarse en cuenta en su diseño, por ejemplo, el que la secuencia debe ser de 19 nucleótidos e iniciar con AA en el extremo 5'; que debe tener un contenido de GC entre el 30 y 70%; y que debe analizarse la estructura terciaria del RNA de interferencia para evitar seleccionar secuencias cuya estructura impida su función. Sin embargo esto no garantiza su funcionalidad y, en cambio, ciertas secuencias que no cumplen dichos requisitos inhiben adecuadamente la traducción del gen blanco (revisado por Sandy, *et al.*, 2005). La interferencia con siRNAs es muy específica, dado que la secuencia del RNA interferente debe coincidir completamente con la secuencia blanco. Esto ha llevado a proponer que la existencia de polimorfismos es una de las causas por las que muchas veces no funciona esta técnica, dado que pequeñas diferencias en la secuencia del gen, que no alteran su función, impiden la interferencia con RNAs. Probablemente esa es la razón por la que no fue posible inhibir *Beclin 1* utilizando siRNAs que en otras líneas celulares habían funcionado.

Es importante considerar que existe la posibilidad de que, a pesar de tratarse de un evento celular dependiente de la PI3K-III, no sea autofagia, dado que esta cinasa está involucrada en otros procesos de tráfico de membranas como la fusión de los endosomas. Por lo anterior, aunque este resultado no es evidencia suficiente de que la autofagia sea responsable de la muerte celular, sí indica que está implicado un mecanismo de tráfico lisosomal dependiente de la PI3K. Por otro lado, dichas funciones alternativas de la PI3K-III explicarían el hecho de que, aunque haya disminuido la incidencia de células muertas recuperadas en los sobrenadantes al inhibir la PI3K-III, se siguieron observando células adheridas con vesículas citoplásmicas, ya que la interferencia de la PI3K-III podría ocasionar la acumulación de vesículas, independientemente de la inhibición del proceso de muerte autofágica.

Es importante tomar en cuenta que debido a problemas metodológicos no fue posible evaluar el efecto de inhibir completamente la expresión de la PI3K tipo III, dado que ni la inducción de muerte que implica la transfección de plásmidos, ni el silenciamiento que requiere de la transfección del siRNA, ocurren en todas las células del cultivo. Se probaron diferentes condiciones para lograr la mayor eficiencia de transfección sin que éste proceso fuera tóxico, lo cual es indispensable dada a la naturaleza de nuestro estudio. Sin embargo, como puede verse en el experimento control, la simple transfección del vector vacío (pcDNA3.1) y/o el siRNA control (siRNA-GAPDH) ocasionan la muerte de algunas células, siendo una posible razón por la que no se pudo prevenir la muerte celular en mayor magnitud. Adicionalmente, como se mencionó en la sección anterior, la inhibición de la autofagia pudiera ocasionar la activación de un mecanismo alternativo de MCP.

### **3. Modificación postraducciona de LC3**

Dado que nuestros resultados sugieren que la muerte que estudiamos es de tipo autofágico, decidimos estudiar qué pasaba con el marcador de autofagosomas LC3 durante el proceso de muerte. Esta proteína ha sido muy utilizada recientemente en estudios de autofagia y se ha propuesto como un marcador útil de autofagosomas, debido a que su procesamiento es indispensable en la formación de los autofagosomas. Es posible dar seguimiento a dicha modificación postraducciona mediante inmunocitoquímica o a través de la formación de una proteína de fusión como la que aquí utilizamos (GFP-LC3), ya que la forma LC3-II, que se asocia con los autofagosomas, tiene una distribución intracelular distinta a la forma LC3-I. Adicionalmente, LC3-I tiene una movilidad aparente menor en geles desnaturizantes por lo que pueden detectarse ambas bandas mediante *Western Blot*.

