



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Participación de la Proteína cinasa D en la
regulación del microRNA-27a inducido por estrés
salino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

YÁÑEZ OSORIO BÁRBARA ALEJANDRA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ

ASESOR DE TESIS

Dra. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

MÉXICO, CDMX, 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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Torres Márquez, en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México.

Parte de este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. E Rozengurt en la University of California at Los Angeles, así como en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

El trabajo fue parcialmente apoyado por el donativo DGAPA IN222014.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por brindarme una excelente educación, por darme una formación científica, tecnológica, social y cultural. En general, por permitirme vivir una de las mejores etapas en la vida.

A LA DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ

Por su paciencia, apoyo, confianza y comprensión durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por los conocimientos transmitidos, y así hacer de mí una mejor profesionista.

DEDICATORIA

A mis padres

Gracias por el apoyo incondicional, paciencia y comprensión durante todos estos años, sin ustedes no habría podido cumplir esta meta. Todo lo que he logrado hasta ahora es gracias a ustedes, los amo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	7
II.	MARCO TEÓRICO	
a.	La proteína cinasa D	9
b.	Vía de señalización de la PKD	10
c.	Funciones de la PKD	13
d.	Los microRNAs (biogénesis)	16
e.	El miR-27	18
f.	El estrés salino	21
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV.	HIPÓTESIS	24
V.	OBJETIVOS	25
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	
a.	Universo de estudio	26
b.	Variables	26
c.	Técnicas	27
d.	Diseño estadístico	33
e.	Diseño de estudio	34

VII.	RESULTADOS	
a.	Auto-fosforilación de la PKD1	35
b.	Niveles de expresión de diferentes microRNAs	37
c.	Genes blanco del miR-27a	38
d.	Activación de PKD1 y su efecto en la apoptosis	39
e.	Activación de PKD1 y su efecto en la autofagia	42
f.	Regulación del miR-27a en la apoptosis	44
g.	Regulación del miR-27a en la autofagia	46
h.	Estudio estadístico	47
VIII.	DISCUSIÓN	52
XI.	CONCLUSIONES	59
X.	PERSPECTIVAS	60
XI.	REFERENCIAS	61

I. INTRODUCCIÓN

La proteína cinasa D (PKD) pertenece a una familia de proteínas cinasas conservadas evolutivamente con propiedades estructurales, enzimológicas y regulatorias diferentes a los miembros de la familia de PKC. La señalización a través de PKD es inducida por un notable número de estímulos, incluyendo agonistas de los receptores acoplados a proteína G y factores de crecimiento polipéptidicos. PKD1, es el miembro más estudiado de la familia, y está implicado en la regulación de un complejo conjunto de procesos biológicos fundamentales, incluyendo la transducción de señales, la proliferación y la diferenciación celular, el transporte de moléculas a través de la membrana, la secreción, la regulación inmune, la hipertrofia cardiaca y la contracción, la angiogénesis y el cáncer. PKD media una gran diversidad de funciones biológicas normales y anormales a través de cambios dinámicos en su localización espacial y temporal, combinado con su especificidad de sustrato. Estudios sobre PKD hasta ahora indican una diversidad sorprendente tanto por su generación de señales y distribución como por su potencial para interacciones reguladoras complejas con múltiples vías río abajo ⁽¹⁾.

Por otro lado, el miR-27a pertenece a la familia de miRNAs miR-27, su transcrito primario es aproximadamente de 70 nucleótidos

de longitud y posteriormente es procesado por Dicer para dar un producto maduro de alrededor de 22 nt ⁽²⁾.

El miR-27 participa en la regulación de diferentes procesos celulares, tales como: la regulación negativa de la adipogénesis en humanos, la protección de la apoptosis durante la diferenciación de células troncales embrionarias (CTE), la proliferación de las células de Schwann (SC) por la supresión de FOXO1, respuesta al estrés, entre otros ⁽³⁻⁵⁾.

El estrés salino es un estrés producido por una concentración de iones tan elevada que produce estrés iónico y un estrés osmótico ⁽⁶⁾.

Específicamente éste proyecto se enfoca en evaluar si el estrés salino induce la activación de la PKD1 por auto-fosforilación de los residuos de Ser916. Sumado a esto, se determinó si la activación de la PKD1 afecta la expresión del miR-27a, siendo así, se propuso investigar si el cambio en la expresión de éste miR afecta la expresión de genes asociados con proteínas que participan en los procesos de apoptosis y autofagia.

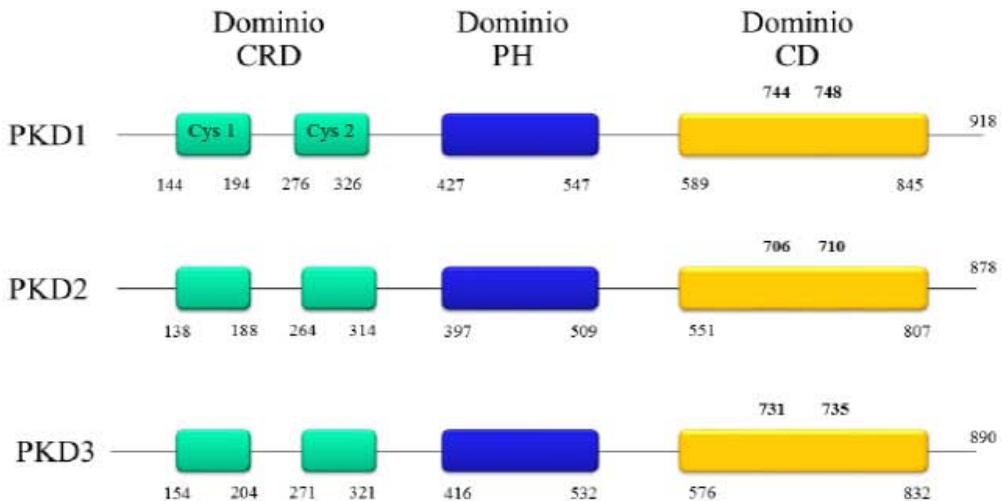
II. MARCO TEÓRICO

La proteína cinasa D (PKD)

