



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**miR-29c participa en la respuesta de la PKD al
estrés osmótico en fibroblastos 3T3**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
BRENDA BENIGNO LÓPEZ**

MÉXICO, D.F.

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: J. Eleazar Martínez Barajas
VOCAL: Profesor: María Eugenia Torres Márquez
SECRETARIO: Profesor: Sobeida Sánchez Nieto
1er. SUPLENTE: Profesor: Aurora Lara Nuñez
2do. SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
BAJO EL APOYO DEL DONATIVO IN222014 OTORGADO POR DGAPA.
PARTE DEL TRABAJO SE REALIZO EN LA UCLA.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ

SUSTENTANTE:

BRENDA BENIGNO LÓPEZ

ÍNDICE

RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN.	3
Planteamiento del problema.	3
ANTECEDENTES.	4
Transducción de señales.	4
La proteína cinasa D.	5
Inhibidores de la PKD.	9
MicroRNAs.	9
Biogénesis de miRNA. Vía Canónica.	10
MiR-29.	12
Procesos regulados por miR-29c.	14
Estrés osmótico.	15
PKD, miR-29c y el estrés osmótico.	17
Muerte celular programada (apoptosis).	18
Autofagia.	21
Hipótesis.	24
Objetivos.	24
MATERIALES Y METODOLOGÍA.	25
Cultivo celular.	25
Tratamientos.	25
Extracción de proteínas y Western blot.	27
Extracción de RNA.	29
Síntesis de cDNA.	30
qPCR.	31
Transfección con antago-miRNA.	32

RESULTADOS.....	34
Fosforilación de la S916 en la PKD en células GFP y células PKD bajo estrés salino.....	34
Expresión de miRs en células GFP y células PKD bajo estrés osmótico.....	36
Genes blanco de miR-29c participes de apoptosis y autofagia. . .	37
Bajo estrés hiperosmótico la regulación de la PKD ocurre sobre algunas proteínas blanco.....	38
Efecto del an-miR29c bajo estrés osmótico en procesos de apoptosis y autofagia.....	44
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	58
PERSPECTIVAS.....	59
REFERENCIAS.....	60

RESUMEN

La presente investigación pretende esclarecer algunos blancos enmarcados en procesos que se regulan por la proteína cinasa D (PKD) al inducir un estrés osmótico con cloruro de sodio (NaCl). Nuestro modelo de trabajo son fibroblastos 3T3 que sobre-expresan de manera “constitutiva” a la PKD (células PKD) o bien los controles que expresan el vector y contienen a la proteína verde fluorescente (células GFP). Se verificó la activación/fosforilación en la serina 916 de la PKD ($^{916}_p$ S-PKD) generada por NaCl 540 Osm. La PKD es una cinasa que mediante la fosforilación puede regular diferentes procesos celulares, ya que opera como un efector en la transducción de señales al modificar otras proteínas activándolas o en algunos casos desactivándolas. No obstante, la fosforilación exclusivamente, no ha explicado la regulación de estos procesos, por lo que es posible esperar otros efectos mediadores. Datos previos del laboratorio mostraron la modificación dependiente de PKD sobre la expresión de algunos microRNAs (miRs) ante el estímulo hiperosmótico. Uno de ellos, el miR-29c, participa en algunos de los eventos que son regulados por la PKD. Se buscaron posibles blancos, que se encuentran bajo regulación de la expresión, del miR-29c y se determinó su respuesta al estrés hiperosmótico en presencia y ausencia del inhibidor de PKD. Con el fin de establecer la correlación entre la activación/inhibición de la PKD y las respuestas de los blancos del miR29c. Se eligieron: 1) la caspasa 3, en particular al fragmento activo de la caspasa-3 (casp-3-F)

participe de la apoptosis, 2) la cadena ligera 1A/1B de la proteína asociada a microtúbulos (LC3A/B), participe de la autofagia y 3) la cadena reguladora 2 de la proteína fosfatasa-4 (PPP4R2) reguladora de procesos de fosforilación/desfosforilación.

Los resultados nos sugieren que el miR-29c participa como mediador de la PKD en su efecto “anti-apoptotico”, inducido por el estrés osmótico. No encontramos correlación entre las acciones de la PKD en la autofagia o la estimulación de la fosfatasa PPP4R2.

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

El estrés osmótico induce diferentes respuestas homeostáticas entre otros en cerebro, en intestinos con enfermedades inflamatorias crónicas y riñón (Pasantes-Morales et al, 2000; Burg et al, 2007; Schwartz et al, 2009) y para ello requiere mediadores de reestructuración de la homeostasis celular que aún se están determinando. Dada la participación de la PKD en la respuesta al estrés oxidativo, buscamos si esta cinasa es también estimulada y posiblemente participante en las respuestas al estrés hiperosmótico en fibroblastos 3T3.

La PKD mediante su actividad fosforilante, regula diferentes procesos celulares, sin embargo la fosforilación exclusivamente, no ha explicado la regulación de estos procesos, por lo que es posible esperar otros efectos mediadores. Cuando las células se enfrentan a cualquier estímulo extracelular se ponen en movimiento cascadas de respuestas fisiológicas, el comportamiento frente a estos estímulos y la pronta recuperación, requiere cambios precisos y rápidos en la expresión génica. Esto podría lograrse a través de la regulación post-transcripcional mediante los miRs (Vaisvaser et al, 2016). Los niveles de varios miRs son modificados en fibroblastos 3T3 al ser estimulados con estrés salino, uno de ellos es el miR-29c. Se pretende determinar si este efecto es mediado por la PKD y buscar posibles blancos que se encuentran bajo la regulación de la expresión del miR-29c.

ANTECEDENTES

Transducciones de Señales

Las células están en una continua adaptación a las condiciones cambiantes que las rodean; de manera tal, que son capaces de generar una modulación de la respuesta celular a estos estímulos extracelulares, secretando mensajeros. El receptor, se encarga de reconocer al mensajero para interactuar con él y activar la secuencia de eventos que conducen a la respuesta celular. Luego de que el receptor se activa, es necesario que se asocie con un sistema transductor, el cual se encarga de generar la señal intracelular o segundo mensajero. Estas últimas moléculas son las encargadas de propagar y amplificar la señal en el interior de la célula y conducir así a los efectos fisiológicos. Al proceso que se lleva a cabo desde el momento de la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero se le llama transducción (García-Sáinz, 1996).

Uno de los mecanismos fundamentales de la transducción de señales en las células animales es la activación de cascadas de fosforilación de proteínas. Estas cascadas de fosforilación, se inician cuando existe la interacción de los factores extracelulares con receptores de membrana plasmática que incluyen: a los receptores acoplados a proteínas G y a los receptores con actividad enzimática. Los primeros incluyen el sistema adenilil ciclasa, proteínas G y el sistema fosfoinosítidos-calcio. El segundo grupo de receptores es conformado por: a) los receptores fosforiladores, es decir que

tienen actividad de proteína cinasa; b) los receptores que tienen actividad de proteína fosfatasa, y c) los que tienen actividad de guanilil ciclasa (García-Sáinz, 1996).

La proteína cinasa D

Una de las proteínas que es activada por receptores acoplados a proteínas G y activada por estímulos extracelulares químicos y que se rige mediante fosforilación es la proteína cinasa D (PKD), una cinasa de serina/treonina. La familia de la PKD está compuesta por 3 isoformas; el primer miembro es la PKD1, que originalmente se denominó PKC μ (que es además la isoforma más estudiada), la segunda isoforma es la PKD2 y la tercera es la PKD3, que también se denominó originalmente como PKC ν . Las tres isoformas de la familia de PKD son homólogas y muestran un alto grado de similitud de secuencia, los dominios que no mantienen en común son los que les brindan funciones específicas a cada isoforma (Sinnott-Smith et al, 2004; Rozengurt et al, 2005).

Las PKDs están constituidas por una región reguladora NH₂-terminal, que contiene un dominio rico en cisteína (CRD), que son repeticiones en tándem de motivos ricos en cisteína similares a dedos de zinc, que le confieren una alta afinidad por ésteres de forbol y diacilglicerol (DAG). La región de homología a la pleckstrina (PH) que se encarga de la regulación de la actividad enzimática y a su vez se une a lípidos de membrana. También

contiene un dominio COOH-terminal, portador de la actividad catalítica (CD) (ver figura 1) (Matthews et al, 1999; Rozengurt et al, 2005; Sinnott-Smith et al, 2009).

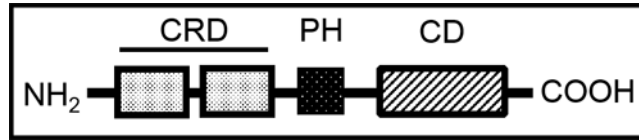
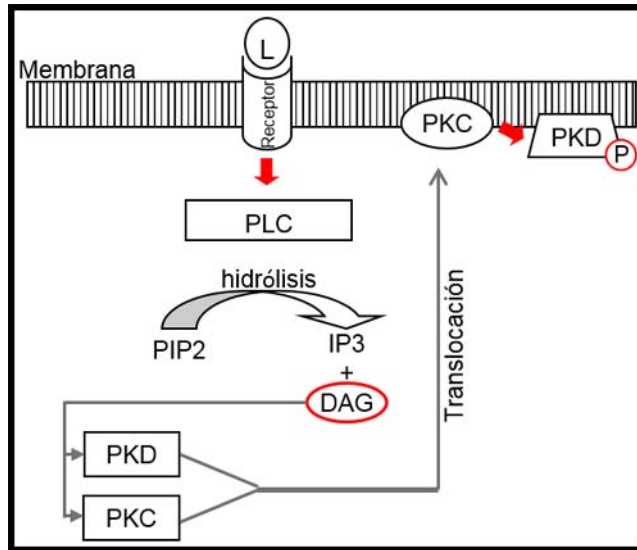


Figura 1. Esquema de la estructura general de las PKDs (Modificado de Rozengurt et al, 2005).

Existe una amplia gama de señales externas que promueven la estimulación y activación de las PKDs. En las células no estimuladas, PKD está en un estado de baja actividad catalítica mantenida por su auto-inhibición, mediada por el dominio NH₂-terminal (Rozengurt, 2011). En cuanto a su localización intracelular, la PKD permanece en el citosol y en menor proporción en otros compartimentos intracelulares como aparato de Golgi y mitocondrias (Rozengurt et al, 2005). La principal vía de activación es en la que participa la proteína cinasa C (PKC) y el segundo mensajero diacilglicerol (DAG). Esta vía inicia cuando un ligando extracelular interactúa con su receptor en la membrana plasmática activando así a la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP₂) en inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y DAG; este último genera la translocación de la PKD a la membrana plasmática donde también se translocan isoformas de PKC (Rozengurt et al, 2005). Al activarse las PKC fosforilan a la PKD en su dominio catalítico y de este modo PKD queda activada (Ver figura 2).



**Figura 2. Activación de las PKDs.
(Elaboración propia)**

Una vez que la PKD se encuentra en estado activo esta sufre “translocación reversa” esto es, que puede regresar al citosol o ser exportada al núcleo donde se acumula de manera transitoria.

La señalización a través de la PKD es inducida por un notable número de estímulos. La PKD tiene una amplia gama de funciones biológicas que se ven modificadas a través de cambios dinámicos en su localización espacio-temporal. La PKD genera una sorprendente diversidad de señales y tiene una amplia distribución, además de tener un gran potencial para regular interacciones complejas (Rozengurt, 2011).

La activación in vivo de PKD se lleva a cabo mediante la PKC dependiente de trans-fosforilación de dos sitios bucle de activación, es decir, serina 744

(Ser744) y serina 748 (Ser748) seguido de la auto-fosforilación en la serina 916 (Ser916) de PKD (Rybin et al, 2009; Sinnett-Smith et al, 2009); mientras que la activación in vitro se da por el anclaje de DAG o esteres de forbol en el CRD en presencia de fosfatidilserina. Recientemente se demostró la fosforilación de la Ser916, producto de una auto-fosforilación in vivo y no de un evento de trans-fosforilación por una cinasa río arriba (Matthews et al, 1999; Waldron et al, 2001; Sinnett-Smith et al, 2009).

Es de importancia mencionar que en fibroblastos, PKD1 se puede activar por diversos agonistas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), promotores del crecimiento que actúan a través de Gq. La sobre-expresión de PKD1 aumenta la síntesis de DNA y la proliferación celular inducida por agonistas de receptores acoplados a Gq en fibroblastos Swiss 3T3. Por el contrario, la remoción de PKD1 a través de siRNA frente a la proteína cinasa D disminuye la mitogénesis que se induce por GPCR, por tanto la activación de PKD media la señalización mitogénica (Sinnett-Smith et al, 2009; Torres-Marquez et al, 2010; Rozengurt, 2011).

La PKD al operar como un transductor de señales controla muchos procesos biológicos entre los que se incluyen: proliferación celular, diferenciación celular, supervivencia celular, transducción de señales, regulación inmune, expresión génica, tráfico de vesículas, el desarrollo neuronal, tráfico de membrana, secreción, hipertrofia cardiaca, angiogénesis y cáncer (Kunkel et al, 2007; Rybin et al, 2009; Sinnett-Smith et al, 2009; Rozengurt, 2011).