Se esperaba que en condiciones normales LC3 estuviera distribuida uniformemente en el citoplasma, como se ha mostrado en distintos reportes anteriores en los que incluso utilizan el plásmido p-GFP-LC3 (Mizushima, *et al.* 2004), al igual que en este trabajo. Sin embargo, en un porcentaje considerable de

células de tres líneas celulares distintas (HEK293T, L929 y COS7, de esta última no se muestran resultados), GFP-LC3 se encuentra principalmente en el núcleo. Posiblemente esto es ocasionado por la fusión con la proteína GFP, por lo cual intentamos detectar la proteína LC3 endógena mediante inmunocitoquímica, pero esto no fue posible con el anticuerpo anti-LC3 utilizado.

A pesar de la localización nuclear de GFP-LC3, al inducir muerte con SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR observamos un cambio en la distribución intracelular, ya que aproximadamente en un 30% de células se forman agregados fluorescentes en forma similar a lo que ocurre al inducir autofagia por inhibición de caspasas. Es importante notar que dichos agregados se encuentran fuera del núcleo y que en muchos casos desaparece la señal dispersa en el citoplasma e incluso la del núcleo y se concentra en los agregados. Este resultado sugiere que las vesículas observadas en la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR, en realidad son autofágicas.

En diversos reportes se ha detectado el procesamiento de LC3 mediante Western Blot, como un indicador de muerte autofágica. En algunos casos se menciona que no ha sido posible distinguir las dos formas de LC3 debido a que LC3-II se degrada en gran medida dentro de los autofagolisosomas. Por esta razón, la cantidad de LC3-II no puede usarse como un indicador cuantitativo de autofagia (revisado en Mizushima, 2004). En nuestro caso, no fue posible distinguir con certeza las dos formas de la proteína endógena y sólo se obtuvo una banda para la proteína de fusión con GFP, por lo que de modo preliminar solamente se cuantificó la intensidad de la banda que creemos corresponde a LC3-I. Hasta el momento no se ha reportado que exista una regulación a nivel transcripcional de LC3 relacionada a la autofagia, únicamente su modificación a nivel postraduccional, por lo que la disminución en la cantidad de LC3-I endógena y de LC3-GFP, puede ser un indicador su procesamiento y por lo tanto de autofagia.

En las réplicas realizadas no se obtuvo un resultado consistente respecto a LC3-II, lo cual puede deberse a la baja cantidad de proteína endógena aunada a su rápida degradación. Por otro lado, mediante experimentos de fraccionamiento

celular se reconoció LC3-I como una proteína soluble presente en los sobrenadantes, y LC3-II asociada a las membranas, en los pellets celulares (Kabeya, Y. *et al.*, 2000). Con base en esto, pudiera ser que el método de extracción de proteínas que utilizamos no sea el adecuado para disociar LC3-II de los autofagosomas. Se requieren experimentos adicionales para poder concluir sobre este tema.

#### **4. La muerte autofágica inducida por inhibición de caspasas requiere de Nur77**

Diferentes evidencias indican que Nur77 está involucrado en la modulación de la MCP y que es indispensable en la inducción de la apoptosis, la cual se puede activar a través de dos mecanismos distintos, dependiendo del tipo celular y del estímulo apoptótico; ya sea como factor de transcripción que regula la expresión de genes que activan la vía extrínseca, o al traslocarse del núcleo a la mitocondria, lo cual genera la liberación de citocromo c y en consecuencia la activación de caspasas. Se ha visto que su función como factor transcripcional puede bloquearse mediante la expresión de una mutante dominante negativa que carece del sitio de unión a DNA (Nur77 $\Delta$ DBD) (Liu, *et al.*, 1994; Woronitz, *et al.*, 1994). El segundo mecanismo descrito no depende de la actividad transcripcional de Nur77, ya que la mutante Nur77 $\Delta$ DBD no evita la muerte en esas circunstancias; en cambio, depende de la presencia del dominio de transactivación, dado que una mutante que carece de este dominio (Nur77 $\Delta$ N152) previene la muerte (Li, *et al.*, 2000).