La proteína cinasa D (PKD), es el miembro fundador de una nueva familia de proteínas Serina/Treonina cinasas altamente conservadas evolutivamente, que ocupa una posición única en las vías de transducción de señales iniciadas por diacilglicerol (DAG) y PKC ⁽⁷⁾. La PKD se localiza en el citosol, núcleo y complejo de Golgi. La familia de proteínas PKD es un grupo de tres isoformas: PKC μ /PKD1, PKD2 y PKD ν /PKD3 ⁽⁸⁾, su estructura incluye tres características, la primera de ellas es que poseen una porción reguladora NH₂-terminal que contiene repeticiones en tándem de dedos de zinc ricos en cisteína (denominado dominio rico en cisteína o CRD) altamente homólogos a los dominios que se encuentran en proteínas PKCs DAG/forbol éster sensibles y en otras proteínas de señalización reguladas por DAG. PKD une ésteres de forbol con alta afinidad a través de su CRD, el cual juega un papel crítico en la mediación de la translocación de PKD a la membrana plasmática y el núcleo, y además también reprime la actividad catalítica de la enzima ⁽⁹⁾.

La segunda característica, es el dominio catalítico (CD) y por último un dominio homólogo de plecstrina (PH) que regula la actividad

de PKD, con funciones auto-inhedoras. Este dominio se encuentra interpuesto entre el CRD y el dominio catalítico, ambos dominios se unen a lípidos de membrana así como a otras proteínas. Se ha demostrado que las PKD con deleciones o simples sustituciones de aminoácidos dentro del dominio PH mantienen a la enzima activa, lo que indica que el dominio PH, así como el CRD mantienen a la PKD en un estado catalítico inactivo ^(8, 9).



Esquema 1. Representación esquemática de PKD. Los números representan la posición de los aminoácidos, las secciones en color verde corresponden al dominio CRD (dominio rico en cisteína), las de color azul representan el dominio PH (homólogo de pleckstrina), y finalmente los de color amarillo representan el dominio catalítico (CD); además, se indica la posición de los residuos de Serina que son fosforilados vía PKC (números en negritas).

Vía de señalización de la PKD

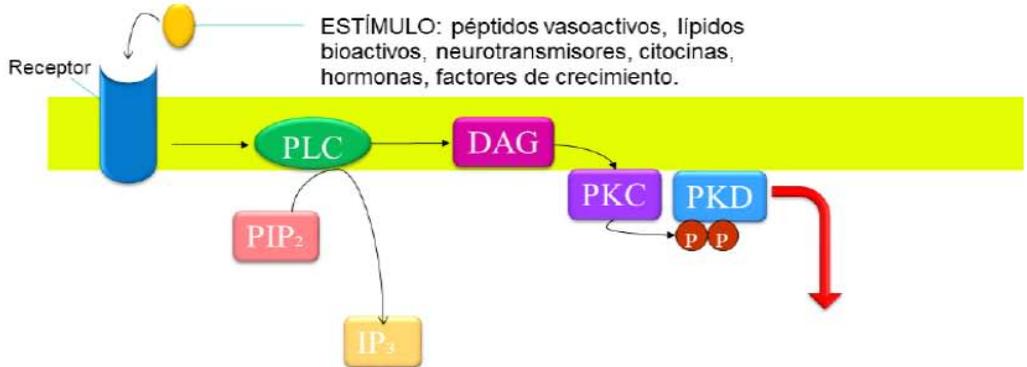
PKD1 es la isoforma más estudiada de esta familia, se sabe que en células no estimuladas PKD1 se encuentra en un estado de

baja actividad catalítica, esto por una auto-inhibición mediada por sus dominios PH y NH₂-terminal ⁽¹⁰⁾. La típica cascada de activación de la PKD involucra receptores acoplados a proteína G (GPCR) dependientes de la activación de fosfolipasa C (PLC) y la producción de diacilglicerol ⁽¹¹⁾.

Un gran número de señales externas involucradas en la comunicación intercelular, incluidos péptidos reguladores (bombesina, bradiquinina, endotelina y vasopresina), citocinas, neurotransmisores, factores de crecimiento y desarrollo, o lípidos bioactivos, se unen a receptores que promueven la estimulación de isoformas de la familia de fosfolipasa C (PLC), y catalizan la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir dos segundos mensajeros: IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato) el cual desencadena la liberación de calcio intracelular, y también DAG que induce respuestas celulares al reclutar y activar isoformas de PKC clásicas (α, β, γ) y complejas ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$).

Estudios recientes han demostrado que PKC interactúa directamente con el dominio PH de PKD. El DAG y PKC median la transfosforilación de PKD en Ser744, actuando sinérgicamente para promover la activación catalítica de PKD y su autofosforilación en Ser748. Análogo a este mecanismo, los ésteres de forbol y análogos de DAG, pueden pasar por alto a la PLC y activar a PKC directamente.

Los mecanismos subyacentes dependen de la eliminación de la autoinhibición impuesta por el dominio PH, tras las fosforilación por PKC ^(1, 12).



Esquema 2. Vía de activación de PKD. Un gran número de señales externas se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que promueven la estimulación de isoformas de PLC, y catalizan la hidrólisis de PIP₂ para producir dos segundos mensajeros: IP₃ el cual desencadena la liberación de calcio intracelular, y también DAG que induce respuestas celulares al reclutar y activar isoformas de PKC. El DAG y PKC median la transfosforilación de PKD en Ser744 y en Ser748. Análogo a esto, los ésteres de forbol y análogos de DAG activan a PKC directamente.

El análisis de la activación de PKD dependiente de PKC se ha ampliado para estudiarla más a fondo en células normales, tales como fibroblastos, células intestinales y células epiteliales de riñón, células de músculo liso, cardiomiocitos, neuronas, osteoblastos, linfocitos B y T, mastocitos y plaquetas, así como en una variedad de células cancerosas ⁽¹¹⁾.