Inhibidores de la PKD. La forma más común de buscar la participación de proteínas cinasa es a través de inhibidores. No obstante, dado que la mayoría de ellos está dirigida al sitio circunvecino al de unión del ATP, se ha encontrado promiscuidad para la inhibición de las cinasas (Bain et al, 2007); lo que complica el determinar que una acción es específicamente atribuida a una cinasa. Por ejemplo, el inhibidor Go6976 que se ha utilizado para inhibir a la PKD (Gschwendt et al, 1996), es también inhibidor de la PKC (Martini-Baron et al, 1993), cinasa que incluso se encuentra cascada abajo de la señalización de PKD. Se han ideado inhibidores de la PKD, con alta especificidad *in vitro*, entre ellos: CID755673 (Sharlow et al, 2008), y el CRT0066101 (Harikumar et al, 2010). No obstante, al utilizar algunos de ellos, *in vivo* llegan a mostrar otras actividades ajenas a su acción sobre la PKD (Torres-Márquez et al, 2010; Mansky et al, 2013). Algunos de estos efectos podrían ser dependientes de la célula en la cual se usan (Mansky et al, 2013; Venardos et al, 2015). El CRT, tiene una mayor potencia *in vitro* e *in vivo* (Harikumar et al, 2010; Ni et al, 2013) y logra generar uno de los efectos esperados al menos a las concentraciones utilizadas en este trabajo (Torres-Márquez et al, datos no mostrados).

MicroRNAs

El genoma codifica para cientos de microRNAs (miRs) que afectan en conjunto la expresión de alrededor de un tercio de todos los genes. Los

miRs son estructuras cortas de RNA endógeno no codificantes, presentando alrededor de 22 nucleótidos (Pabón-Martínez, 2011); participan en la regulación espacio-temporal del RNAm y la síntesis de proteínas. Son reguladores de la expresión génica a través de la inhibición de la traducción (implicados en un silenciamiento post-transcripcional) y mediante la inducción de la degradación de los RNAm. Además se ha encontrado que la expresión aberrante de miRs lleva a anomalías y enfermedades del desarrollo, como la diferenciación, la proliferación y la respuesta al estrés (Lodish, et al, 2008; Lugo-Trampe y Trujillo-Murillo, 2009; Pabón-Martínez, 2011).

Biogénesis de miRNA. Vía Canónica. La transcripción inicia en el núcleo, siendo regulada por la RNA polimerasa II, en donde los miRs son transcritos a partir de RNA largos llamados miRs primarios (pri-miRNA), los cuales presentan forma de horquilla.

La maduración de los pri-miRNA's inicia cuando el complejo microprocesador conformado por DROSHA y su activación con DGCR8, corta el tallo de la horquilla en la estructura del RNA; tal corte forma una horquilla más pequeña que es liberada. La horquilla generada recibe el nombre de precursor de miRs (pre-miRNA). La exportina 5 es la encargada de exportar al pre-miRNA del núcleo al citoplasma (Lodish et al, 2008; Lugo-Trampe y Trujillo-Martínez, 2009; Pabón-Martínez, 2011).

En el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos por el complejo de procesamiento formado por Dicer, la TRBP (proteína de unión a RNA en

respuesta a trans-activación) y la PRKRA (proteína quinasa activadora dependiente de RNAs inducible por interferón). Posteriormente Dicer corta los pre-miRNAs cerca del bucle terminal, procesando un dúplex de miR maduro, el cual contiene una cadena madura de miR y su cadena complementaria. Luego este complejo se une a la proteína Argonata 2 (AGO2) formando el complejo silenciador inducido por miRs (miRISC); este complejo actúa sobre la cadena madura de RNAm quien se encargara de dirigir el silenciamiento (Ver figura 3) (Lodish et al, 2008; Lugo-Trampe y Trujillo-Martínez, 2009; Pabón-Martínez, 2011).

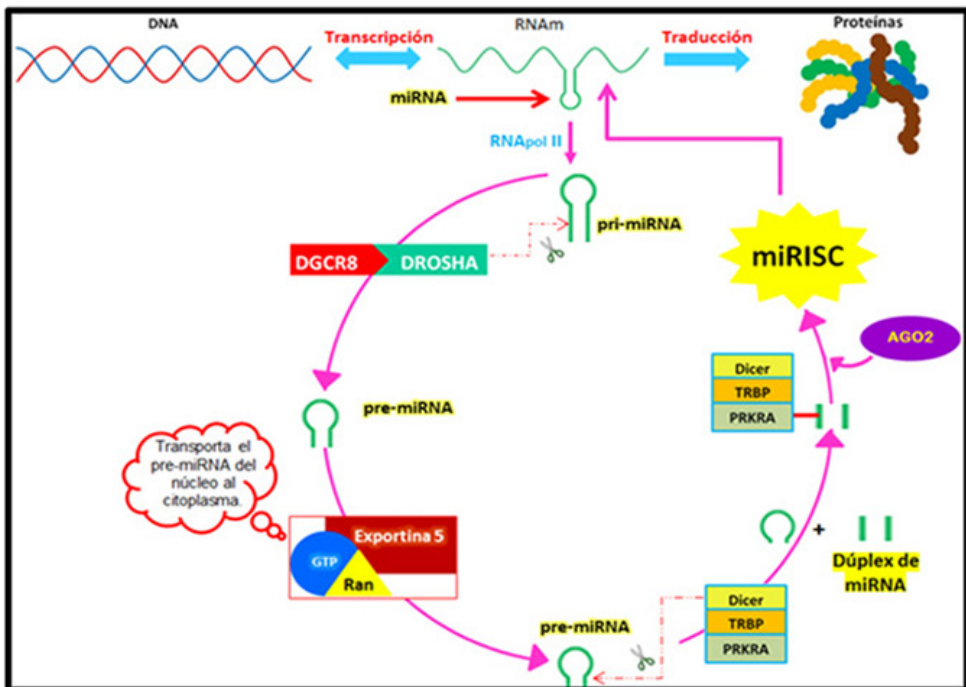


Figura 3. Vía canónica de la síntesis de miRNAs. (Elaborado por Cruz Hurtado Marco Antonio y Benigno López Brenda).

Dependiendo de la complementariedad de la cadena del miR a su blanco, el complejo miRISC puede inhibir la expresión de los RNAm blancos por dos mecanismos: (1) remoción de la poliadenilación del extremo 3' del RNAm, fomentando la actividad de las deadenilasas, seguidas por la degradación del RNAm; y (2) bloqueando el paso de la iniciación o elongación de la traducción, inhibiendo el factor eucariótico de la elongación o causando un estancamiento del ribosoma (Lodish et al, 2008; Lugo-Trampe y Trujillo-Martínez, 2009; Pabón-Martínez, 2011).

MiR-29. La familia miR-29 en humanos incluye: hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, que a su vez se conforma por hsa-miR-29b-1 y hsa-miR-29b-2, y a hsa-miR-29c. Los hsa-miR-29b-1 y hsa-miR-29b-2 tienen secuencias maduras idénticas pero diferente localización en el genoma (Kriegel et al, 2012; Fiserova et al, 2015).

El gen que codifica para los precursores de miR-29b-1 y miR-29a se encuentra en el cromosoma 7q32.3 en humanos, mientras que el gen que codifica el miR-29b-2 y miR-29c está en el cromosoma 1q32.2. La transcripción se da de forma alternativa, esto es miR-29b-1 y miR-29a se transcriben juntos como una transcripción primaria policistrónica. De igual forma, miR-29b-2 y miR-29c se transcriben juntos. Ambos transcritos primarios se transcriben desde la cadena [-], con miR-29b-1 y miR-29b-2 siendo río arriba de miR-29a y miR-29c, respectivamente (Kriegel et al,

2012; Fiserova et al, 2015).

Los miR-29 maduros comparten secuencias idénticas en las posiciones de los nucleótidos 2-7, la región “semilla” que juega un papel clave en la determinación de los genes blanco de los miR-29 (Kriegel et al, 2012).

La familia miR-29 regula varias vías de señalización que están implicadas en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Fisiológicamente, participa en la regulación del ciclo celular y la proliferación, la senescencia, la diferenciación, la apoptosis, la metástasis, la metilación del DNA y la regulación inmune, así como la regulación de la matriz extracelular (Fiserova et al, 2015).

La importancia de miR-29 en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis se ilustra mejor con el papel de miR-29 en el cáncer. Aparentemente los miembros de la familia miR-29 sirven como supresores de tumores en varios casos, aunque podrían ser oncogénica en algunos otros (Kriegel et al, 2012).

Los familiares de miR-29 se dirigen al menos a 16 genes relacionados con la matriz extracelular. Estos genes codifican para varias de las proteínas clave implicadas en la formación fisiológica o patológica de la matriz extracelular. La regulación de la matriz extracelular por miR-29 se ha implicado en el desarrollo de la fibrosis en muchos órganos incluyendo el corazón, riñón, pulmón y el hígado, así como en otras enfermedades por ejemplo, la esclerosis sistémica (Kriegel et al, 2012).

Procesos regulados por miR-29c. Las investigaciones sobre el miR-29c se han centrado principalmente en los tumores. En conjunto, se ha hecho evidente una característica común, la regulación a la baja de miR-29c genera tumorigénesis, y la presencia de miR-29c inhibe el crecimiento de células tumorales (Chen et al, 2016).

Entre las evidencias, podemos encontrar al gen *ITGB1* y la proteína Akt2, que se han estudiado en el cáncer gástrico y se ven implicadas en la regulación principalmente de la invasividad y migración celular. Estas moléculas siguen la vía de señalización PI3K-Akt. Cuando esta vía es activada anormalmente, se conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica de células dañadas, que se relaciona con el desarrollo de cáncer (Fresno et al, 2004). Entonces la acción del miR-29c es inhibir la invasión y la migración del gen *ITGB1* (Han et al, 2015) y los genes que codifican para la proteína Akt2 (Zhang et al, 2014), al interactuar directamente con su región 3'UTR, lo que bloquea su transcripción y de esta forma inhibe la progresión del cáncer gástrico.

También se ha descrito que los miembros de la familia miR-29 y principalmente miRNA-29c reconocen el gen *CCND2* como blanco para inhibir la proliferación y la invasividad celular impidiendo así que las células cancerígenas continúen con el ciclo celular (Gong et al, 2014). En cáncer hepatocelular, la expresión aberrante del gen *SIRT1*, conduce a la inhibición del ciclo celular de las células normales y la apoptosis de células

del cáncer. Cuando se añade miR-29c a células hepatocarcinogénicas con sobreexpresión de *SIRT1*, inhibe la función del gen (Bae et al, 2014), al reprimir su expresión, esto lleva a que las células normales continúen un ciclo celular adecuado y que las células transformadas sean destruidas.

Por otra parte, también se ha reconocido un papel regulador de miR-29c sobre la expresión de BACE1 quien causa la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer. Cuando se expresa miR-29c puede regular de manera endógena la expresión de la proteína BACE1, y por tanto representar un papel importante en la enfermedad de Alzheimer (Lei et al, 2015).

Estrés osmótico

El estrés osmótico conduce a un flujo de salida o entrada de agua desde o hacia la célula provocando: su contracción por estrés hiperosmótico, o su hinchazón por estrés hipoosmótico. Las respuestas celulares a este tipo de estrés se relaciona con la actividad de los canales de agua, transportadores de electrolitos y la acumulación de osmolitos, así como de la activación de proteínas y la función de las estructuras subcelulares (Mager et al, 2000). Algunas estructuras afectadas por el estrés hiperosmótico incluyen los canales de iones y agua, proteínas de choque térmico, proteínas estructurales celulares y extracelulares, factores de transcripción y coactivadores, cinasas, fosfatasas, otras proteínas de señalización, enzimas, hormonas, receptores, proteínas relacionadas con el crecimiento, segundos mensajeros y osmolitos

orgánicos (Burg et al, 2007). Cuando existe un desequilibrio osmótico entre el fluido extra e intracelular, y por lo tanto de la presión osmótica, se genera el estrés osmótico (Brocker et al, 2012).

El equilibrio de la concentración de solutos orgánicos e inorgánicos que están en el interior de la célula se debe a que en el exterior las células están bañadas por un líquido con abundantes solutos, como el Na^+ y el Cl^- . Mantener a estos solutos en equilibrio depende principalmente de la bomba Na^+-K^+ . Cuando la acción de la bomba se interrumpe, por ejemplo cuando se queda sin la cantidad suficiente de ATP (necesaria para alimentar la bomba), los iones de Na^+ y Cl^- ingresan en la célula mediante proteínas transportadoras y canales iónicos abiertos. De esta forma provocan un desequilibrio osmótico (Alberts et al, 2004).

Las células han desarrollado una respuesta adaptativa para contender con los mecanismos generados por el estrés hiperosmótico y mantener el equilibrio osmótico, incluyendo la inducción de genes involucrados en la síntesis de transporte de osmolitos, que no solo contrarrestan la pérdida de agua de la célula, sino que también, sirven como chaperonas químicas, preservando la estructura y función de proteínas en condiciones no óptimas (Brocker et al, 2012).

Las células de la médula renal son el principal ejemplo de las células que experimentan estrés osmótico (Burg et al, 2007). Los niveles elevados de NaCl se asocian a la función que ejercen las células renales en la absorción

o excreción de líquidos y solutos que definen la concentración de la orina (Burg et al, 2007; López et al, 2009). Otro ejemplo de estrés hiperosmótico, es el generado por manitol, que se emplea en la reperfusión del corazón después de daño isquémico (Galvez et al, 2003).