La expresión de ambas mutantes dominantes negativas inhibe la muerte no apoptótica inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR en las células HEK293T, lo cual indica que a pesar de tratarse de rutas iniciadas por receptores distintos, el primero acoplado a proteínas G y el segundo una cinasa de tirosinas, convergen en la activación de Nur77. Por lo anterior, Nur77 podría ser un elemento central en la modulación de mecanismos alternativos de muerte celular. Esta idea nos motivó a evaluar su función en un modelo de MCP distinto, en este caso la autofagia



inducida por inhibición de caspasas, considerando, además, que nuestros datos sugieren que la MCP inducida por SP/NK<sub>1</sub>R e IGFIR es de tipo autofágico.

A pesar de que no se logró una alta eficiencia en la transfección de la línea celular L929, se obtuvo una reducción significativa en la autofagia al bloquear la función de Nur77 mediante la expresión de Nur77 $\Delta$ DBD y Nur77 $\Delta$ N152, lo cual es la primera evidencia de que este receptor nuclear forma parte del mecanismo molecular de la MCP de tipo autofágico. Debido a que ambas mutantes bloquearon la muerte autofágica, no es posible discernir si Nur77 actúa por alguno de los mecanismos anteriormente descritos para la apoptosis. Es necesario realizar experimentos adicionales para entender el mecanismo por el cual modula la autofagia.

Nuestros resultados sugieren que Nur77 podría ser un elemento central en la regulación de la MCP, dado que además de su función proapoptótica y antiapoptótica, parece regular la muerte autofágica. Esto es consistente con distintas evidencias que sugieren que existe interacción entre la muerte apoptótica y la autofágica. Por ejemplo, la activación de caspasas característica de la apoptosis, sucede en modelos de muerte celular que presentan vesículas autofágicas, como en la MCP que ocurre en las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* (Baeharcke, 2004). Por otro lado, al inhibir la autofagia se induce apoptosis en condiciones de escasez de nutrientes (Boya, P., et al., 2005). De modo similar, Shimizu, *et al.* (2004) demostraron que una línea de fibroblastos embrionarios de ratón que carecen de BAX y BAK (miembros de la familia de BCL-2) es resistente a apoptosis, pero muere por autofagia.

El hecho de que Nur77 sea capaz de modular ambas formas de muerte tiene una gran relevancia en el entendimiento de los programas de MCP, y por consiguiente es potencialmente aplicable en el tratamiento de patologías asociadas a la desregulación de los mecanismos normales de MCP. El estudio del mecanismo de acción de Nur77 podría derivar en la generación fármacos que disminuyan la muerte degenerativa, o bien que activen la muerte en células cancerosas resistentes a la quimioterapia actual.

## **5. La autofagia como mecanismo de muerte y supervivencia**

Actualmente se reconoce que existen diferentes mecanismos de MCP y que la autofagia es esencial en la muerte celular que ocurre tanto en el desarrollo como en algunas patologías asociadas al envejecimiento. Sin embargo, aún está en discusión si la autofagia, además de ser un mecanismo constitutivo de degradación de proteínas, necesario para mantener la homeostasis celular, puede culminar en muerte celular; y de ser así, está en duda si existen mecanismos de MCP adicionales.

El hecho de que la autofagia es un proceso común en organismos primitivos que se ha conservado en todos los eucariontes, aunado a su función básica como mecanismo de degradación de proteínas, indica que pudiera tratarse de un proceso evolutivamente anterior a otras formas de MCP, por lo que su comprensión tendría relevancia en el entendimiento de la evolución de los programas de muerte celular.

Las evidencias presentadas en este trabajo indican que tanto la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R, como la paraptosis, que originalmente se describió como una forma distinta de MCP, en realidad son modelos de muerte autofágica. Esto sugiere que no existe la paraptosis, sino que pudiera tratarse de una etapa de la autofagia.