Funciones de la PKD

La vía DAG/PKC/PKD es crucial para la función de PKD, está implicada en la regulación de una notable variedad de procesos biológicos fundamentales, incluyendo la transducción de señales, la supervivencia celular a través de la activación del factor nuclear-kappaB (NF-kB) inducida por el estrés oxidativo, la diferenciación, la expresión génica mediante la regulación de las desacetilasas de histona de clase IIa (HDAC), la proliferación celular a través de la modulación de la vía de señalización MEK/ERK, el tráfico de proteínas, la motilidad celular y la respuesta inmune. Estas funciones de PKD son conocidas por afectar muchos aspectos de la biología del tumor, y hay evidencia de que la expresión de PKD no está regulada en múltiples tipos de cáncer ^(13, 14). PKD también juega un papel activo en los procesos patológicos como la hipertrofia y angiogénesis cardíaca, por lo que la PKD es un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos ⁽¹⁵⁾.

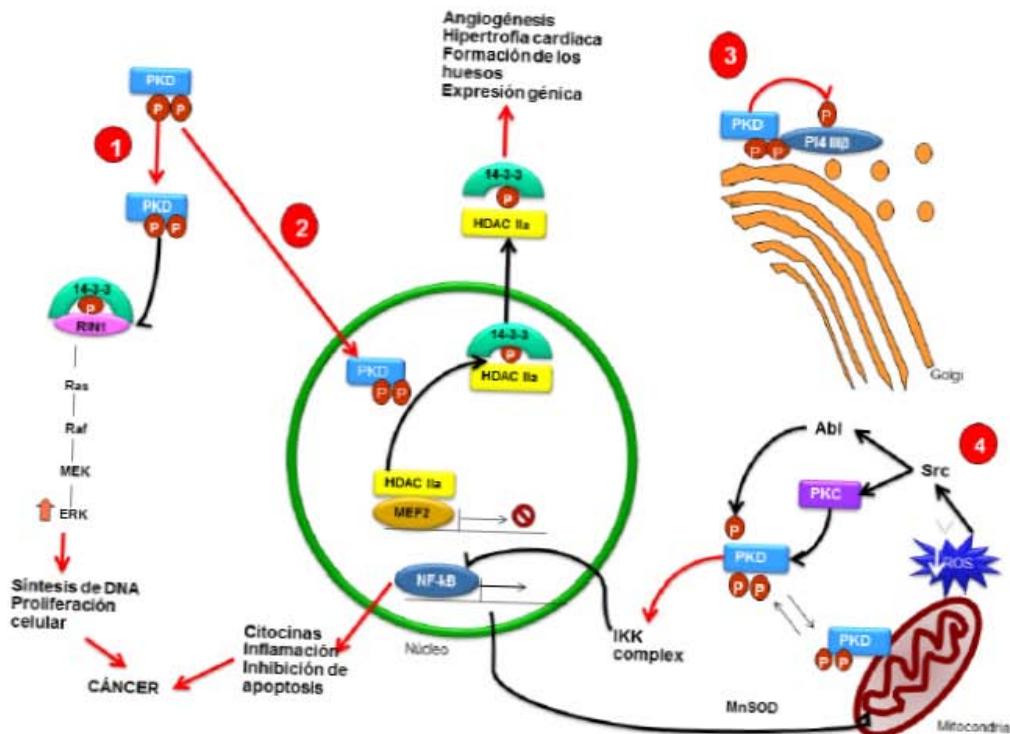
Una de las funciones mejor caracterizadas de PKD es que participa en la regulación de la fisión de las vesículas de transporte desde el complejo de Golgi hacia la membrana plasmática, proceso que está mediado por la activación de PKD y requiere la asociación del Golgi con PKC a través de la interacción directa con Gβγ; otro

blanco de PKD es la fosfatidilinositol 4-cinasa IIIb [PtdIns (4) K IIIb] pieza clave en la estructura y función de la red Trans Golgi ⁽¹²⁾.

PKD tiene una participación importante en la motilidad celular, invasión y adhesión. PKD podría modular la motilidad celular promoviendo el reciclaje de la integrina $\alpha\beta 3$ y promoviendo adhesiones focales nacientes ⁽¹⁶⁾. En cuanto al efecto proliferativo, se ha demostrado en diversos sistemas celulares que los agonistas de GPCR potencian la síntesis de DNA y la proliferación celular por la vía PKC-PKD. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), induce la activación de la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) por medio de PKD. Acoplada a estos efectos pro-proliferativos, PKD promueve la respuesta antiapoptótica en células tumorales ^(17, 18).

Se ha demostrado que PKD puede fosforilar Ras y RIN1 (interactor Rab 1), una proteína multidominio que en su forma no fosforilada inhibe la interacción Ras/Rab, y por lo tanto impide la activación de ERK. La fosforilación por PKD de RIN1 en su Ser351 induce la unión de proteínas 14-3-3 que restringen a RIN1 en el citosol, con ello suprime la capacidad de bloquear la interacción de Ras/Raf-1 en la membrana plasmática ⁽¹⁹⁾.

PKD se involucra también en la supresión de la acción del



Esquema 3. Principales funciones celulares de PKD. PKD está involucrada en la regulación de una notable variedad de procesos biológicos fundamentales. 1) la regulación de vías de señalización, por ejemplo la modulación de la vía de señalización RIN1/Ras/Raf/MEK/ERK; 2) la supervivencia celular a través de la activación inducida por el estrés oxidativo del factor NF- κ B; 3) en la regulación de la fisión de las vesículas de transporte desde el complejo de Golgi hacia la membrana plasmática; y 4) la regulación de la expresión génica mediante la fosforilación de las HDACIIa facilitando su unión a las proteínas 14-3-3.

factor de crecimiento epidérmico (EGF). PKD fosforila a la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), que a su vez ejerce su efecto inhibitorio sobre el receptor de EGF al fosforilarlo ⁽²⁰⁾.

Estudios anteriores demostraron que PKD fosforila residuos de serina específicos de histonas desacetilasas de clase II (HDAC)

que conduce a su asociación con las proteínas 14-3-3, trayendo como consecuencia el secuestro de HDAC en el citoplasma por la formación de un complejo con las proteínas 14-3-3. Se piensa que las HDAC de clase II tienen un sitio de fosforilación específico para PKD, y dado que estas enzimas regulan la accesibilidad de la cromatina, su desregulación libera a los genes diana de sus acciones represivas, facilitando de esta manera la expresión de genes ⁽²¹⁾.