El estrés hiperosmótico es un proceso que contribuye a un número potencial de enfermedades y por lo tanto, existen defectos en las funciones fisiológicas normales de las células; pues afecta la estructura y función de proteínas, y en consecuencia altera la actividad enzimática. La capacidad de respuesta al estrés hiperosmótico varía de acuerdo al tipo celular y al tejido, lo que sugiere que, aunque puede haber un mecanismo de respuesta general, la activación de vías y el resultado final difiere de célula a célula (Brockner et al, 2012). Por ejemplo, en el estrés osmótico generado por Na⁺, se ha observado que la regulación es mediada por hormonas y mitógenos y han sido identificadas algunas cinasas como reguladoras, Erk-1 y Erk-2 (Mager et al, 2000; Morales-Mulia et al, 2001).

PKD, miR-29c y el estrés osmótico

Cuando las células se enfrentan a cualquier estímulo extracelular una cascada de respuestas fisiológicas se ponen en movimiento, el comportamiento frente a estos estímulos y la pronta recuperación, requiere cambios precisos y rápidos en la expresión génica. Esto podría lograrse a través de la regulación post-transcripcional mediante los miRs (Vaisvaser et al, 2016).

Nuestra finalidad es comprender que una vez que el estrés activa a la PKD, que funciones fisiológicas estaría regulando corriente abajo, que pudieran ser mediadas por un miR, adicionalmente a la fosforilación. Esta conexión le daría una ventaja regulatoria a la PKD, y a nosotros nos permitiría establecer la relación que hay entre la activación de la PKD y los procesos fisiológicos que no han podido dilucidarse por la mediación exclusiva de la fosforilación. Se ha visto que los inhibidores de la PKD son una buena herramienta para esclarecer las funciones en las que participa la cinasa. Además se ha estudiado que la PKD activa la señalización de algunos genes pro-supervivencia (Fu y Rubin, 2011).

Muerte celular programada (apoptosis)

En los organismos multicelulares las células forman parte de una comunidad altamente organizada y regulada. El número de células en esta comunidad se mantiene en equilibrio gracias a un control en la división y la muerte celular. Si ya no se necesitan células, éstas se suicidan activando un programa de muerte intracelular. A éste proceso se le conoce como muerte celular programada, comúnmente llamado apoptosis. En la apoptosis la célula se encoge y se condensa sin dañar a sus vecinos. El citoesqueleto se destruye, la membrana nuclear se descompone y el DNA nuclear se rompe en fragmentos. Lo más importante, la superficie celular se altera, por lo que es fagocitada rápidamente y muere antes de que ocurra cualquier fuga de

su contenido (Alberts et al, 2004).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis depende de una familia de proteasas, que tienen una cisteína en su sitio activo y escinden sus proteínas blanco en el ácido aspártico; estas proteínas se denominan caspasas. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos conocidos como procaspasas, que se activan por escisión en ácido aspártico por otras caspasas. Una vez activada, la caspasa escinde y activa otra procaspasa, amplificando así una cascada proteolítica. La cascada de proteasas es destructiva, auto-amplificada e irreversible (Sánchez-Migallón et al, 2016).

La apoptosis se desencadena ya sea por la activación del receptor de muerte (vía extrínseca) o por la liberación mitocondrial de citocromo C (vía intrínseca). La vía extrínseca se inicia por la estimulación de un receptor de superficie celular. Los receptores activados de muerte, tales como Fas, son proteínas adaptadoras que activan a la caspasa 8 por escisión proteolítica. La Caspasa 8 activa, a su vez, a las caspasas ejecutoras río abajo (caspasas 3 y 7). En la vía intrínseca, mejor estudiada, las mitocondrias al ser estimuladas por las proteínas extra-largas del linfoma de células B (Bcl-2) y las proteínas inhibidores de la apoptosis (IAP) liberaran al citocromo C en el citosol, que se une y activa a la proteína adaptadora, Apaf-1. Todas estas proteínas conforman el complejo denominado apoptosoma. Este complejo, entonces, se une y activa a la caspasa 9. La caspasa 9 activa, se une al apoptosoma y activa a las caspasas efectoras 3 y/o 7. La vía mitocondrial de activación de

procaspasas es utilizada en la mayoría de las células para iniciar o acelerar la apoptosis (Alberts et al, 2004; Sánchez-Migallón et al, 2016).

De este modo, tanto la vía extrínseca como la intrínseca, convergen en la caspasa 3 y por esto será nuestra actividad monitora de la apoptosis (Sánchez-Migallón et al, 2016).

Existen evidencias de la participación de PKD tanto como pro-apoptótica como anti-apoptótica. Ejemplo de actividad anti-apoptótica se tiene en tres modelos, el primero es un modelo de carcinoma de piel, el incremento en la expresión de PKD lleva a la proliferación celular (Rennecke et al, 1999). El segundo es el páncreas, donde la sobre-expresión de PKD aumenta el crecimiento celular y regula a la alta proteínas anti-apoptóticas (Trauzold et al, 2003). El tercer modelo es en fibroblastos de ratón la PKD aumenta la expresión de genes de las proteínas anti-apoptóticas cIAP-2 (Johannes et al, 1998).

La actividad pro-apoptótica se ha visto en células de leucemia humana, donde la PKD es fragmentada por las caspasas inducidas por TNF y agentes quimioterapéuticos. Este proceso sensibiliza a las células a la apoptosis (Endo et al, 2000).

En una línea de epitelio alveolar se tuvieron efectos bimodales. Utilizando asbestos como estímulo, estimularon a la PKD y esta cascada abajo, estimuló a las MAPK o a las JNK. Encontraron que a bajas dosis de asbestos se tiene un efecto proliferativo o anti-apoptótico, en compensación al insulto. Este

efecto llevó cascada abajo a la estimulación de las MAPK. Mientras que concentraciones mayores de asbestos indujeron apoptosis y estas acciones estimularon a la JNK (Budder-Hoffman et al, 2009).

Autofagia

La autofagia es el mecanismo catabólico que desensambla reguladamente, componentes celulares no funcionales (Kobayashi, 2015) y contribuye a la regulación de la homeostasis celular. Esto lo hace mediante la degradación de proteínas y el reciclaje de los componentes celulares (Tanida et al, 2008). Es también un mecanismo importante de protección, que permite a las células sobrevivir en respuesta a múltiples factores estresantes, además de que ayuda a proteger a los organismos contra enfermedades: degenerativas, inflamatorias, infecciosas y neoplásicas (Kroemer et al, 2010).

Durante la autofagia, las células forman vesículas de doble membrana, autofagosomas, que fagocitan orgánulos, proteínas o porciones del citoplasma (Kroemer et al, 2010). Al mismo tiempo, una forma citosólica de LC3 (LC3-I) se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar LC3-fosfatidiletanolamina conjugado (LC3-II), que es reclutado por los autofagosomas en las membranas. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas para formar autolisosomas, y los componentes intra-autofagosómicos son degradados por hidrolasas lisosomales (Tanida et al, 2008; Kroemer et al, 2010).

La autofagia es un proceso que participa en el desarrollo y dada su

importancia en este modelo, es donde más se ha estudiado. De estos sistemas hemos aprendido, que para que se lleve a cabo la adecuada proporción del órgano o el cuerpo se tiene que balancear de manera muy precisa, el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (Baehrecke, 2005). Asimismo, cada uno de estos procesos tendrá que estar sujeto a una regulación estricta.

El proceso es regulado por la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) de clase I y clase III. Se ha demostrado que muchos de los componentes de la vía PI3K de clase I están involucrados en la regulación negativa de la autofagia en las células animales. La activación de PI3K de clase I conduce a la fosforilación del fosfatidil inositol (PI) de la membrana plasmática que recluta y activa a la Akt/proteína cinasa B (PKB), un regulador negativo río abajo de la autofagia. La forma activa de Akt/PKB reprime a los reguladores positivos de la autofagia. Estos reguladores positivos son las proteínas del complejo 1 y 2 de la esclerosis tuberosa (TSC1/2). TSC1/2 reprimen a la proteína G monomérica Rheb, quien ahora regula a la proteína blanco de la rapamicina (Tor). Finalmente Tor inhibe la autofagia (Baehrecke, 2005).

De manera contraria, la activación de la fosfatasa supresora de tumores y homólogo de tensina (PTEN) evita la acumulación de PI3 y por tanto la activación de Akt/PKB. Es decir PTEN regula positivamente la autofagia (Baehrecke, 2005).

Es importante ahora considerar que la vía PI3/Akt es regulada por PKD de manera compleja. La regulación positiva se da cuando la Akt se transloca a la membrana plasmática en respuesta al PI3. La PKD1 fosforila la Thr308, que activa a la AKT Otra activación de la Akt/PKB que se realiza en la membrana es la que produce la mTOR sobre la Ser473.

La regulación negativa de la AKT/PKB por la PKD se da por un mecanismo de retroalimentación negativa. Se ha reportado que la eliminación de la PKD por siRNA, sostiene la fosforilación prolongada en la Ser473 en la AktPKB generada por mTOR. Este efecto de retroalimentación negativa tiene particular impacto en la vía a largo plazo (Ni et al, 2013).

De las acciones por la fosforilación de PKD sobre Akt/PKB, no tendríamos elementos para predecir si las acciones de la PKD sobre la autofagia serían de estimulación o inhibición.

Hipótesis

- La PKD puede activarse por el estrés osmótico generado por 540 osm de cloruro de sodio en fibroblastos 3T3.
- Los cambios en el miR-29c en respuesta al estrés osmótico correlacionaran con la estimulación de la PKD.
- La PKD ejercerá sus efectos en la apoptosis y autofagia a través del miR-29c.

Objetivos

- Determinar la activación de la PKD y la regulación de la expresión del miR29c, ante el estrés hiperosmótico de fibroblastos 3T3.
- Establecer la correlación (o carencia de) entre la respuesta a blancos del miR29c (fragmento de caspasa-3,LC3A/B) al estrés osmótico y la activación de PKD.
- Establecer si hay una acción conjunta y/o causal entre la regulación del miR29 y la activación de la PKD en respuesta al estrés osmótico.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Cultivo celular

El cultivo de células Swiss 3T3 transfectadas con la proteína verde fluorescente (GFP) que expresan niveles normales de la PKD, (células GFP, usadas como células control) y transfectadas que sobre-expresan PKD (células PKD, células experimentales), se mantuvieron a 37°C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % en una atmósfera humidificada que contiene 10 % de CO₂/O₂. La composición del medio se muestra en la tabla 1.

Para fines experimentales, las células se sembraron en cajas Petri de 100 mm con 6×10⁵ células o en cajas Petri de 35 mm con 1×10⁵ células y se cultivaron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % durante 7 a 9 días hasta su confluencia (Zhukova et al, 2001; Sinnett-Smith et al, 2004).

Tratamientos

A células creciendo en suero fetal bovino al 10 %, se les eliminó el medio y se pusieron en medio DMEM sin suero. Se prepararon las células con 1.5 mL del medio DMEM sin suero y se incubaron por 1 h a 37°C y con CO₂/O₂.

Para el tratamiento de sodio, se disolvió NaCl 300 mM (600 Osm) en DMEM, para dar una concentración final de 540 mM de NaCl (840 Osm). Se añadió de este medio a cada una de las cajas con nuestras células (ver tabla 2), y se incubaron 20 min a 37°C.

MEM modificado por Dulbecco

SALES	mg/L	Aminoácidos esenciales	mg/L
NaCl	6500	L-Arginina	105
KCL	400	L-Cisteína	324
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2000	L-Histidina	294
NaH ₂ PO ₄ · 4H ₂ O	140	Isoleucina	52
NaHCO ₃	200	L-Lisina	58
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200	L-Fenilalanina	32
		L-Treonina	48
		L-Triptófano	10
		L-Valina	46
		L-Metionina	15
		L-Leucina	52.4
		Vitaminas	mg/L
		Cloruro de Colina	1.0
		Acido Fólico	2.0
		Mio-inositol	1.0
		Nicotinamida	1.0
		D-Pantotenato de Calcio	1.0
		Fosfato de Piridoxal	1.0
		Riboflavina	0.1
		Tiamina	1.0
		Acido ascórbico	17.5
		Biotina	0.02
		Hipoxantina	25.0
		Cianocobalamina	0.2
Aminoácidos no esenciales	mg/L		
L-Glutamina	294		
L-Alanina	890		
L-Aspártico	1330		
L-Asparagina	1500		
L-Glutámico	1470		
L-Prolina	1150		
L-Serina	1050		
L-Glicina	750		
Otros	mg/L		
D-Glucosa	4500		
Rojo fenol sódico	15.9		
Piruvato de sodio	110		
Nitrato Ferrico · 9H ₂ O	0.1		
Hepes	780		

Tabla 1. Composición del medio DMEM (~300 Osm). (Tomado de Torres-Márquez, 1983).

Preparación del tratamiento de inhibidor con sodio. Se preparó una solución con el inhibidor CRT 0066101 (TOCRIS Bioscience, #4975), al que se le adicionó medio DMEM sin suero, para obtener una concentración de 2.5 μ M. De esta preparación se añadió a las cajas como se indica, (ver tabla 2) consecutivamente se incubaron a 37°C por 1 h. Posteriormente, se agregó NaCl, 540 Osm y se incubó durante 20 min a 37°C.