El entendimiento del mecanismo molecular de la autofagia es indispensable para comprender procesos básicos del desarrollo y el envejecimiento. Adicionalmente, la regulación de la actividad autofágica tiene un potencial impacto en el tratamiento de la neurodegeneración y el cáncer. Los modelos de MCP autofágica utilizados en este trabajo pueden ser de gran utilidad para el estudio de dicho proceso.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados sugieren que la muerte inducida por SP/NK<sub>1</sub>R y por IGFIR es de tipo II o autofagia dado que:

- Al inhibir la cinasa promotora de autofagia PI3K-III químicamente (LY294002) o por iRNA se reduce la muerte.
- Ocurre una redistribución intracelular de LC3, que es característica de la muerte autofágica.
- Es modulada por el receptor nuclear Nur77, que también es necesario para la progresión de la muerte autofágica inducida por inhibición de caspasas.

2. El receptor nuclear Nur77 puede ser un regulador central de la activación de diferentes programas de muerte celular programada.

## IX. PERSPECTIVAS

A pesar de que nuestros resultados sugieren que la muerte inducida tanto por SP/NK<sub>1</sub>R como por IGFIR son de tipo autofágico, aún es necesario complementar con la inhibición por RNAi de otros genes específicos de autofagia, como Atg5, Atg7 ó beclin1, cuyo silenciamiento lamentablemente no se logró.

Respecto al mecanismo por el cual actúa Nur77 para inducir muerte autofágica, sería interesante estudiar si durante dicho proceso Nur77 tiene actividad de factor transcripcional, además de evaluar el nivel de expresión de genes que se sabe son regulados por Nur77. Por otro lado, proponemos analizar la distribución intracelular de Nur77 al inducir muerte, para determinar si éste actúa mediante la señalización de moléculas efectoras en la mitocondria u otro organelo.

Para dar soporte a nuestra propuesta de que Nur77 es un modulador central de diferentes vías de muerte celular, es necesario evaluar su papel en distintos modelos de muerte, por lo que proponemos analizar el efecto de inhibir Nur77, por ejemplo, en la muerte no apoptótica inducida por la estimulación de receptores con “dominio de muerte” (DRs) en presencia de zVAD.fmk (Holler, *et al.*, 2000).

Es importante considerar que los resultados obtenidos en este trabajo fueron producto de experimentos en células en cultivo *in vitro*, que suponemos reflejan lo que sucede *in vivo*. Sin embargo, es indispensable dar soporte y validez a nuestras conclusiones mediante una aproximación más cercana a las condiciones que existen en la naturaleza. Sabemos que la SP induce MCP en cultivos primarios de neuronas y se tiene evidencia de que está involucrada en la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Adicionalmente, se ha visto que la muerte que ocurre durante la neurodegeneración no es predominantemente apoptótica. Por lo anterior, sería relevante estudiar la función de Nur77 en la MCP *in vivo*.

## X. APÉNDICE: MEDIOS Y SOLUCIONES

### 1. Cultivo de células

#### **D-MEM** (“Dubelco’s modified Eagle Medium”) (GIBCO #12100-046)

Para 1 litro: 1 sobre de medio en polvo

3.7 g de NaHCO<sub>3</sub>

H<sub>2</sub>O grado cultivo

- Disolver el medio en polvo en 800 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo mediante agitación suave.
- Añadir 3.7 g de NaHCO<sub>3</sub> y agitar hasta disolver.
- Ajustar el pH a 6.9 con HCl 1N.
- En campana, aforar a 1 litro y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.
- Almacenar a 4°C y utilizar en un período máximo de 2 meses.