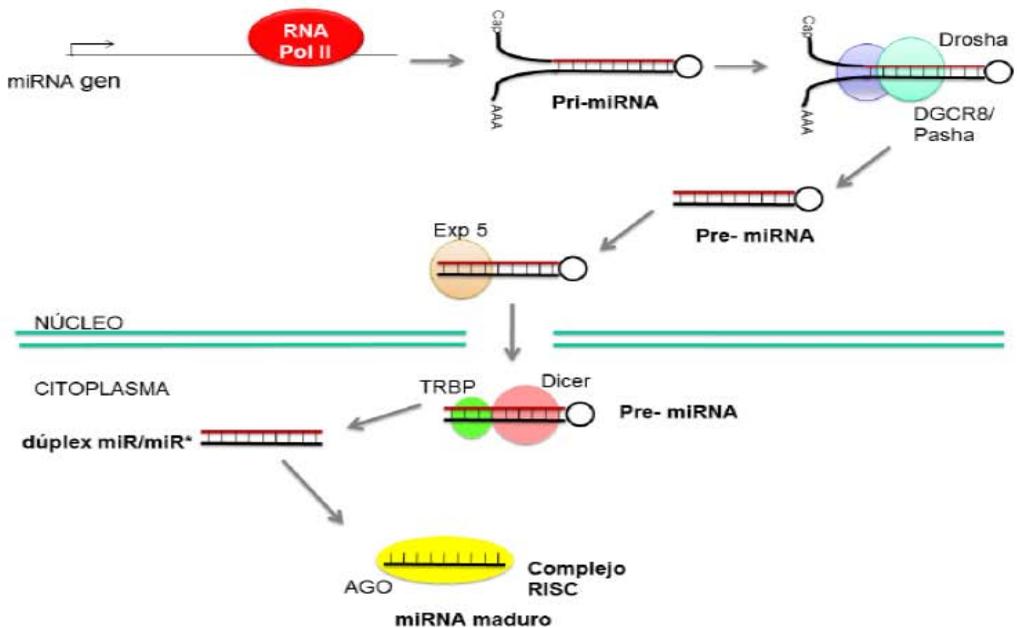
PKD también está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo. El estrés oxidativo induce la activación de PKD, esta cinasa activa la transcripción del factor NF- κ B para proteger a la célula de la muerte celular. Las especies reactivas de oxígeno a través de Src-Abl inducen la fosforilación en el dominio PH de PKD, activando la vía de señalización río abajo hacia IKK-NF- κ B ⁽²²⁾.

Los microRNAs

Los microRNA o miRs son un subgrupo de RNAs no codificantes de aproximadamente 22nt de largo, que desempeñan un papel muy importante en la regulación de genes. Esto es posible porque sus miRNAs blanco regulan la expresión de genes de manera post-transcripcional.

Las funciones de regulación de miRNAs se han identificado no sólo en el ritmo de desarrollo, la diferenciación celular, la

proliferación, la transducción de señales, diferenciación de linajes hematopoyéticos y apoptosis, sino también en la tumorigénesis y en las interacciones hospedero-patógeno. Las mejoras en la caracterización de miRNAs y en técnicas para su análisis funcional han revelado patrones anormales en la expresión de éstos en varias enfermedades y procesos celulares. Se ha demostrado que los



Esquema 4. Biogénesis del microRNA (miR). Se inicia la transcripción por la RNA polimerasa II, generando un miR primario (pri-miR). El pri-miR se caracteriza por una estructura de horquilla de RNA reconocido por la enzima nuclear RNAasa III (Drosha), y su cofactor DGCR8. Estas proteínas se unen al pri-miR para generar una horquilla corta conocido como pre-miR. Este intermediario de miR es exportado del núcleo hacia el citoplasma por la Exportina-5. Ya en el citoplasma, una segunda enzima RNAasa III (Dicer), hace un par de cortes que define el otro extremo del miR, generando un dúplex miR/miR*. Finalmente, la proteína argonauta (AGO) se une al miR maduro de hebra simple, para formar un complejo efector llamado RISC (RNA-induced silencing complex).

genes de miRs frecuentemente coinciden con sitios frágiles y puntos específicos de anomalías cromosómicas, o localizados cerca de loci correlacionados con la tumorigénesis y por lo tanto susceptibles al cáncer ^(23, 24).

El miR-27

Recientes estudios han demostrado que el miR-27 no solo es requerido para el desarrollo, supervivencia y diferenciación de células troncales embrionarias (CTE), sino que también tiene un papel importante en el mantenimiento de supervivencia de neuronas maduras y su funcionamiento. El sobre crecimiento y los obstáculos para la plasticidad sináptica, dirigen al desarrollo de varias enfermedades del sistema nervioso, incluidas la enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome-X frágil (FXS) y autismo ^(25, 26).

El miR-27 pertenece a una familia de miRNAs precursores llamada miR-27, que se encuentra en el cromosoma humano 19. Su transcrito primario es de 70 nucleótidos de longitud aproximadamente y posteriormente es procesado por Dicer para dar un producto de 22 nt aproximadamente, el miR-27 maduro. Se ha propuesto que el miR-27 opera junto con miR-23 y miR-24 en un grupo cooperativo ⁽²⁾.

El miR-27 participa en diferentes procesos celulares, llevando a cabo procesos de regulación. El miR-27b es el primer microRNA

que se ha reportado como regulador negativo de la adipogénesis en humanos. Primero se descubrió que la expresión del miR-27b disminuye durante la adipogénesis de células hMADS (células troncales multipotentes humanas derivadas del tejido adiposo), y posteriormente, se encontró que la sobreexpresión de miR-27b impide la acumulación de triglicéridos y reprime la expresión de genes marcadores adipogénicos durante la diferenciación terminal⁽³⁾.

Por otra parte, se ha demostrado que los miR-23a, miR-24 y miR-27a (cluster miR-23a) previenen la diferenciación de células troncales embrionarias (CTE) de la apoptosis inducida por la proteína BMP4, ya que se ha observado que BMP4 controla los niveles de expresión del cluster miR-23a, modulando la expresión de la proteína Smad5, y este lazo podría estar controlando el balance entre la sobrevivencia y la apoptosis durante la diferenciación de las células CTE. Se cree que al unirse BMP4 a los receptores de las células CTE se desencadena la transcripción de los miRs del cluster miR-23a, y estos miRs usan a Smad5 como efector principal, además este cluster al mismo tiempo regulan la expresión de los Smads. Como consecuencia estos miRs junto con Smad5 participan en una curva de regulación que modula la respuesta de las células a BMP4⁽⁴⁾.