Tratamiento	Células GFP			Células PKD		
	Control	NaCl	CRT	Control	NaCl	CRT
NaCl [540 Osm]	-	+	+	-	+	+
CRT [2.5 μ M]	-	-	+	-	-	+

Tabla 2. Control de tratamientos para células GFP y PKD.

Extracción de proteínas y Western blot

Las células GFP y PKD se cultivaron de acuerdo a lo descrito en la sección de cultivo celular, hasta obtener una confluencia del 100 %. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales, según se describe a continuación. Concluido el tiempo de estimulación de las células, a las cajas con tratamiento y controles se les eliminó el medio y se añadió 120 μ L del amortiguador del Laemmli 2X (Tris-Cl 0.12 M (pH 6.8), Glicerol 1.63 M, SDS 0.21M, Mercaptoetanol 0.51M, EDTA 0.002 M (pH 8.0), azul de bromofenol 0.75 μ M) se colectó la muestra en microtubos y se congelaron hasta su uso. Las muestras se hirvieron por 5 min a 95°C y se separaron las proteínas mediante electroforesis.

Los geles utilizados fueron desnaturalizantes de poliacrilamida (Criterion™ Tris-HCl Precast Gels, #3450032) con gradiente de 4 al 20 % aquí abreviado como PAGE-SDS. Se depositaron 40 µL (aprox 600 mg prot) de las muestras en los pocillos, concluida la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno), aplicando un campo eléctrico de 100 V, con un amperaje menor a los 0.4 A por 2 h y media, en una cámara húmeda. El amortiguador de transferencia contenía glicina 200 mM, Tris 25 mM, SDS al 0.01 %, y metanol al 20 %. Para la detección de proteínas, las membranas se bloquearon usando leche descremada sin grasa al 5 % (Bio-Rad, #1706404) en un amortiguador de fosfato salino pH 7.2 (PBS-leche al 5 % con 0.001 % azida de sodio) por 2 h a 37°C.

Las proteínas de la membrana se reconocieron incubando en agitación toda la noche a 4°C, en PBS (conteniendo azida de sodio 0.001 %) con los siguientes anticuerpos primarios en dilución 1:1000 (según se indique en las figuras): policlonal anti-916pS-PKD (Cell Signaling, #2051), monoclonal anti-casp-3-F (Cell Signaling, #9664S), monoclonal anti-LC3A/B (Cell Signaling #12741S), monoclonal anti-GAPDH (14C10) (Cell Signaling, #2118) y policlonal anti-PPP4R2 (Novus, #NB100-2877) en dilución 1:2000. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween al 0.05 %, 3 veces por 10 min y después incubadas a temperatura ambiente durante 1 h con el anticuerpo secundario diluido 1:1000 en PBS-leche al 3

% (sin azida). Los anticuerpos secundarios son conjugados con peroxidasa y generados en burro y son: el anti-conejo (Amersham ECL donkey anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody #NA934-1ML), o el anti-ratón (Amersham ECL donkey anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody #NA931-1).

Para revelar las proteínas en los inmunoblots (o Western) las membranas se incubaron con una mezcla de luminol (Healthcare LS, Amersham ECL # RPN2236) y se revelaron en un analizador de imagen luminiscente FUJIFILM LAS-3000 Imager. Se utilizó el programa Multi Gauge (FUJIFILM), para determinar la densidad de las bandas y realizar una comparación semicuantitativa con el control de carga, que corresponde a la GAPDH. De manera que para cada proteína se dividió el valor de su densidad en relación al de su contraparte obtenido para la GAPDH.

Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total, primero se retiró el medio de crecimiento de la placa de cultivo. Luego se añadieron 0.5 mL del reactivo TRIzol (TRIzol® Reagent (Invitrogen #15596-026) directamente a las células en las cajas de cultivo. Después de la homogeneización, se centrifuga la muestra a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

La muestra homogeneizada se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoprotéico. De ahí se añadió 0.1 mL de cloroformo. Se selló el tubo de forma segura para agitarlo vigorosamente a mano durante 15 seg. Posteriormente se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó la muestra a $12,000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Finalmente se retiró la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo a 45° y pipeteando la solución cuidadosamente para evitar tomar restos de la fase orgánica.

Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo y se continuó con el procedimiento de aislamiento de RNA. Para precipitar el RNA se añadieron a la fase acuosa 0.25 mL de isopropanol al 100 % a 4°C . A continuación se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Posteriormente se eliminó el sobrenadante del tubo, dejando sólo el botón de precipitado de RNA. Se lavó el sedimento, con 0.5 mL de etanol al 75 %. Esto es, la muestra se agitó en Vortex brevemente, y luego se centrifugó el tubo a $7,500 \times g$ durante 5 min a 4°C . Finalmente el tubo se mantuvo en campana de extracción al vacío hasta que se secó la muestra. El RNA se resuspendió en agua libre de RNasas y se almacenó a -70°C .

Síntesis de cDNA

Se realizó utilizando el Kit miScript II RT (Sabisciences-QIAGEN), bajo las

condiciones indicadas en la tabla 3 (miScript PCR System Handbook).

Reactivos	Volumen (μL)
5x miScript Buffer HiSpec	4
10x miScript mezcla de Nucleicos	2
RNA _t purificado	250 ng/ μL
miScript mezcla de Transcriptasa Reversa	2
H ₂ O libre de RNasas	c.b.p 20 μL

Tabla 3. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.

Los reactivos fueron descongelados a temperatura ambiente, una vez descongelados se homogeneizaron manualmente y se mantuvieron en hielo durante la preparación de cada reacción; al concluir estas, fueron colocadas en el termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems). Se programó a 37°C por 60 min para la amplificación del cDNA y 5 min a 95°C para desactivar la enzima. Al concluir la RT-PCR, el cDNA obtenido para cada muestra se diluyó en 50 μL de H₂O libre de nucleasas. Esta metodología se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. MA Velázquez del Centro Médico Siglo XXI-IMSS.

qPCR

Se llevó a cabo usando el Kit miScript SYBR® Green PCR (Sabiosciences-QIAGEN), bajo las condiciones indicadas en la tabla 4. Los reactivos se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron manualmente, se mantuvieron en hielo durante la preparación de cada reacción, al

concluir estas se procesan en el termociclador, el cual se programó bajo las condiciones descritas en la tabla 5. Esta metodología se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. MA Velázquez del Centro Médico Siglo XXI-IMSS.

Reactivos	Volumen (µL)
SYBR® Green PCR	12.5
Primer Universal	2.5
Primer de Ensayo (miRNA-29c)	2.5
H ₂ O libre de RNasas	c. b. p. 25 µL
Templado de cDNA	Variable (~150 ng/µL)

Tabla 4. Mezcla de reacción para qPCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo
Activación de la enzima	95°C	15 min
Desnaturalización	94°C	15 seg
Alineación de Primers	55°C	30 seg
Elongación	70°C	30 seg
Número de ciclos	40	

Tabla 5. Condiciones de reacción para qPCR.

Para la cuantificación relativa de los datos obtenidos en la qPCR se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), analizando así, el cambio relativo de la expresión del miRNA-29c. Nota: Cada reacción se realizó por duplicado.

Transfección con antago-miRNA

La transfección de células 3T3 con el antago-miR-29c (an-miR29c) se realizó

utilizando HiPerFect Transfection Reagent, como se indica a continuación.

Poco antes de la transfección, se sembraron de 7 a 8 x 10⁴ células en cajas de 35 mm de diámetro en DMEM 10 % FBS (suero fetal bovino). La transfección se realizó después de incubar las células a 37°C y 10 % de CO₂. Para ello se diluyó el an-miR29c en medio de cultivo sin suero para obtener una concentración final de 10 nM*. Se añadió reactivo de transfección HiPerFect al inhibidor de miR diluido y se mezcló mediante agitación. Esta mezcla se incubó durante 5 a 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de transfección. Se añadieron los complejos gota a gota sobre las células girando suavemente las placas para asegurar una distribución uniforme de los complejos de transfección. A continuación se incubaron las células con los complejos de transfección a 37°C, por 48 h.

* 20µM del an-miR es equivalente a aproximadamente 0.25µg/µL. El peso molecular de 21 nt del an-miR es aproximadamente 13-15µg/nmol.

RESULTADOS

Fosforilación de la S916 en la PKD en células control -GFP- y PKD bajo estrés hiperosmótico

Se realizó análisis por Western blot el estudio de la activación de la PKD, a través de determinar su nivel de la fosforilación en el residuo serina-916, $^{916}_p$ S-PKD. Las células control (células GFP), mostraron un aumento importante en la fosforilación de la PKD (10 veces vs control) cuando fueron tratadas con NaCl (540 Osm), mientras que el inhibidor de la PKD, CRT, es capaz de revertir el 80 % de tal efecto. Para las células que sobre-expresan PKD (células PKD), se obtienen tendencias semejantes, sin embargo existe una diferencia en cuanto al nivel de fosforilación, ya que las céls PKD muestran una activación mucho mayor a la de las céls GFP (30 veces más) cuando están bajo estrés salino. Se observa también que el inhibidor revierte el efecto aproximadamente un 80 % (Fig. 4-A, B).

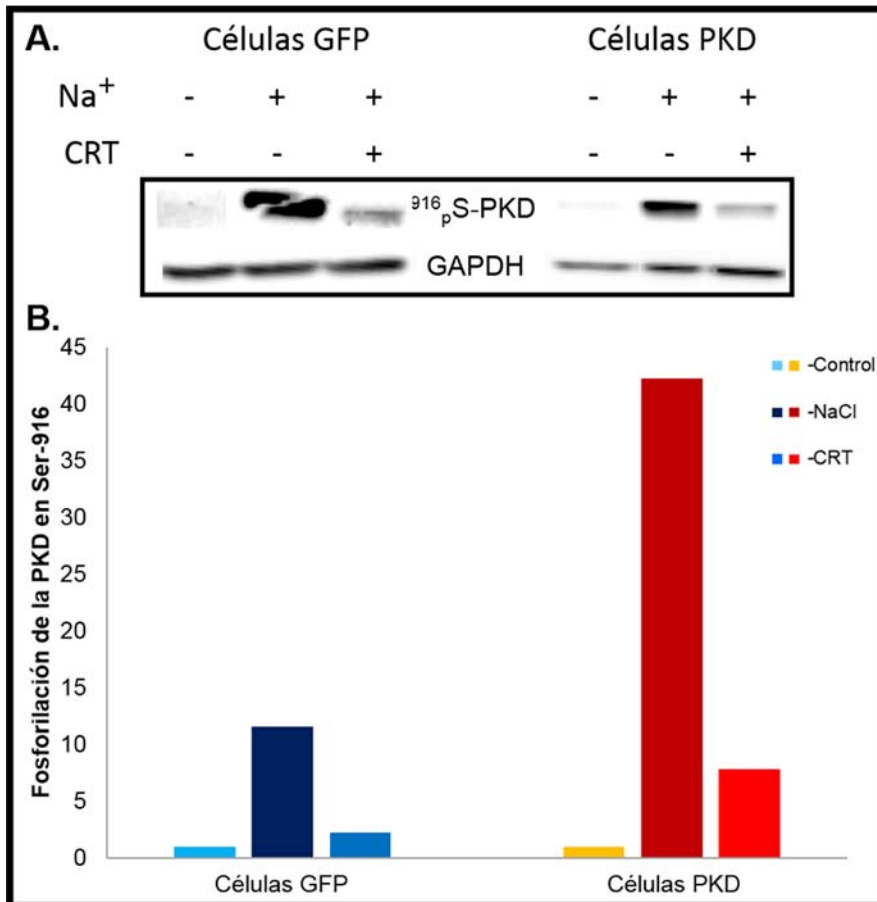


Figura 4. Efecto del NaCl sobre la fosforilación de la S-916 en la PKD, tanto en células GFP como en células PKD.

Las células GFP o PKD se crecieron a confluencia en medio DMEM con suero al 10 %. Posteriormente se lavaron e incubaron en medio DMEM sin suero por 1h, con o sin CRT y a continuación se estimularon por 20 min con NaCl, 540 osm. **A.** Activación de PKD ($^{916}_p$ S-PKD) y determinación de GAPDH (control de carga) en células GFP o PKD. **B.** Análisis densitométrico/normalización de la activación de PKD en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de $^{916}_p$ S-PKD y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad, de ahí se obtuvieron las veces fosforilación donde se indica.

Expresión de miRs en células GFP y células PKD bajo estrés osmótico

Mediante un análisis en microchip, realizado previamente en el laboratorio se evaluó la expresión de diferente miRs en respuesta al estrés salino. En la figura 5 se observó que las células GFP tienen un comportamiento variado. Mientras que el mmu-miR-669h-3p_st y el mmu-miR-29c-star_st mantienen un nivel similar de expresión (1.4 vs 1.2 y 2.5 vs 2.3 respectivamente) en las células normales y las sometidas a estrés osmótico, en los otros miRs mostrados en la tabla, el tratamiento con sodio inhibe la expresión en al menos una unidad. Por otra parte, para las células PKD observamos que los miRs, mmu-miR-669h-3p_st y mmu-miR-27a-star_st disminuyen su expresión por debajo de 50 % en condiciones hiperosmóticas comparados con el control. Para los mmu-miR-3096b-3p_st y mmu-miR-29c-star_st los niveles de expresión son exactamente el 50 % menores en las células tratadas en medio hiperosmótico, en comparación con su control. El resto de los miRs analizados en el chip (más de 200), si bien se expresan a diferentes niveles en las células control (GFP) y PKD, no ven modificada su expresión en las condiciones de estrés salino a las que se sometieron las células.