#### **Suero fetal bovino** (FBS, “fetal bovine serum”) (GIBCO #16000-044)

- Inactivar las proteínas del complemento, calentado a 56°C durante 30 minutos.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para utilizar, descongelar una alícuota y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

#### **GPS 100X.** (Glutamina + Penicilina + Estreptomicina)

Para 100 ml: 100 ml de Gluta-Max 200mM (GIBCO #35050-061)

300 mg de penicilina

500 mg de estreptomicina

- Transferir 10 ml de Gluta-Max a un tubo de 15 ml.
- Agregar la penicilina y la estreptomicina. Disolver.
- Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm y agregar la solución al restante de Gluta-Max. Mezclar homogéneamente.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para utilizar, descongelar y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

#### **PBS 1X** (Buffer salino de fosfatos)

Para 1 litro: 8 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>O

- Disolver y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µm.

#### **Tripsina 0.25%** (GIBCO #15090-046)

Para 20 ml: 2 ml de tripsina 2.5% en H<sub>2</sub>O grado cultivo (se almacena a -20°C)

18 ml de Verseno (GIBCO #15040-066)

### **Medio de crecimiento para HEK293T**

Para 250 ml: 220 ml de D-MEM  
25 ml de FBS (final 10%)  
2.5 ml de GPS 100X (final 1X)  
2.5 ml de piruvato de sodio (Gibco #11360-070)

### **Medio de crecimiento para L929**

Para 250 ml: 222.5 ml de D-MEM  
25 ml de FBS (final 10%)  
2.5 ml de GPS 100X (final 1X)

### **Medio de congelación 2X**

Para 10 ml: 6 ml de D-MEM  
2 ml de FBS (final 20%)  
2 ml de DMSO (final 20%) (Sigma #D2650)

### **Paraformaldehído (PFA) 4%**

Para 100 ml: 4 g de paraformaldehído  
50 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada

- Utilizar guantes y cubrebocas y trabajar en campana.
- Para disolver, calentar a 60-70 °C y añadir 100 µl de NaOH 10N. Dejar enfriar.
- Adicionar 50 ml de PBS 2X.
- Ajustar pH a 7.2 con HCl.
- Aforar con H<sub>2</sub>O.
- Filtrar a través de membrana de 0.22 µm, alicuotar y almacenar a -20°C.

### **Solución de montaje**

Para 1 ml: 500 µl de carbonato de sodio 0.1M pH 9  
500 µl de glicerol

## **2. Inmunoblot**

**Solución amortiguadora de lisis.** (HEPES 20mM + DTT 1mM + Mesilato de deferoxamina 0.1mM + PMSF 1 mM).

Para 10 ml: 200 µl de HEPES 1M  
100 µl de DTT 100mM  
10 µl de desferal 100mM  
9.59 ml de H<sub>2</sub>O  
Antes de usar adicionar 100 µl de PMSF 100mM.

**HEPES 1M** (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetansulfónico) (Sigma #H-6147)

Para 10 ml: 2.383 g de HEPES  
10 ml de H<sub>2</sub>O

- Esterilizar por filtración y almacenar a -20°C.

### **DDT 100mM**

### **PMSF 100mM**

Para 10 ml: 174 mg de PMSF  
10 ml de isopropanol

- Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Acrilamida/Bis (30% T, 2.67% C)**

Para 100 ml: 29.2 g de acrilamida  
0.8 g de N'N'-bis-metileno-acrilamida  
H<sub>2</sub>O desionizada

- Utilizar guantes y cubre bocas.
- Disolver, filtrar y almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad.

### **Tris-HCl 1.5M, pH 8.8**

Para 150 ml: 27.23 g de Tris base  
80 ml de H<sub>2</sub>O

- Ajustar pH 8.8 con HCl 6N.
- Aforar con H<sub>2</sub>O y almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **Tris-HCl 0.5M, pH 6.8**

Para 100 ml: 6 g de Tris base  
60 ml de H<sub>2</sub>O

- Ajustar pH 6.8 con HCl 6N.
- Aforar con H<sub>2</sub>O y almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **TEMED (Bio-Rad #161-0801)**

### **Persulfato de amonio (APS) 10% (Bio-Rad #161-0700)**

Para 1 ml: 100 mg de APS  
1 ml H<sub>2</sub>O

- Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **Solución amortiguadora de corrida.** (Tris 25mM, pH 8.3 + glicina 192mM + SDS 0.1%).