Adicionalmente, se demostró que la sobre expresión de miR-27a facilita la proliferación de las células de Schwann (SCs), inducida por quito-oligosacáridos (oligosacáridos del quitosano). Esta acción es llevada a cabo por la supresión del factor de transcripción de la subfamilia Fork head Box O (FOXO1). Se observó que FOXO1 es un blanco del miR-27a y participa en la proliferación de las SCs inducida por COS (intermediarios de quito-oligosacáridos) durante la regeneración nerviosa en ratas. Observaron que los COS incrementan los niveles de expresión del miR-27a causando una reducción de FOXO1, lo cual subsecuentemente acelera el ciclo celular y se estimula la proliferación celular. FOXO1 está involucrado en una variedad de importantes procesos celulares incluyendo el metabolismo, la diferenciación celular, apoptosis, y la progresión del ciclo celular ⁽⁵⁾.

También se ha visto que los niveles de miR-27 se incrementan en tejidos de cáncer gástrico. Así también, que la sobreexpresión de miR-27 promueve la metástasis en células AGS (línea epitelial gástrica), mientras que su agotamiento provocó la disminución de la metástasis en las células ⁽²⁷⁾.

El estrés salino

Existe una gran diferencia entre la concentración de los iones en los compartimientos intracelulares y extracelulares, el catión más importante en el líquido extracelular es el sodio (145 mmol/L) y el anión más abundante es el cloro (104 mmol/L). La composición del líquido intracelular varía en función de los tejidos, aunque mantiene en todos ellos sus características principales, tales como que el principal catión es el potasio, mientras que las concentraciones de sodio son relativamente bajas (14 mmol/L) ⁽⁶⁾.

El proceso por el que el agua se difunde a través de las membranas celulares se denomina ósmosis. La presión osmótica está determinada por el número total de partículas en cualquier lado de la membrana. Con el fin de comparar la presión osmótica de distintas soluciones se utilizan diferentes términos, las soluciones que tienen la misma concentración de partículas de soluto se dice que son isosmóticas; una solución que tiene una mayor concentración de partículas de soluto que otra, hiperosmótica con respecto a la más diluida; y finalmente, aquella con una menor presión osmótica se denomina hiposmótica ⁽⁶⁾.

El sistema de tonicidad se refiere a los efectos de las soluciones sobre el volumen celular. Una solución se define como isotónica si no produce ningún cambio en el volumen de célula bañada en ella

(ejemplo: NaCl al 0.9% es isotónica). Cuando la solución provoca que las células se hinchen por el ingreso de líquido a la célula, se denomina hipotónica; y finalmente si la solución provoca que la célula reduzca su tamaño por la pérdida de agua, se denomina hipertónica ⁽⁶⁾.

El estrés salino es un estrés producido por una concentración de iones tan elevada que produce estrés iónico y un estrés osmótico. El estrés es provocado por la excesiva absorción de sodio y cloro, que ayudan al potencial osmótico de las células y desencadena problemas de toxicidad si estos iones no son compartimentalizados, exportados o secretados apropiadamente. El estrés osmótico en condiciones de salinidad, se sufre por la gran concentración de solutos disueltos en el medio celular. Entre más solutos existan, más se reduce el potencial del soluto o potencial osmótico ⁽²⁸⁾.

El estrés salino es un estímulo que genera condiciones muy hostiles para las células, por lo cual se propuso estudiar el efecto que tiene este estímulo hiperosmótico sobre la actividad catalítica de la PKD1 en fibroblastos 3T3, que presentan niveles basales de esta proteína y en otros que la sobre-expresan. Posteriormente, como hasta ahora se desconocen los blancos de fosforilación de la PKD, se propuso que una forma de regular los procesos con los que se le asocia, sería a través de la regulación de la expresión de microRNAs.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína PKD está involucrada en una gran variedad de procesos biológicos esenciales, incluyendo la transducción de señales, la organización de la cromatina, el funcionamiento del aparato de Golgi y la expresión de genes, entre otros. A pesar de la gran variedad de trabajos que correlacionan a la fosforilación con los procesos donde participa la PKD, todavía no hay una completa conexión entre ellos, por lo que la regulación a otros niveles, como el molecular, podrían ser los eslabones en esta conexión. Particularmente, nos abocaremos a investigar el papel regulador de PKD sobre la expresión del miR-27a en respuesta al estrés salino en fibroblastos Swiss 3T3.

IV. HIPÓTESIS

El estrés osmótico generado por cloruro de sodio 824 Osm activará a la PKD en los fibroblastos 3T3. El estrés salino ejercerá cambios en la expresión del miR-27a. Estos cambios en la expresión del miR-27a correlacionarán con los efectos ejercidos por la PKD en los procesos de apoptosis y autofagia.

V. OBJETIVOS

- Generales

- Determinar la activación de la proteína cinasa D (PKD) inducida por estrés salino y su participación en la regulación del miR-27a en la línea celular Swiss 3T3-PKD o Swiss 3T3-GFP.
- Correlacionar la activación de la PKD con la apoptosis, por mediación del miR-27a
- Correlacionar la activación de la PKD con la autofagia, por mediación del miR-27a

- Particulares

- Determinar la activación de la PKD mediante la fosforilación de la ser 916 en líneas celulares Swiss 3T3-GFP y 3T3-PKD
- Detectar los cambios de expresión de proteínas que regulan la apoptosis y la autofagia inducidos por el estrés salino
- Analizar si la expresión del miR-27a y la actividad de la PKD1 participan conjuntamente en los procesos celulares evaluados, mediante el uso de inhibidores de la PKD y de la expresión del miR-27a.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSO DE ESTUDIO

Se utilizaron fibroblastos Swiss 3T3, provenientes de tejido de embrión de ratón albino suizo, una línea celular utilizada ampliamente como un modelo para estudiar los mecanismos de señalización mitogénica. Las células 3T3 fueron transfectadas para sobre-expresar a PKD1 (Swiss 3T3 -PKD) o portando a la proteína verde fluorescente (Swiss 3T3-GFP) ⁽³²⁾. Ambos tipos celulares serán sometidos a tratamientos con estrés salino (NaCl 0.3M), para evaluar la activación de la proteína PKD y sus efectos reguladores en el miR-27a.