De aquí se eligió al miR-29c debido a que presenta una variación del 50 % en las células PKD cuando se tratan con NaCl, Osm 540. Mientras que la variación es muy baja en las céls GFP que son las contrapartes control. Por lo que creemos que este comportamiento del miR-29c nos permitirá un

mejor análisis. Además el miR-29c presenta varios blancos que participan en los procesos que se ven regulados por la PKD.

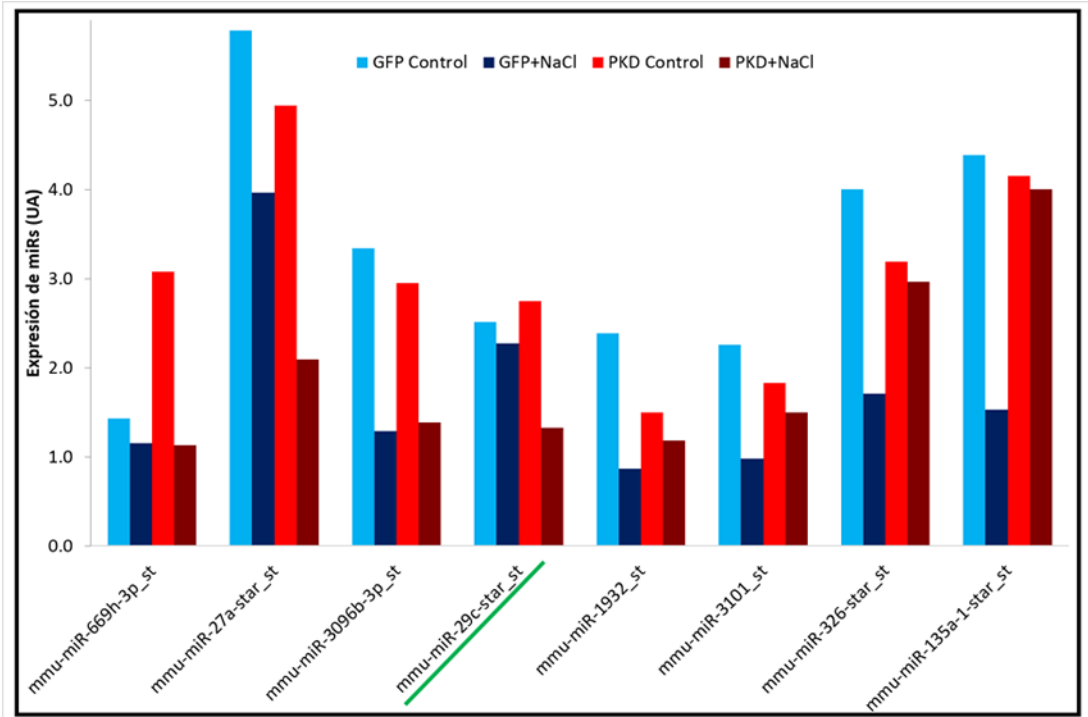


Figura 5. Resultados parciales de la evaluación de la expresión de miRs en células GFP y PKD bajo condiciones de estrés osmótico. (Tomado de Resultados de Torres-Márquez et al, en preparación).

Se aisló el RNA de las células como se describió en métodos y se determinaron los niveles de los miR en un micro-arreglo de Qiagen (datos proporcionados por Torres-Márquez et al, comunicación personal).

Genes blanco de miR-29c partícipes en la apoptosis y autofagia

Se buscaron diferentes blancos del miR-29c en las bases de datos Targetscan y GeneCards (ver tabla 5). Se seleccionaron algunos genes blancos

involucrados en apoptosis y autofagia, por ser procesos de importancia y común regulación entre los miRs previamente evaluados. De acuerdo a la información obtenida en estas bases de datos, el miR-29c tiene más blancos de apoptosis que de autofagia.

Apoptosis	Autofagia
<i>Aen</i> (Apoptosis Enhancing Nuclease)	<i>Vps33a</i> (Vacuolar Protein Sorting 33 Homolog A (S. Cerevisiae))
<i>Bcl2l13</i> (BCL2-Like 13 [Apoptosis Facilitator])	<i>Stx6</i> (Syntaxin 6)
<i>Pdcd1lg2</i> (Programmed Cell Death 1 Ligand 2)	<i>Ubr7</i> (Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 7 (Putative))
<i>Bmf</i> (Bcl2 Modifying Factor)	<i>Ube3b</i> (Ubiquitin Protein Ligase E3B)
<i>Triap1</i> (TP53 Regulated Inhibitor Of Apoptosis 1)	<i>Ubr3</i> (Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 3)

Tabla 6. Genes blanco de los procesos regulados por miR-29c.

Se presentan algunos genes blanco del miR-29c que regulan apoptosis y autofagia, obtenidos de las bases de datos TargetScan y GeneCards.

Bajo estrés hiperosmótico la regulación de la PKD ocurre sobre algunas proteínas blanco

Para comprender cómo es que la PKD activada luego de un estrés osmótico, puede regular funciones fisiológicas río abajo, distintas a la fosforilación, se exploró si el miR-29c sería un intermediario en los procesos de apoptosis y autofagia.

La caspasa-3 fragmentada (Casp-3-F), se genera cuando se activa la apoptosis y es uno de los marcadores más comunes de que este proceso se está llevando a cabo. Además, la apoptosis es un proceso en el que

participan varios blancos regulados por el miR-29c, por lo que la casp-3-F fue utilizada para monitorear uno de los efectos de la variación en el miR-29c. En las células GFP notamos que la activación de la PKD por estrés hiperosmótico aumenta la expresión de casp-3-F en 2.3 veces más que en el control, mientras que el tratamiento con CRT disminuye el efecto de la activación en la expresión al 55 %. Por el contrario, para las céls PKD, observamos que el estrés inducido por el NaCl, 540 Osm genera que la PKD inhiba la expresión de la Casp-3-F a un 38 %, efecto que pareciera ser mediado por la PKD ya que el inhibidor de la PKD eleva la actividad de este blanco a un nivel ligeramente superior, 26 % mayor al basal (Fig. 6-A, B).

En el caso de la autofagia, que es otro proceso donde participa la PKD, y el miR-29c también tiene genes blanco; se estudió a la cadena ligera 1A/1B de la proteína-3 asociada a microtúbulos (LC3A/B) como marcador de la autofagia.

Los resultados muestran que las células tratadas con NaCl, tanto para las células GFP como PKD, disminuyen los niveles de la LC3A/B en un 46 % y 66 % respectivamente. Sorprendentemente el CRT ejerce un efecto aún más pronunciado sobre la expresión de la LC3A/B. Esto es, la inhibición de la expresión llega al 63 % en las células GFP, mientras que para las células PKD la inhibición de la expresión llega al 79 %, respecto a su control (Fig. 7-A, B).

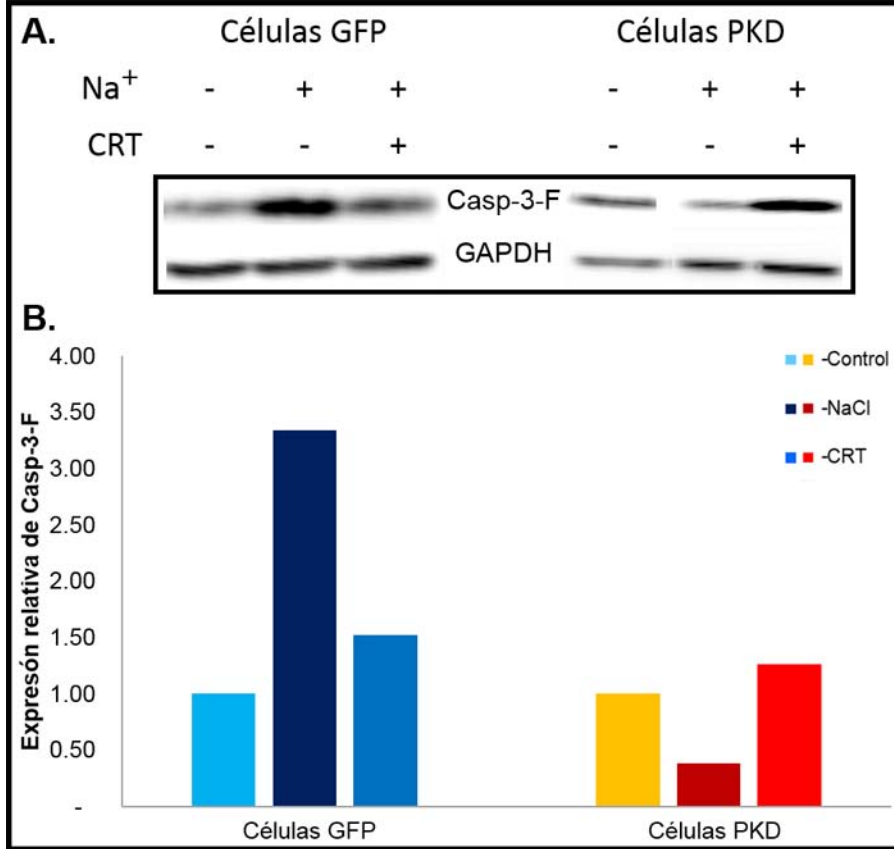


Figura 6. Efecto del NaCl sobre la generación de caspasa-3-fraccionada. Las células GFP o PKD se trataron como se indica en la fig. 4. **A.** Expresión de Casp-3-F y de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de Casp-3-F en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de Casp-3-F y se obtuvo el cociente con el valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

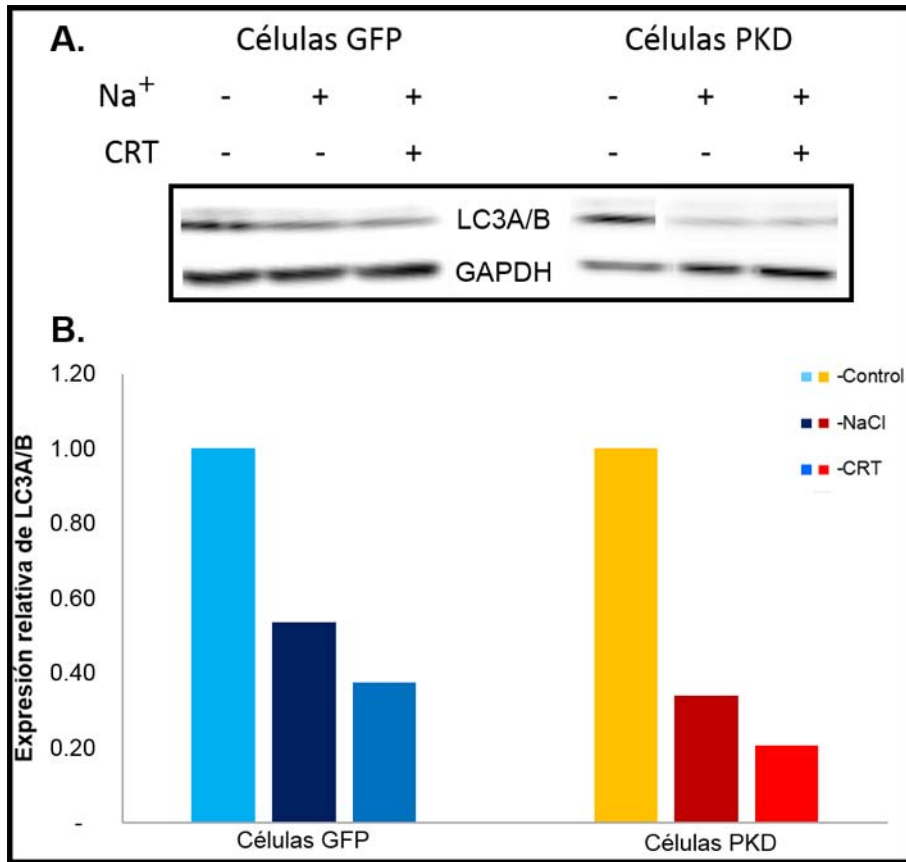


Figura 7. Efecto del NaCl sobre la PKD y su acción sobre la proteína LC3A/B.

Las células GFP o PKD se trataron como se indica en la fig. 4. **A.** Expresión de LC3A/B y de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de LC3A/B en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de LC3A/B y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

Los procesos de fosforilación tienden a ser regulados por retro-alimentación negativa (Kholodenko et al, 1997). De manera interesante al menos 5 de los miRs modificados por estrés salino, incluyendo al miR-29c, tienen como blanco a la cadena reguladora 2 de la proteína fosfatasa 4 (PPP4R2). Por lo cual también se midió su variación por efectos del estrés hiperosmótico y de manera indirecta su mediación por PKD (efecto del CRT). En este caso vemos que para ambas células el estrés hiperosmótico genera un aumento de la expresión de la PPP4R2. Para las células GFP el aumento inducido por el estrés hiperosmótico, que se ve sostenido por la inhibición con el CRT es relativamente pequeño (11 % vs 20 %). Para las células PKD el aumento que se observa es del 53 % por el estrés hiperosmótico y de manera semejante a las células GFP el inhibidor genera un incremento mayor (76 %) en la expresión de PPP4R2 (Fig. 8-A, B).