Para 1 litro: 3.03 g de Tris base  
14.4 g de glicina  
1 g de SDS  
H<sub>2</sub>O

### **Solución amortiguadora de carga 5X**

Para 9.5 ml: 3.55 ml de H<sub>2</sub>O desionizada  
1.25 ml de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8  
2.5 ml de glicerol

2 ml de SDS 10%  
200  $\mu$ l de azul de bromofenol 0.5%

- Almacenar a 4°C.
- Antes de usar, añadir 50  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad #161-0710) a cada 950  $\mu$ l de buffer.

**Solución amortiguadora de transferencia.** (Tris 25mM, pH 8.3 + glicina 192mM + metanol 20% + SDS 0.1%).

Para 1 litro: 3.03 g de Tris base  
14.4 g de glicina  
1 g de SDS

- Disolver en H<sub>2</sub>O, aforando a 800 ml
- Añadir 200 ml de metanol

**TBST.** (Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 + NaCl 0.9% + Tween 20 0.1%).

Para 1 litro: 100 ml de Tris-HCl 1M, pH 7.5  
9 g de NaCl  
1 ml de Tween 20  
H<sub>2</sub>O

**Solución para remover anticuerpos** ( $\beta$ -mercaptoetanol 100nM, SDS 2%, tris HCL pH6.7 62.5 mM)

Para 10ml: 70  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol  
2 ml SDS 10%  
1.25 ml tris HCL pH6.7  
6.68 ml H<sub>2</sub>O



## XII. REFERENCIAS

- Baehrecke, E. (2005) Autophagy: dual roles in life and death?, *Nature Reviews Mol Cell Biol*, 6:505-510.
- Baehrecke, E. (2003) Autophagic programmed cell death in *Drosophila*, *Cell Death Differ*, 10:940-945.
- Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z. (2004) The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases, *IJBCB*, 36:2392-2404.
- Blommaert, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H. y Meijer, A. (1997) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes, *Eur J Biochem*, 243:240-246.
- Boya, P., González-Polo, R-A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. y Kroemer, G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis, *Mol Cell Biol*, 25:1025-1040.
- Bröker, L., Kruyt, F. y Giaccone, G. (2005) Cell death independent of caspases: a review, *Clin Cancer Res*, 11:3155-3162.
- Bras, A., Albar, J. P., Leonardo, E., de Buitrago, G. G. y Martinez, A. C. (2000) Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells, *Cell Death Differ*, 7:262-271.
- Bredesen, D.E., Mehlen, P. Y., Rabizadeh, S. (2005) Receptors that mediate cellular dependence, *Cell Death Diff*, 12:1031-1043.
- Castro-Obregón, S., del Rio, G., Chen, S.F., Swanson, R.A., Frankovski, H., Rao, R.V., Stoka, V., Vesce, S., Nicholls, D.G. y Bredesen, D.E. (2002) A ligand receptor pair triggers a non-apoptotic form of programmed cell death, *Cell Death and Differ*, 9:807-817.
- Castro-Obregón, S., Rao, R.V., del Rio, G., Chen, S.F., Poksay, K.S., Rabizadeh, S., Vesce, S., Zhang, X., Swanson, R.A. y Bredesen, D.E. (2004) Alternative, non-apoptotic programmed cell death: mediation by Arrestin 2, ERK2 and Nur77, *J Biol Chem*, 279:17543-53.
- Clarke, P. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anat Embryol*, 181:195-213.