VARIABLES

- Independientes:

- Estrés salino (cloruro de sodio NaCl [824 Osm]f)
- miR-27a

- Dependientes:

- Activación de la proteína PKD (medida como la fosforilación de la Ser 916)
- Regulación del miR-27a (determinado por qRT-PCR)
- Detección de al menos un blanco potencial del miR-27a
- Respuesta de los blancos al bloqueo del miR-27a

TÉCNICAS

Cultivo celular. Cultivos en serie de células Swiss 3T3 transfectadas y no transfectadas (es decir que sobre expresan PKD) se mantuvieron a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% en una atmósfera humidificada que contiene 10% de CO₂. Para fines experimentales, las células se sembraron en placas de 100mm de diámetro a 6x10⁵ células/placa o en placas de 35mm a 1x10⁵ células/placa y se cultivaron durante 7 a 9 días hasta su confluencia ^(29, 30).

Transfección con antago-miRNA. La transfección de células 3T3-GFP y 3T3-GFP con el inhibidor de miRNA se realizó utilizando HiPerFect Transfection Reagent, como se indica a continuación: antes de la transfección se sembraron de 7 a 8x10⁴ células en cajas de 35mm en DMEM 10% FBS, se incubaron las células por 2 horas a 37°C y 10% de CO₂. Para la transfección se diluyó el antago-miRNA en medio de cultivo sin suero para obtener una concentración final de 10nM. Se añadió reactivo de transfección HiPerFect al inhibidor de miRNA diluido y se mezcló mediante agitación. Esta mezcla se incubó durante 5 a 10 minutos 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. Se incubaron las células con los complejos de transfección a 37°C por 48 horas. (NOTA: 20µM del inhibidor de miRNA es equivalente a aproximadamente 0.25µg/µL. El peso molecular de un inhibidor de 21nt miRNA es aproximadamente 13-15µg/nmol.)

Inmunoblotting y detección de especies fosforiladas de PKD y proteínas relacionadas. Células confluentes Swiss 3T3-GFP y Swiss 3T3-GFP, se pre-incubaron por 1 hora con DMEM sin suero ó con dos tratamientos diferentes: 1) tratamiento con NaCl, se agregó NaCl 0.24M, y se disolvió DMEM sin suero para dar una concentración final de 824 mOsm. Se añadió éste medio a las cajas con las células correspondientes (ver cuadro 1) y se dejaron incubar por 20 minutos a 37°C. 2) El segundo tratamiento es inhibidor con sodio, se preparó DMEM sin suero con 2.5 µM final de CRT 0066101 (TOCRIS Bioscience, No. 4975), a continuación se añadió esta disolución a las cajas con las células correspondientes (ver cuadro 1) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Terminado el tiempo de incubación, se agregó NaCl [824 Osm]f y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Concluido el tiempo de estimulación, se eliminó el medio con tratamiento y se añadieron 120 µL del amortiguador de Laemli 2X (96 mL de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 60 g de glicerol, 24 g de SDS, 14.4mL de Mercaptoetanol, 1.6 mL de EDTA 0.5M pH 8.0, 0.02 g de azul de

Bromofenol y cbp 400 mL de agua destilada) y dejó congelar hasta su uso. Las muestras almacenadas en Eppendorf, se hirvieron 5 minutos a 95°C previos a su cargado en los geles PAGE-SDS. Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Criterion Precast Gel) con gradiente de 4 al 20% (PAGE-SDS); se depositaron 40 µL de las células en los pocillos, y después fueron electrotransferidas desde el gel hasta una membrana de PVDF. La transferencia se realizó con un campo eléctrico de 100V, con amperaje menor de 40mA, a 4°C por 2 horas y media, en cámara húmeda (Bio-Rad). El buffer de transferencia consiste en 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 cat # 1706404) en un buffer de fosfato y solución salina pH 7.2 (PBS-leche al 5% con 0.001% azida de sodio) por 2 horas a 37 °C. Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C en agitación con los anticuerpos específicos diluidos en la solución de PBS (conteniendo azida de sodio 0.001%). Los anticuerpos primarios en dilución 1:1000 fueron los siguientes: policlonal anti-pS916-PKD; (Cell Signaling, #2051), monoclonal anti-caspasa fraccionada 3 (Cell Signaling, #9664S), monoclonal anti-LC3A/B (Cell Signaling #12741S), monoclonal anti-GAPDH (Cell Signaling, #2118) y policlonal anti-PPP4R2 (Novus, #NB100-2877) en dilución 1:2000. Los anticuerpos secundarios utilizados

en dilución 1:1000 en PBS-leche al 3% (sin azida) fueron: el generado en burro anti-conejo (Amersham ECL donkey anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific WholeAntibody #NA934-1ML) o en burro anti-ratón (Amersham ECL donkey anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific WholeAntibody #NA931-1). Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL). Los autoluminogramas fueron escaneados usando un scanner Fujifilm LAS-3000 Imager, y las bandas marcadas se cuantificaron usando el programa Fujifilm Multi Gauge Software.

Tratamiento	Células PKD			Células GFP		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
NaCl	-	+	+	-	+	+
Inhibidor CRT	-	-	+	-	-	+

Cuadro 1. Tratamientos indicados para las células PKD y células GFP.