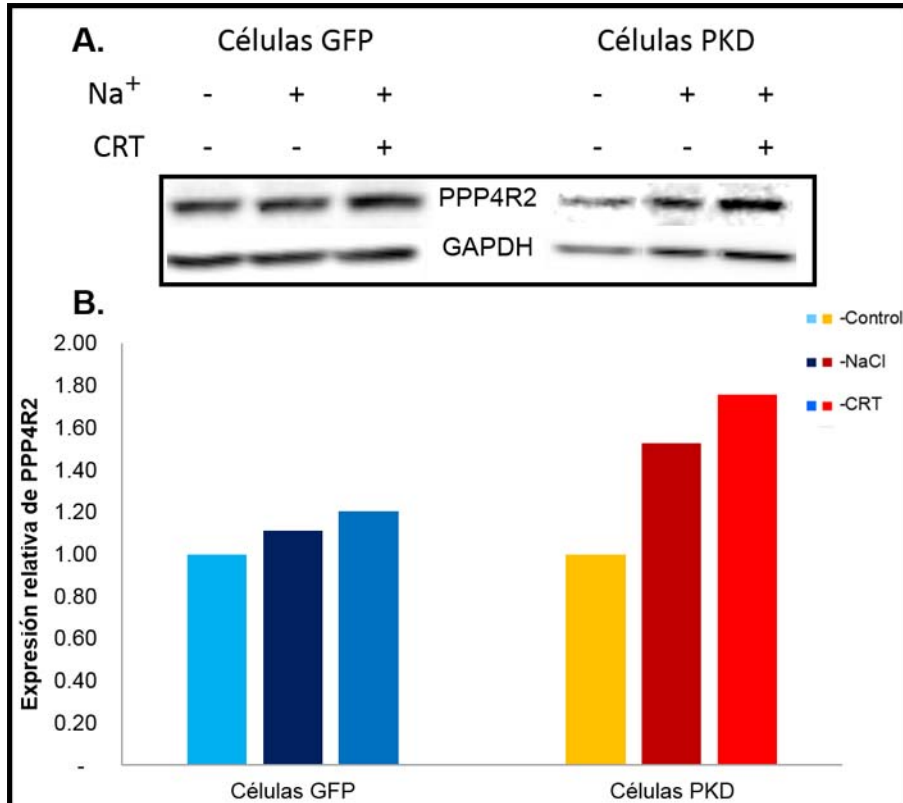


Figura 8. Efecto del NaCl sobre la PKD y su acción sobre la proteína PPP4R2.

Las células GFP o PKD se trataron como se indica en la fig. 4. **A.** Expresión de PPP4R2 y de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de PPP4R2 en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de PPP4R2 y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

Efecto del an-miR-29c bajo estrés osmótico en procesos de apoptosis y autofagia

Para confirmar la acción del miR-29c durante el estrés hiperosmótico y la participación de la PKD a través de éste, se bloqueó la expresión del miR por 48 h con el antago-miR-29c, como se describió en métodos. Posteriormente se sometió a las células al choque hiperosmótico en ausencia o en presencia del inhibidor de PKD. Se obtuvieron así los siguientes resultados (Fig. 9-A, B). El fragmento de la caspasa-3 no se ve modificado con el estrés hiperosmótico y la inhibición de la PKD muestra que esta disminuye aproximadamente 40 % en relación al basal. Mientras que en las células PKD, que tienen menos miR-29c se da un aumento del 73 % en la casp-3-F, y este efecto si lo disminuye el CRT, ligeramente por debajo del basal (89 %).

Si comparamos los efectos del estrés hiperosmótico de las células que se les permitió variar el miR con las que lo tienen limitado, podemos ver que hay una clara participación del miR-29c en el estrés hiperosmótico regulando los niveles de la casp-3-F y que la PKD a niveles basales (células GFP) disminuye la acción de este miR. De tal manera que cuando se limita la acción de los miR-29c, los niveles de la casp-3-F no se modifican ante el estrés salino. En las células que sobre-expresan a la PKD observamos que la limitación en la expresión del miR-29c parece eliminar el “efecto protector de la apoptosis” de la PKD, que se tiene ante el estrés hiperosmótico.

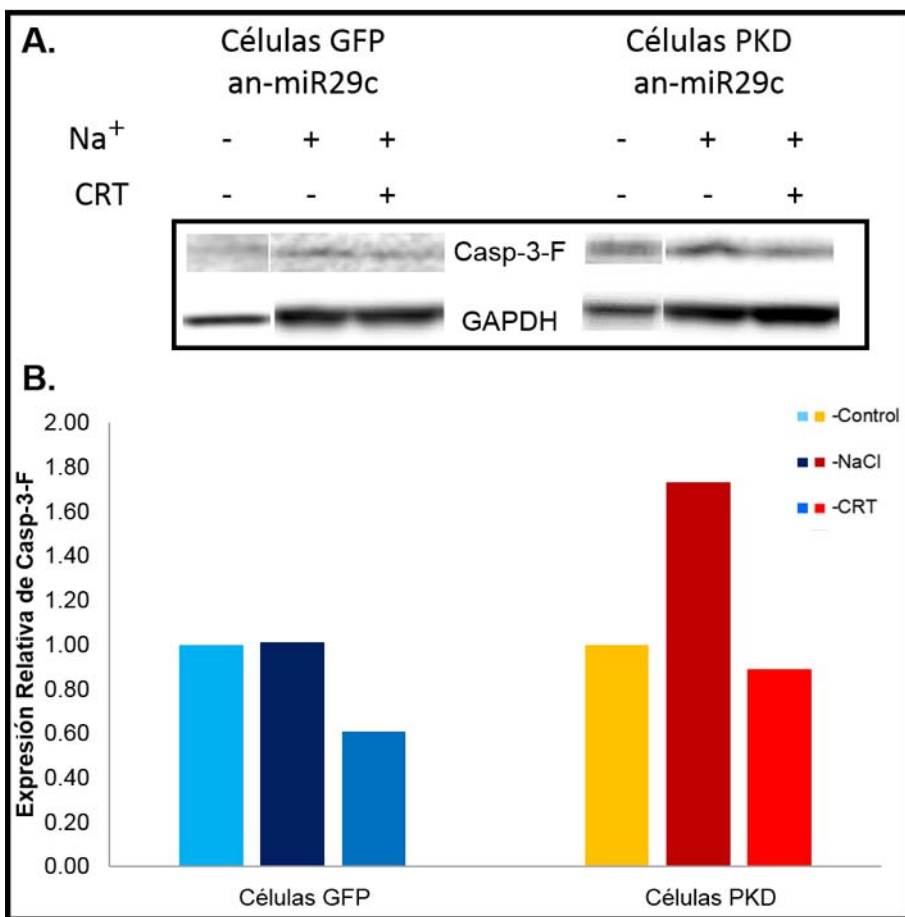


Figura 9. Efecto del NaCl sobre la generación de la caspasa-3-fractionada en células con an-miR29c.

Las células se trataron con el antago-miR-29c por 48 h. Posteriormente se lavaron e incubaron en medio DMEM sin suero por 1 h, con o sin CRT y finalmente se estimularon por 20 min con NaCl, 540 osm. **A.** Expresión de Casp-3-F y de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de Casp-3-F en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de Cas-3-F y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

En el análisis de la LC3A/B (Fig. 10-A, B) observamos que la expresión de la proteína en células estimuladas con estrés hiperosmótico disminuye en un 40 % y en contraparte existe un aumento respecto al basal del 12 % de expresión de LC3A/B cuando las células son tratadas con CRT. En las células PKD notamos que al bloquear al miR-29c la expresión de LC3A/B es inhibida en un 62 % bajo estrés hiperosmótico y con el inhibidor de PKD, la expresión de la proteína LC3A/B se inhibe en un 53 %.

Al comparar los cambios entre las células que mantienen niveles normales del miR-29c contra las que no (ver figuras 7 y 10), notamos que la expresión de LC3A/B, al inhibir al miR, tanto en las células GFP como PKD, muestran un ligero aumento en condiciones hiperosmóticas. Indicando así, que el miR-29c podría estar participando en la inhibición de la autofagia. No obstante las variaciones provocadas en la expresión de LC3A/B cuando se inhibe a la PKD muestran, que esta cinasa no se ve implicada en el proceso de autofagia y que otros procesos podrían estar regulando la expresión de LC3A/B.

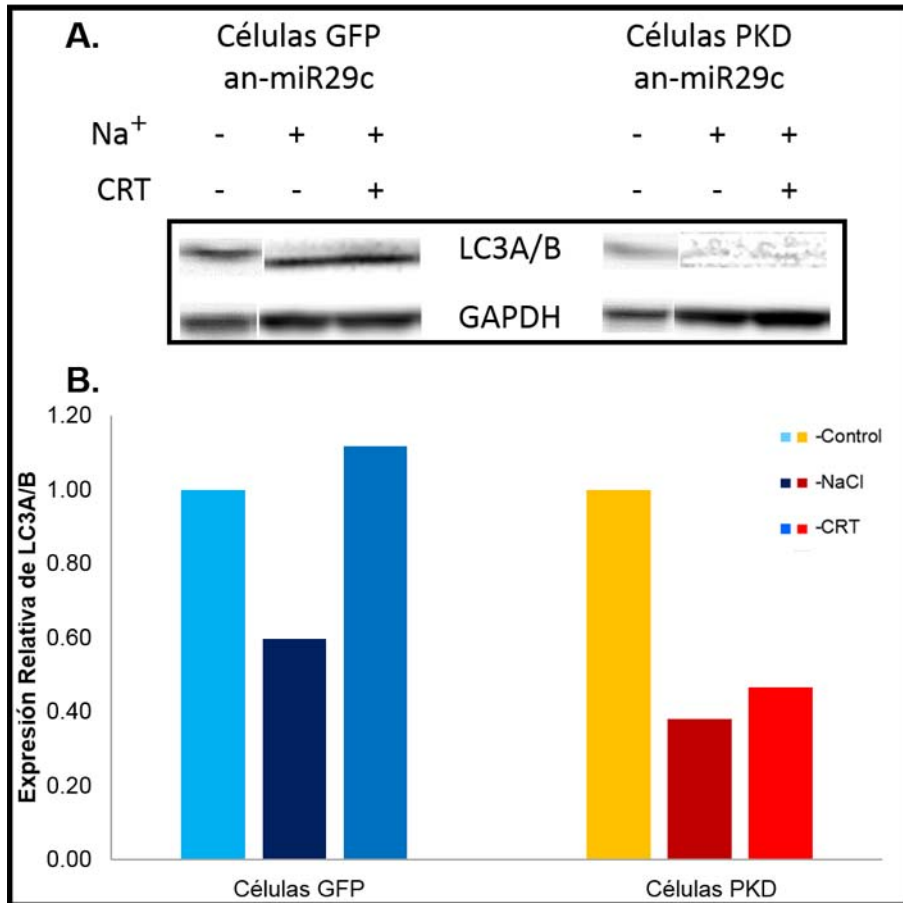


Figura 10. Efecto del NaCl sobre la expresión de la LC3A/B en células con an-miR29c.

Las células GFP o PKD se trataron como se indica en la figura 9. **A.** Expresión de LC3A/B y determinación de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de LC3A/B en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de LC3A/B y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

Para la fosfatasa PPP4R2 se muestra que en las células GFP tratadas con NaCl la expresión de la proteína PPP4R2 disminuye su expresión (19 % en comparación con el control) y que el tratamiento con CRT, la inhibe aún más (14 % contra el control). En cuanto a las células PKD vemos de igual forma, que ambos tratamientos disminuyeron la expresión de la fosfatasa a un 27 % y 14 % respectivamente. (Fig. 11-A, B).

Por otra parte observamos que la inhibición del miR-29c, inhibe la expresión de la PPP4R2 tanto en células GFP como PKD cuando están bajo estrés hiperosmótico. Esto indica que, el miR-29c es un regulador de la fosfatasa. Por otra parte vemos que al bloquear la participación de la PKD aumenta la expresión de la PPP4R2 cuando existen niveles normales del miR-29c. Mientras que cuando se bloquea al miR-29c también se reduce la expresión de la PPP4R2. Ésto nos indica que la PKD no está participando en la expresión de la fosfatasa y que pueden existir otros mecanismos involucrados.