- Cuervo, A.M. (2004) Autophagy: in sickness and in health, *TRENDS Cell Biol*, 14:70-77.
- Dal Canto, M.C. y Gurney, M.E. (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis, *Am J Pathol*, 145:1271-1279.
- Edinger, A.L. y Thompson, C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Op Cell Biol*, 16:663-669.
- Furuya, D., Tsuji, N., Yagihashi, A. y Watanabe, N. (2005) Beclin 1 augmented *cis*-diamminedichloro platinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity, *Exp Cell Res*, 307:26-40.
- González-Polo, R., Boya, P., Pauleau, A., Jalil, A., Larochette, N., Souquère, S., Eskelinen, E., Pierrot, G., Saftig, P. y Kroemer, G. (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death, *J Cell Science*, 118:3091-3102.
- Guillon-Munos, A., Bemmelen, M. y Clarke, P. (2005) Role of phosphoinositide 3-kinase in the autophagic death of serum-deprived PC12 cells, *Apoptosis*, 10:1031-1041.
- Holler, N. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, *Nat Immunol*, 1:489-495.
- Honkaniemi, J. y Sharp, F.R. (1999) Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizure, *Eur J Neurosci*, 11:10-17.
- Kim, S.O., Ono, K., Tobias, P.S. y Han, J. (2003) Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death, *J Exp Med*, 197:1441-1452.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. y Yoshimori, T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, *EMBO Journal*, 19:5720-5728.
- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Ozato, K. y Guroff, G. (2000) Modulation of retinoid signaling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B, *Nat Cell Biol*, 2:435-440.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. y Yoshimori, T. (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network, *EMBO Rep*, 2:330-335.

- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. y Ohsumi, Y. (2000) The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway, *J Cell Biol*, 151:263-276.
- Klionski, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Emr, S.D., Saki, Y. y Sandoval, I.V (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes, *Dev Cell*, 5:539-545.
- Kuma, A., Hatano, M., Matusi, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T. y Mizushima, N. (2004) The role of autophagy during early neonatal starvation period, *Nature*, 432:1032-1036.
- Levine, B. y Klionsky D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Dev Cell*, 6: 463-477.
- Levine, B y Yuan, J. (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict?, *J Clin Inv*, 115:2679-2688.
- Li, Y., Lin, B., Agadir, A., Liu, R., Dawson, M., Reed, J., Fontana, J., Bost, F., Hobbs, P., Zheng, Y., Chen, Shroot, B., Mercola, D y Zhang, X. (1998) Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines, *Mol Cel Biol*, 18:4719–4731.
- Li, H., Kolluri, S., Gu, J., Dawson, M., Cao, X., Hobbs, P., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J., Reed, J. y Zhang, X. (2000) Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3, *Science*, 289:1159-64.
- 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 *beclin 1*, *Nature*, 402:672-676.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X., Dawson, M.I., Reed, J.C. y Zhang, X. (2004) Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3, *Cell*, 116:527-540.
- Liu, J., Baker, J., Perkins, A., Robertson, E. y Efstratiadis, A. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r), *Cell*, 75:59-72.
- Liu, Z., Smith, S., McLaughlin, K., Schwartz, L. y Osborne, B. (1994) Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature*, 367:281-284.

- Liu, H., Cao, Y., Basbaum, A., Mazarati, A., Sankar, R. y Wasterlain, G. (1999) Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. *Proc Natl Acad Sci*, 96:12096-12101.
- Liu Y, Lehar S, Corvi C, Payne G, O'Connor R. (1998) Expression of the insulin-like growth factor I receptor C terminus as a myristylated protein leads to induction of apoptosis in tumor cells, *Cancer Res*, 58:570-6.
- Majno, G. y Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 146:3-15.
- Meijer, A.J. y Codogno, P. (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells, *IJBCB*, 36:2445-2462.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y. y Yoshimori T. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells, *J Cell Biol*, 152: 657-668.
- Mizushima, N. (2004) Methods for monitoring autophagy, *IJBCB*, 36:2491-2502.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. y Ohsumi, Y. (2004) In vivo analysis to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker, *Mol Biol Cell*, 15:1101-1111.
- Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide, *Cell Death Differ*, 12:1535-1541.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. y Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12, *J Biol Chem*, 277:34287-94.
- Munafó, D.B. y Colombo, M.I. (2001) A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation, *J Cell Sc*, 114:3619-3629.
- Noda, T., Suzuki, K. y Ohsumi, Y. (2002) Yeast autophagosomes: *de novo* formation of a membrane structure, *TRENDS Cell Biol*, 12:231-235.
- Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems, *Nature Reviews*, 211-216.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. y Levine, B. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy, *Cell*, 122:927-939.

- Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M., Gauthier, Y., Hugo, P. y Drouin, J. (1997) Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells, *Mol Cell Biol*, 17:5946-5951.
- Rajpal, A., Cho, Y.A., Yelent, B., Koza-Taylor, P.H., Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, Ch., Turi, T.G. y Winoto, A. (2003) Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor, *EMBO Journal*, 22:6526-6536.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J., Luo, S., Oroz, L., Scaravilli, F., Easton, D., Duden, R., O'Kane, C. y Rubinsten, D. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and Mouse models of Huntington disease, *Nature genetics*, 36:585-595.
- Raffa, R. (1998) Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders, *Neurosci Biobehav Rev*, 22:789-813.
- Rao, R.V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, V., Bredesen, D. y Ellerby, H. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway, *J Biol Chem*, 277:21836-42.
- Rao, R.V., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E. (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program, *Cell Death Differ*, 11:372-380.
- Salvesen, G.S. y Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell*, 1997. 91:443-446.
- Sandy, P., Ventura, A. y Jacks, T. (2005) Mammalian RNAi: a practical guide, *BioTechniques*, 39: 215-224.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C y Tsujimoto, Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nat Cell Biol*, 6:1221-1228.
- Shintani, T. y Klionski, D. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword, *Science*, 306:990-995.
- Sperandio, S., de Belle, I y Bredesen, D. (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death, *PNAS*, 97:14376-14381.
- Suzuki, S., Suzuki, N., Mirtsos, C., Horacek, T., Lye, E., Noh, S., Ho, A., Bouchard, D., Mak, T. W., y Yeh, W. C. (2003) Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling, *PNAS*, 100: 8276-8280.

- Tanida, I., Ueno, T. y Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy, *IJBCB*, 36:2503-2518.
- Thornberry, N.A. y Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within, *Science*, 281: 1312-1316.
- Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G y Davies, S. (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8093-8097.
- Uemura, H. y Chang, C. (1998) Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment, *Endocrinology*, 139:2329-2334.
- Walton, M., *et al.* (1999) Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage, *Brain Res Rev*, 29:137-68.
- Wang, Ch. y Klionsky, D.J. (2003) The molecular mechanism of autophagy, *Mol Med*, 9:65-75.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. y Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast, *Science*, 263:1296-1300.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M. y Milbrandt, J. (1993) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction, *Mol and Cell Biol*, 13: 5794-5804.
- Winoto, A. and Littman, D. (2002) Nuclear Hormone Receptors in T lymphocytes, *Cell*, 109:S57-S66.
- Woronitz, J.D., Calnan, B., Ngo, V. y Winoto, A. (1994) Requirement for the orphan steroid receptor Nur 77 in apoptosis of T-cell hybridomas, *Nature*, 367: 277-281.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. y Lenardo, M. (2004) Regulation of an ATG7-beclin1 program of autophagic cell death by caspase-8, *Science*, 304:1500-1502.
- Yu, Z., Cheng, G., Huang, X., Li, K. y Cao, X. (1997) Neurokinin-1 receptor antagonist SR140333: a novel type of drug to treat cerebral ischemia. *Neuroreport*, 8:2117-2119.
- Zachrisson, O., Lindfors, N., y Brene, S. (1998) A tachykinin NK1 receptor antagonist, CP-122,721-1, attenuates kainic acid-induced seizure activity. *Mol Brain Res*, 60:291-295.