Extracción de miR-27a. Para la extracción del microRNA se utilizó TRIzol® Reagent (ambion, No. 15596-026 y 15596-018), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. 1) se removió el medio de cultivo, se agregó 1 mL de TRIzol® Reagent directamente a las células en las cajas por cada 10cm² de superficie, se lisaron las células directamente en las cajas por pipeteo homogenizando las muestras. 2)

se centrifugaron las muestras a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. 3) en la separación de fases, se incubó la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo nucleoprotéico; se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol usado para la homogenización, se tapó el tubo y se agitó vigorosamente con las manos por 15 segundos, se dejó incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C, para remover la fase acuosa se inclinó el tubo a 45° y se utilizó una pipeta para retirarla, evitando tomar parte de la fase orgánica, y se vertió la fase acuosa a un nuevo tubo. 4) para el aislamiento de RNA se agregó isopropanol al 100% a 4 °C a la fase acuosa (0.5 mL /mL de TRIzol) se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4°C. 5) para el lavado de RNA se removió el sobrenadante del tubo dejando solo el botón de RNA, se lavó este botón con etanol al 75% (1mL/mL de TRIzol), se agitó brevemente la muestra, después se centrifugó el tubo a 7500 x g por 5 minutos a 4°C y se desechó el lavado, se dejó secar el RNA en el tubo a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió el RNA en agua libre de RNasa y se congeló hasta su uso.

Síntesis de cDNA. Se realizó utilizando el Kit miScript II RT (Sabiosciences-QIAGEN). La mezcla de reacción fue 4 µL de 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µL de 10x miScript mezcla de nucleicos, 2 µL de miScript mezcla de transcriptasa reversa, 250 ng/ µL de RNAt purificado y agua libre de RNAsas cbp 20 µL (miScript PCR System Handbook). Los reactivos fueron descongelados a temperatura ambiente, una vez descongelados se homogenizaron manualmente y se mantuvieron en hielo durante la preparación de cada reacción. Se colocaron las reacciones en el termociclador (StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems), y 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 agua libre de nucleasas.

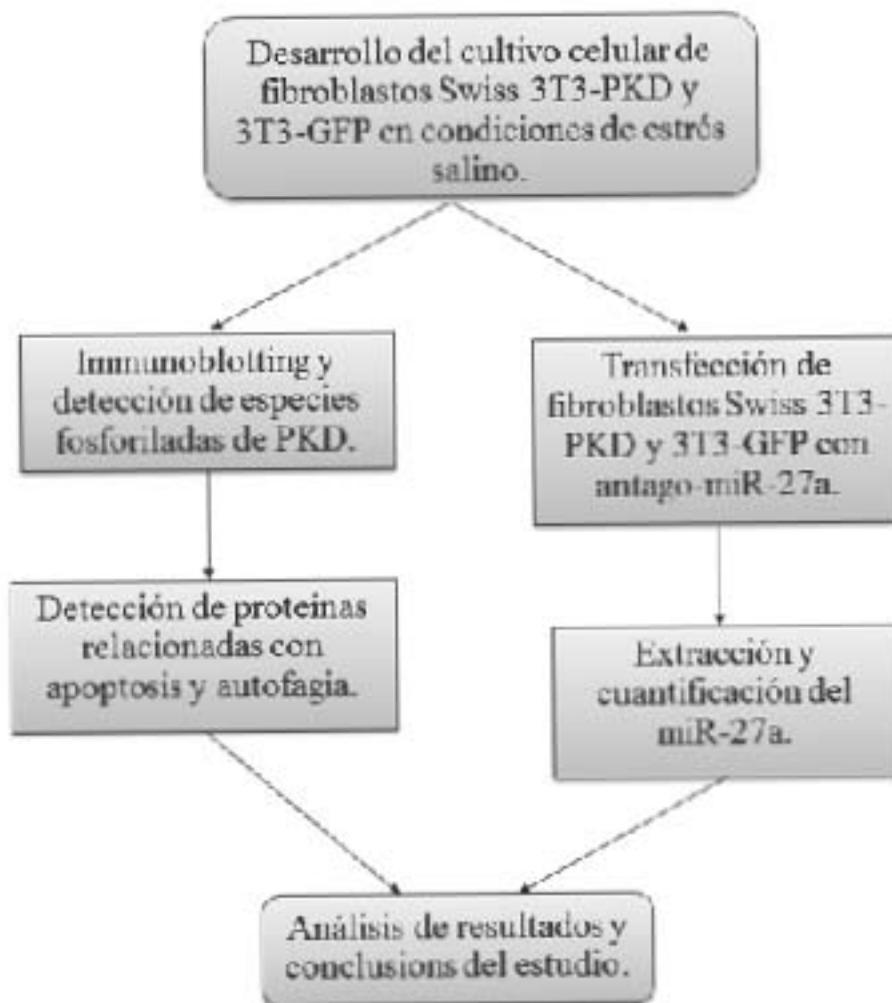
PCR cuantitativa de miR-27a. La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó usando el kit SYBR Green, miScript Primer Assays de QIAGEN (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las condiciones de reacción fueron: 95°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos, y 70°C por 30 segundos.

DISEÑO ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la expresión del miR-27a en diferentes ambientes celulares (estrés salino o estrés salino con inhibidor) usando PCR cuantitativa en tiempo real y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Kenneth J. Livak y Thomas D. Schmittgen. (31)

El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado para determinar si existe alguna diferencia entre las variables manejadas, utilizando una ANOVA de un factor con un $\alpha=0.05$, y una T de Student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%.

DISEÑO DE ESTUDIO



VII. RESULTADOS

Para evaluar la activación de la PKD1 inducida por estrés salino, células Swiss 3T3-PKD1 (células PKD) y Swiss 3T3-GFP (células GFP) se incubaron con NaCl hiperosmolar (824 Osm) por 20 minutos, y para explorar si la respuesta obtenida ante el estrés salino es mediada por la auto-fosforilación de la PKD1, se incubaron las células PKD y GFP con el inhibidor CRT.

La figura 1 muestra la activación de la PKD1 por fosforilación en sus residuos de Serina-916 (pS916-PKD1) de células GFP y PKD. Se puede observar en la figura 1B que las células GFP sometidas a estrés salino mostraron fosforilación 9.8 veces mayor a la basal, y el inhibidor CRT revirtió la fosforilación de la PKD1 ocho veces (1.9 veces el basal). En la figura 1A las células PKD sometidas a estrés salino mostraron un comportamiento similar al de las células GFP pero en mayor proporción, ya que el estrés salino indujo una fosforilación 45 veces sobre el valor basal, y el inhibidor CRT revirtió la fosforilación desde 45 hasta 8.2 veces el valor basal.