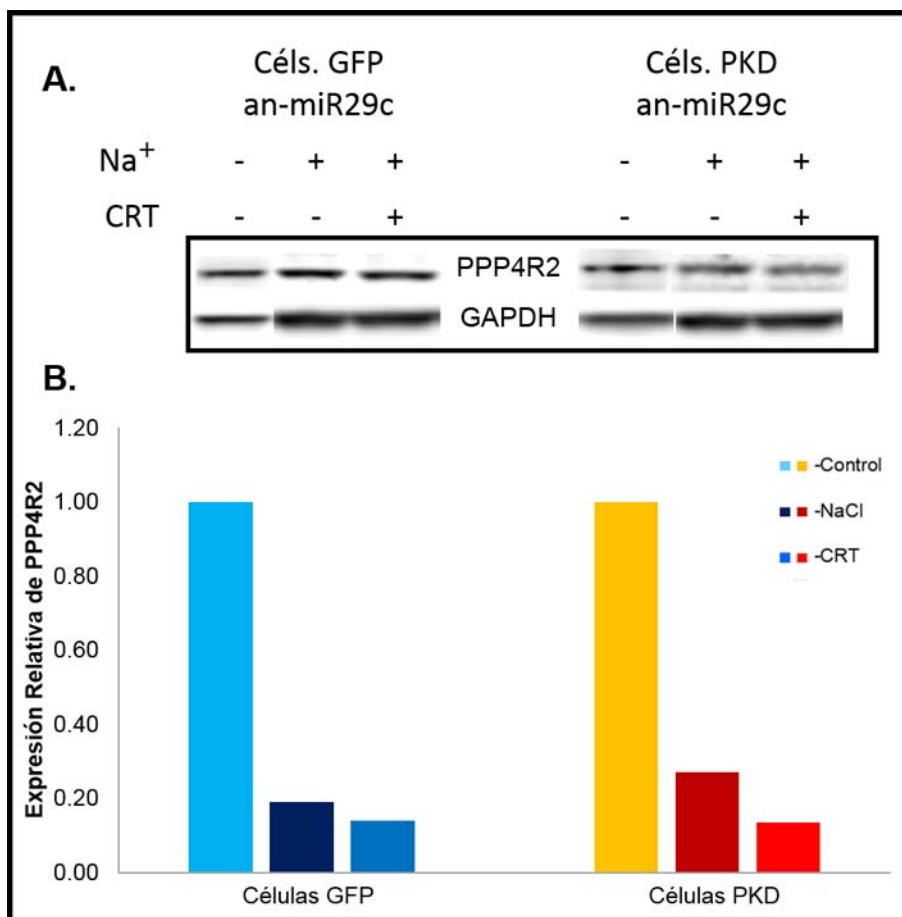


Figura 11. Efecto del NaCl sobre la expresión de la PPP4R2 en células con an-miR29c.

Las células GFP o PKD se trataron como se indica en la figura 9. **A.** Expresión de PPP4R2 y determinación de GAPDH (control de carga) en células GFP o células PKD. **B.** Normalización de la activación de PPP4R2 en células GFP y PKD respectivamente. Se cuantificó la densidad de las bandas de PPP4R2 y se obtuvo el cociente del valor correspondiente para la GAPDH. El valor obtenido de las células sin tratamiento se tomó como unidad o 100 % y de ahí se obtuvieron las veces o el % de expresión según se indica.

DISCUSIÓN

Los cambios generados por el estrés hiperosmótico dañan la estructura y la función de proteínas, a pesar de ello la célula busca mecanismos por los cuales preservar tanto estructura como función de las proteínas en condiciones no óptimas (Brocker et al, 2012). La PKD se ha asociado a la supervivencia celular (Kunkel et al, 2007; Rybin et al, 2009; Rozengurt, 2011; Sinnott-Smith et al, 2009), por tanto, investigamos si esta cinasa es capaz de regularse bajo condiciones de estrés hiperosmótico.

Como primera aproximación estudiamos la eficiencia de la PKD para activarse por estrés hiperosmótico mediante la auto-fosforilación del residuo serina 916. Demostramos que tanto las células GFP como PKD se activan bajo estrés hiperosmótico y que tal activación es mucho mayor en las células que sobre-expresan a la PKD. Se comprobó que la activación de la PKD, es por auto-fosforilación pues el inhibidor de la cinasa (CRT), bloquea la activación por estrés hiperosmótico de PKD en un 80 %. Trabajos previos de Döppler y Storz (2007) mostraron la activación de la PKD por estrés oxidativo. Con nuestros datos extendemos las observaciones de la activación de PKD a un tipo más de estrés, el hiperosmótico. Dado que, no se han encontrado blancos específicos de la fosforilación que participen en la recuperación celular, nos planteamos estudiar otros mecanismos de regulación de la función celular de acción relativamente corta, como son los miRs.

Se estudió el comportamiento que presentan los miRs bajo un estrés hiperosmótico. Dentro de los miRs que sufrieron modificaciones por la acción de la PKD se eligió al miR-29c. Destacamos que la respuesta del miR-29c presentó una variación más significativa en las células PKD (disminuyendo la expresión del miR en un 50 %), en comparación con los cambios que se generaron en las células GFP en condiciones de estrés hiperosmótico. La expresión de miR-29c es inhibida cuando se somete a las células al tratamiento con NaCl, 540 Osm.

El estrés genera cambios en la homeostasis celular, estos cambios pueden conducir a la muerte celular, como la apoptosis; sin embargo las células activan diversos procesos que ayudan a mantener estable a la célula y contrarrestar su muerte, mediante la supervivencia, como la autofagia (aunque en algunos casos este proceso puede activarse como muerte celular).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis, depende de una familia de proteasas que se denominan caspasas, cuando las células son dañadas o estresadas se activa la cascada proteolítica. La señalización de la vía es regulada por la caspasa-3, quien cascada arriba es activada por el complejo de la caspasa-9 y el factor de la apoptosis (Apaf-1). La activación implica su segmentación en dos fragmentos de 12 y 17 kDa (caspasa-3 fraccionada) que formarán la estructura activa de esta caspasa (Bruce et al, 2002; Sanchez-Migallón et al, 2016). De tal manera, que el seguimiento

de estos fragmentos a través de sus anticuerpos se ha utilizado como una herramienta para monitorear la apoptosis (Nicholson et al, 2002).

El comportamiento de las células control (células GFP en figura 6), nos indica que los niveles “normales” de la PKD activada no son suficientes para contrarrestar la apoptosis inducida por el efecto hiperosmótico. Mientras que la activación de la PKD sobre-expresada (células PKD en figura 6) logra revertir la expresión de la Casp-3-F bajo estrés hiperosmótico, indicativo de un menor grado apoptótico. Adicionalmente en presencia del inhibidor de la PKD los efectos adjudicados a la PKD son revertidos en un 88 %. Por lo tanto sugerimos que la PKD es una proteína que participa en la regulación negativa de la apoptosis.

Tratando de explorar los mecanismos por los cuales la PKD pudiera participar en la regulación de la apoptosis se pueden considerar dos procesos: que ocurra fosforilación en elementos de la vía o que los niveles de expresión de elementos regulatorios de la vía estén modificados. Dado que a la fecha no hay blancos de la fosforilación por PKD conectados a la vía apoptótica, exploramos la posibilidad de que los miRs regulatorios de la expresión de proteínas de la vía, den cuenta de los cambios inducidos por el estrés osmótico.

Encontramos que el miR-29c tiene como blancos a los genes pro-apoptóticos, *Aen*: regulador de la apoptosis inducida por *p53* tras el daño del DNA, amplificando las señales de daño y por tanto, da lugar al aumento de la

apoptosis, *Bcl2l13*: promotor de la activación de la caspasa-3 y por ende de la apoptosis, el gen *Pdcd1lg2* que bloquea la progresión del ciclo celular y la producción de citosinas en células T y *Bmf* gen que participa en la activación de la apoptosis. Finalmente se consideró al gen *Triap1* modulador de la ruta mitocondrial de apoptosis, que al inhibir a la caspasa-9 impide la inducción de la apoptosis mediando así la supervivencia celular (tabla 5) (genecards.org, 2016). Esto nos indica, que el miR-29c puede participar en la apoptosis, como mediador pro o anti-apoptótico. Por lo que suprimimos al miR-29c con la hipótesis de que este podría ser uno de los mediadores de las acciones que la PKD tiene sobre la apoptosis.

Observamos que la inhibición del miR-29c, refleja una disminución de la expresión de la casp-3-F en células control bajo estrés hiperosmótico (células GFP en figura 9) en comparación con la expresión de la proteína cuando se conservaba el miR-29c (células GFP en figura 6). Esto sugiere que en condiciones de estrés hiperosmótico, el miR-29c funciona en las células control como pro-apoptótico. Al inhibir a la cinasa se puede apreciar el mismo efecto pro-apoptótico del miR-29c.

En las células PKD podemos notar que la activación de la cinasa por el estrés hiperosmótico correlaciona con la inhibición al 50 %, tanto de la expresión de la caspasa 3 como de la presencia de miR-29c (figuras 5 y 6). Esta correlación nos permite hipotetizar que el efecto anti-apoptótico de la PKD activada podría ser mediado por la disminución de los niveles de miR-

29c. Este efecto de la PKD parece requerir de altos niveles de activación pues el estrés hiperosmótico en las células GFP, genera una fosforilación 35 veces menor que el observado en las células PKD (por la sobre-expresión de la PKD) lo que correlaciona también con una disminución discreta (~10 %) del miR. Cuando se inhibe en 80 % a la PKD, en las células PKD, el efecto pro-apoptótico del miR aún se manifiesta en la expresión de la casp-3-F (30 % vs control) (células PKD en figura 6), lo que sugiere que el efecto del miR prevalece y que la activación remanente de la PKD no es suficiente para contrarrestar los efectos del miR, de manera semejante a lo descrito para las células GFP.

Cuando el miR-29c es bloqueado (figura 9), el NaCl genera una elevación en la expresión de la casp-3-F (80 %), indicativo de un aumento en la apoptosis y aunque la PKD está activada no logra funcionar como anti-apoptótica. Esto sugiere que la PKD necesita al miR-29c, para ejercer tal acción; es decir, el miR-29c es un mediador de la acción río abajo de la PKD. La activación de la vía apoptótica que correlaciona con la activación de la PKD por el estrés hiperosmótico, (datos no mostrados), en ausencia del miR-29c, sugiere que hay otras acciones pro-apoptóticas de la PKD.

Es claro que el miR-29c es mediador de las acciones de la PKD, pero es el miR-29c quien regula la acción apoptótica y que la PKD solo es uno de los factores que puede modular su acción.

Las acciones pro-apoptóticas del miR-29 son las más ampliamente

descritas y se han reportado para carcinoma hepático y otros (Wang et al, 2015; Chen et al, 2016) y células cardíacas durante la isquemia (Ouyang et al, 2014). Mientras que también se han reportado acciones de supervivencia en algunos tipos de cáncer (Han et al, 2015) y neuronas en maduración (Ouyang et al, 2014).

Por su parte la autofagia, es una vía altamente conservada y regulada de degradación de organelos y componentes citosólicos, éste proceso celular es requerido para mantener la homeostasis intracelular y la función normal de la célula bajo diferentes tipos de estrés como son: el que provoca la carencia de nutrientes, factores de crecimiento u oxígeno, o el causado por especies reactivas de oxígeno (Kroemer et al, 2010). Al ser partícipe de respuestas a estrés y tener algunos blancos regulados por el miR-29c, fue considerado como otro de los procesos a correlacionar con las acciones mediadas por la PKD y el miR. Se utilizó como monitor de la autofagia a la proteína LC3A/B, quien se ha propuesto como un marcador fiable para supervisar tal proceso (Tanida et al, 2008).

Durante la autofagia, las células forman vesículas de doble membrana, autofagosomas, que secuestran orgánulos, proteínas o porciones del citoplasma para su entrega al lisosoma (Kroemer et al, 2010). Investigaciones recientes han proporcionado pruebas de la participación, de la ubiquitinación en la autofagia. Agregados de proteínas ubiquinadas pueden acoplarse al autofagosoma asegurando de este modo una degradación selectiva (Kirkin

et al, 2009). En la tabla 5, se muestran algunos blancos de miR-29c que están implicado en la ubiquitinación como *Vps33a*, gen que es requerido para la fusión de endosomas y lisosomas con autofagosomas. *Stx6*, participa en el tráfico intracelular de vesículas y *Ubr7*, *Ube3b* y *Ubr3*, genes que codifican para proteínas ubiquitina ligasa 3, implicada en la determinación de la degradación de proteínas (genecards.com, 2016).

Nuestros resultados indican que el estrés salino inhibe la autofagia ya que hay una reducción en la expresión de LC3A/B tanto en células GFP como PKD. Es interesante observar un efecto ligeramente más pronunciado cuando se inhibe a la PKD (figura 7). Cuando se analiza lo que ocurre en la autofagia, al bloquear al miR-29c la respuesta al estrés es semejante. Esto sugiere que el miR-29c no regula la disminución de la autofagia inducida por el estrés hiperosmótico. En ausencia del miR-29c la pequeña acción de la PKD parece ser eliminada. Podría pensarse que al eliminar al miR la PKD tiene una acción contraria particularmente en las células GFP, pero el efecto del inhibidor de la PKD podría estar generando efectos independientes a la PKD porque el “posible efecto” se debería ver más pronunciado en las células que más PKD expresan y no es el caso.

El estado de fosforilación neta, es controlado por un equilibrio entre las cinasas y las fosfatasas (Gallego y Virshup, 2005). Dado que la activación de la cinasa conllevó a la modificación de miRs que controlan la expresión de la cadena reguladora 2 de la proteína fosfatasa-4 o PPP4R2, pretendíamos

probar la modificación en los niveles de expresión de la fosfatasa con el estímulo activador de fosforilación y determinar si este se alteraba eliminando a uno de los miRs que regulan la expresión.

Las células que expresan niveles “silvestres”, mostraron un ligero aumento de la fosfatasa en respuesta al estrés hiperosmótico, y este es mayor en las células PKD. No obstante, al inhibir a la PKD el aumento de la expresión de PPP4R2 es aún mayor en los dos tipos celulares estudiados. Al continuar estudiando la participación del miR-29c, su bloqueo genera una disminución en la expresión de la PPP4R2, lo que indica que el miR-29c participa en la regulación de la expresión de la fosfatasa y que la PKD en ausencia del miR genera un efecto mayor. En este caso observamos que la activación de la PKD por estrés hiperosmótico tendría un efecto análogo al del miR pero que sólo es tan pequeño que solo se hace patente cuando se bloquea al miR. En general pensaríamos que si al eliminar el efecto apoptótico del miR-29c se disminuye la acción de las fosfatasas, el estado fosforilado es el que debería ser predominante para la supervivencia.

CONCLUSIONES

- Se demostró que el estrés hiperosmótico puede activar a la PKD en fibroblastos 3T3, mediante la auto-fosforilación del residuo serina 916.
- La expresión del miR-29c es inhibida en un 50 % cuando las células PKD son sometidas a estrés hiperosmótico.
- La PKD activada por estrés hiperosmótico en células PKD, reduce a la caspasa-3-F, aparentemente a través del miR-29c.
- El miR-29c se sugiere actúa como pro-apoptótico en fibroblastos 3T3 estimulados con estrés hiperosmótico.
- La autofagia es inhibida por el efecto hiperosmótico, pero ni la PKD, ni el miR-29c están implicados en la regulación de tal proceso.
- El miR-29c participa en el aumento de la fosfatasa PPP4R2, que no parece ser mediado por la PKD.

PERSPECTIVAS

-Esta investigación nos indica que el estrés osmótico en fibroblastos 3T3 conduce a las células a la apoptosis. No obstante no se ha demostrado que tan alto es el nivel de apoptosis, por lo que esto podría ser un evento que debería evaluarse.

-Se ha demostrado que la PKD activada por el estrés osmótico es capaz de reducir a la caspasa-3-F, y por tanto la PKD es un factor anti-apoptótico. No obstante, podría evaluarse la participación de la PKD en eventos tempranos o tardíos de la apoptosis.

-Nuestros resultados sugieren que el miR-29c es pro-apoptótico en fibroblastos 3T3 durante el estrés hiperosmótico, sin embargo solo ha sido evaluado el marcador caspasa-3-F. El miR-29c regula muchos otros blancos que pueden medirse o monitorearse, o la misma **apoptosis para confirmar la participación pro-apoptótica** más del miR-29c en estas células.

REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2004). Molecular Biology of The Cell. GS Taylor & Francis Group 4Ed. 742, 1010-1026.
- Bae HJ, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Jung KH, Kim MG, Chang YG, Shen Q, Kim S-J, Park WS, Lee JY, Nam SW.(2014). MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 33: 2557-2567.
- Baehrecke EH. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 505-510.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie C, McLauchlan H, Klevvernic I, Arthur J, Alessi D, Cohen P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 408:297–315
- Brockner C, Thompson DC, Vasiliou V. (2012). The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts* 3: 345-364.
- Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Programmed Cell Death (Apoptosis). *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; Revisado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>.
- Budder-Hoffman SA, Shukla A, Barrett TF, MacPherson MB, Lounsbury KB, Mossman BT. (2009). A Protein Kinase C-Dependent Protein Kinase D Pathway Modulates ERK1/2 and JNK1/2 Phosphorylation and Bim-Associated Apoptosis by Asbestos. *Amer J Pathol* 174:449-459.

- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. (2007). Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Physiol Rev.* 87:1441-74.
- Chen B, Guixian S-G, Liu M, Qian L, Wang L, Gu H, Shen Y. (2016). Inhibition of miR-29c promotes proliferation, and inhibits apoptosis and differentiation in P19 embryonic carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports* 13: 2527-2535.
- Döppler H, Storz P. (2007). A Novel Tyrosine Phosphorylation Site in Protein Kinase D Contributes to Oxidative Stress-mediated Activation. *J Biol Chem* 282: 31873-31881.
- Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R. (2000). Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-betaD-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem*, 275:18476–18481.
- Fiserova B, Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. (2015). The miR-29 family in hematological malignancies. *Biomed Pap Med Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 159: 184-191.
- Fresno VJ, Casado E, Paloma CJ, Belda-Iniesta C, González-Barón M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cáncer. *Cancer Treatment Reviews* 30: 193-204.
- Fu Y, Rubin CS. (2011). Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO reports* 12: 785-796.

- Gallego M, Virshup D. (2005). Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Current Opinion in Cell Biology*, 17: 197-202.
- Galvez AS, Ulloa JA, Mario Chiong M, Criollo A, Eisner V, Barros FF, Lavandero S. (2003). Aldose Reductase Induced by Hyperosmotic Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis. DIFFERENTIAL EFFECTS OF SORBITOL AND MANNITOL* . *J Biol Chem*: 278, 38484-38494.
- García-Sáinz JA. (1996). Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de Cultura Económica.
- Genecards.org. (2016). [online] Disponible en: <http://www.genecards.org/> [Consultado el 10 Mar. 2016].
- Gong J, Li J, Wang Y, Liu,C, Jia H, Jiang C, Wang Y, Luo M, Zhao H, Dong L, Song W, Wang F, Wang W, Zhang J, Yu J. (2014). Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinog* 35: 497-506.
- Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 392 77-80.
- Han T-S, Hur K, Xu G, Choi B, Okugawa Y, Toiyama Y, Oshima H, Oshima M, Lee HJ, Kim V-N, Chang AN, Goel A, Yang H-K. (2015). MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. *Gut* 64: 203-214.
- Harikumar KB, Kunnumakkara AB,Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung

B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Foxton C, Boakes A, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnott-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha S. (2010). A Novel Small-Molecule Inhibitor of Protein Kinase D Blocks Pancreatic Cancer Growth In vitro and In vivo. *Mol Cancer Ther* 9: 1136-1146.

--Johannes FJ, Horn J, Link G, Haas E, Siemiński K, Wajant H, Pfizenmaier K (1998). Protein kinase C α downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor- κ B-dependent protective genes. *Eur J Biochem* 257:47–54.

--Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. (2009) A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol Cell* 34:259-269.

--Kobayashi S. (2015). Choose Delicately and Reuse Adequately: The Newly Revealed Process of Autophagy. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1098–1103

--Kholodenko, BN, Hoek JB, Westerhoff HV, Brown, GC. (1997) Quantification of information transfer via cellular signal transduction pathways. *FEBS Letters* 414: 430-434

--Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. (2012). The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 44: 237-244.

--Kroemer G, Mariño G, Levine B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40:80-93.

--Kunkel MT, Toker A, Tsien RY, Newton AC. (2007). Calcium-dependent regulation of protein kinase D revealed by a genetically encoded kinase activity reporter. *J Biol Chem* 282: 6733-6742.

--Lei X, Lei L, Zhang Z, Zhang Z, Cheng Y. (2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 1565-1574.

--Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *METHODS* 25: 402-408.

--Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C-Z. (2008). Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature* 8: 120-130.

--López JI, Gaafar A, Andrés L. (2009). La médula renal normal y patológica. *Rev Esp Patol* 42:263-275.

--Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo KC. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Med Univ* 11:187-192.

--Mager WH, de Boer AH, Siderius MH, Voss H-P. (2000). Cellular responses to oxidative and osmotic stress. *Cell Stress & Chaperones* 5: 73-75.

--Mansky KC, Jensen ED, Davidova J, Yamamoto M, Gopalakrishnan R. (2013). Protein kinase D promotes in vitro osteoclast differentiation and fusion. *J Biol Chem* 288: 9826-9834.

--Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, KochsG, Hug H, Marme D, Schachtele C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C

- isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J. Biol. Chem.* 268 9194-9197.
- Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. (1999). Characterization of Serine 916 as an in Vivo autophosphorylation site for protein kinase D/protein kinase C μ . *J Biol Chem* 274:26543-26549.
- Morales-Mulia S, Cardin V, Torres-Márquez ME, Crevenna A. Pasantes-Morales H. (2001). Influence of Protein Kinases on the osmosensitive release of taurine from Cerebellar Granule Neurons. *Neurochem Int* 38:153-161.
- Ni Y, Sinnott-Smith J, Young SH, Rozengurt E. (2013). PKD1 Mediates Negative Feedback of PI3K/Akt Activation in Response to G Protein-Coupled Receptors. *PLoS ONE* 8:e73149-73163
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding, CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin T-T, Yu VL, Miller DK. (2002). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- Ouyang B-Y, Xu L, Liu S, Giffar RG. (2014) Role of Astrocytes in delayed neuronal death: GLT-1 and its novel regulation by microRNAs. Chapter 9.in: *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain* ed: Parpura, V., Arne Schousboe, A., and Verkhratsky, A. Elsevier 181-182.
- Pabón-Martínez YV. (2011). MicroRNAs: una visión molecular. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud.* 43: 289-297.
- Pasantes-Morales H, Franco R, Torres-Marquez ME, Hernández-Fonseca

K, Ortega A. (2000). Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: Contribution and Mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 10:361-370.

--Rennecke J, Rehberger PA, Furstenberger G, Johannes FJ, Stohr M, Marks F, Richter KH. (1999). Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int J Cancer* 80:98–103

--Rozengurt E. (2011). Protein kinase D signaling: Multiple biological functions in health and disease. *Physiol* 26: 23-33.

--Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. (2005). Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* 280: 13205-13208.

--Rybin VO, Guo J, Steinberg SF. (2009). Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. *J Biol Chem* 284:2332-2343.

--Sánchez-Migallón MC, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. (2016). Apoptotic retinal ganglion cell death after optic nerve transection or crush in mice: delayed RGC loss with BDNF or a caspase 3 inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57: 81–93.

--Schwartz L, Guais A, Pooya M, Abolhassani M. (2009). Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? *J Inflamm* 6: 21.

--Sharlow ER, Giridhar KV, La Valle CR, Chen J, Leimgruber S, Barrett R, Bravo-Altamirano K, Wipf P, Lazo JS, Wang QJ. (2008). Potent and Selective

Disruption of Protein Kinase D Functionality by a Benzoxoloazepinolone. *J Biol Chem.* 283: 33516–33526.

--Sinnott-Smith J, Zhukova E, Hsieh N, Jiang X, Rozengurt E. (2004). Protein Kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in Swiss 3T3 Cells. *J Biol Chem* 279:16883-16893.

--Sinnott-Smith J, Jacamo R, Kui R, Wang YM, Young SH, Rey O, Waldron RT, Rozengurt, E. (2009). Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 13434-13445.

--Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2008). LC3 and Autophagy. *Meth Mol Biol* 445:77-88.

--Targets.org. (2016). TargetsScanMouse 7.1: predicted miRNA targets of miR-29c-5p. [online] Disponible en: http://www.targets.org/cgi-bin/targetscan/mmu_71/targetscan.cgi?species=Mouse&mir_vnc=miR-29c-5p [Consultado el 08 Mar. 2016].

--Torres-Márquez ME. (1983). Caracterización de cultivos primarios de hepatocitos de rata sobre biomatriz hepática. Tesis de Licenciatura. UNAM. ENEP-Iztacala. pp 15.

--Torres-Marquez, E., Sinnott-Smith, J., Guha, S., Kui, R., Waldron, R. T., Rey, O., Rozengurt, E. (2010). CID755673 enhances mitogenic signaling by

phorbol esters, bombesin and EGF through a protein kinase D-independent pathway. *Biochem Biophys Res Comm* 391:63-68.

--Torres-Marquez ME, Ruiz-Esparza R, Velazquez M, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. PKD participates in the responses to hyperosmolar stress through miRNA involved in apoptosis pathways (en preparación)

--Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, Wermann H, Westphal S, Roder C, Klapper W, Arlt A, Lehnert L, Ungefroren H, Johannes FJ, Kalthoff H. (2003). PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene* 22:8939–8947

--Vaisvaser S, Modai S, Farberov L, Lin T, Sharon H, Gilam A, Volk N, Admon R, Edry L, Fruchter E, Wald I, Bar-Haim Y, Tarrasch R, Chen A, Shomron N, Hendler T. (2016). Neuro-Epigenetic indications of acute stress response in humans: The case of microRNA-29c. *PLoS ONE* 11:1-17.

--Venardos K, De Jong KA, Elkamie M, Connor T, McGee SL. (2015). The PKD Inhibitor CID755673 Enhances Cardiac Function in Diabetic db/db Mice. *PLoS ONE* 10:e0120934-0120943.

--Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, Rozengurt E. (2001). Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J Biol Chem* 276:32606-32615.

--Wang Y, Liu C, Luo M, Zhang Z, Gong J, Li J, You L, Dong L, Su R, Kong LH, Ma Y, Wang F, Wang Y, Chen J, Zhang J, Jia H, Kong Y, Yu J. (2015). Chemotherapy-induced miRNA-29c/catenin- δ signaling suppresses

metastasis in gastric cancer. *Can Res* 75: 1332-1344.

--Zhang H, Cheng Y, Jia C, Yu S, Xiao Y, Chen J. (2014). MicroRNA-29s could target AKT2 to inhibit gastric cancer cells invasion ability. *Med Oncol* 32:1-7.

--Zhukova E, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2001). Protein Kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by Bombesin, Vasopressin, or Phorbol Esters in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 276:40298-40305.