Los gráficos 1E y 1F muestran más claramente el efecto del estrés salino y el inhibidor CRT sobre la PKD1, en ellos es posible observar que el comportamiento es similar entre ambos tipos de células. En ambos tipos celulares el estrés salino induce la auto-fosforilación de residuos

de Serina 916 y el inhibidor CRT bloquea 80% aproximadamente la inducción de esta fosforilación.

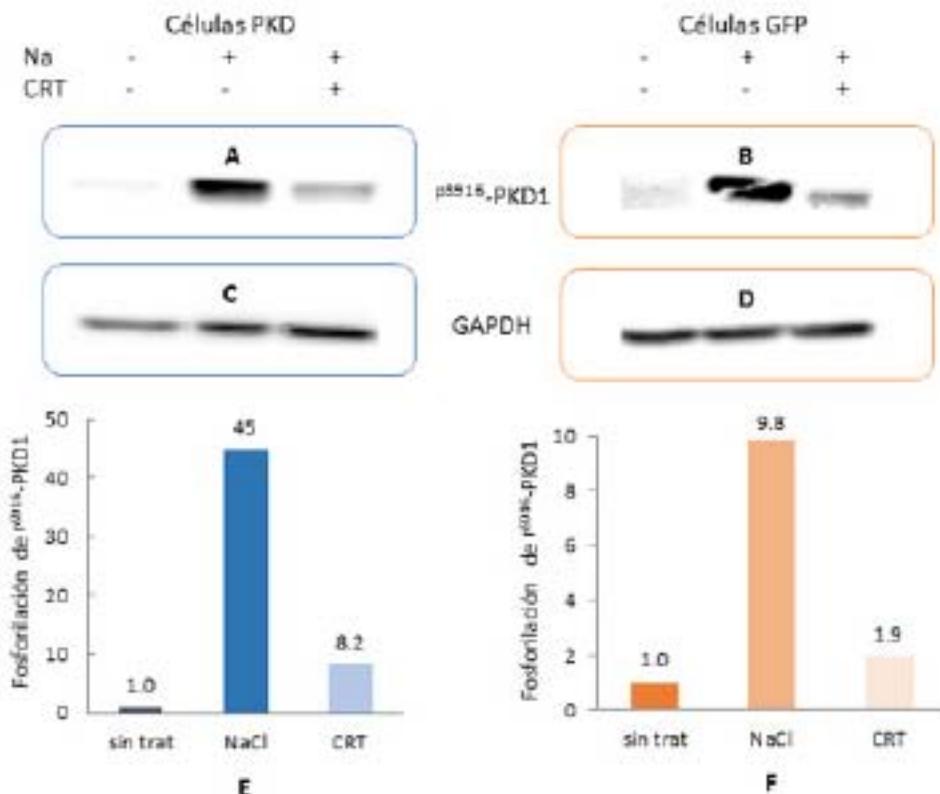


Figura 1. Fosforilación de residuos de Serina916 en PKD1 de células PKD y GFP ante estrés salino. Fibroblastos 3T3-PKD y 3T3-GFP se pre-incubaron por 1 hora con DMEM sin suero o con CRT donde se indica, posteriormente se añadió NaCl 824 Osm por 20 min en las células donde así se indica. Se añadió amortiguador de Laemli a las muestras y se sometieron a PAGE y al Western correspondientes, ver métodos. En A se muestra la fosforilación de la PKD1 en residuos de Serina916 en células PKD. B muestra la fosforilación de PKD1 en residuos de Ser916 de células GFP. C y D muestran la expresión de GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) usado como control de carga. En E y F se muestra la comparación del efecto de la activación o inhibición de PKD1 en células PKD y GFP con respecto a las células control, los valores se expresan en el número de veces que aumenta o disminuye la fosforilación considerando a las células control como 1.0, los datos fueron obtenidos a partir de la cuantificación de bandas (QL) con el programa Fujifilm Multi Gauge Software.

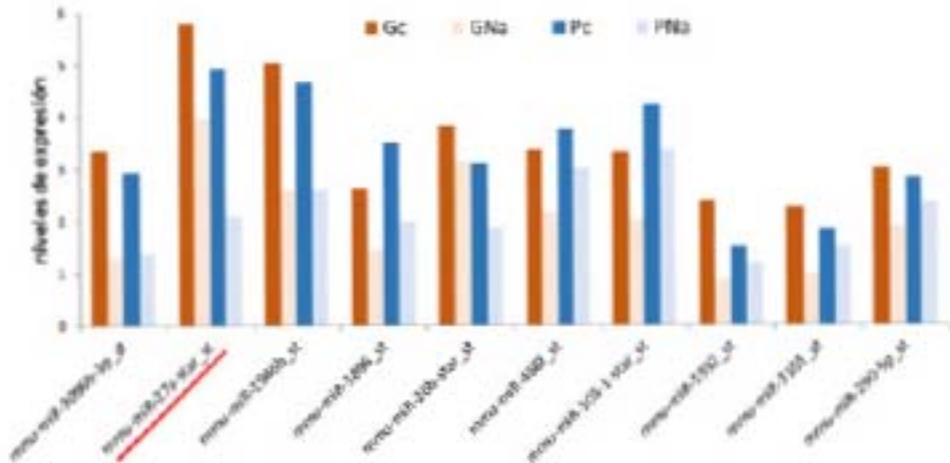


Figura 2. Comparación de los niveles de expresión de diferentes microRNAs (miRs) en células PKD y GFP ante la activación de PKD1 por estrés salino contra sus niveles de expresión basales. Fibroblastos 3T3–PKD y 3T3–GFP se pre-incubaron por 1 hora con DMEM, posteriormente se añadió NaCl 824 Osm por 20 min a las células donde así se indica. Se aisló el RNA por el método de TRIzol® Reagent (ambion, No. 15596-026 y 15596-018), y se aplicaron a kits miScript Primer Assays QIAGEN. En la figura se muestran los niveles de expresión de diferentes miRs en células GFP control (Gc), en células GFP sometidas a estrés salino (GNa), células PKD control (Pc) y en células PKD sometidas a estrés salino (PNa).

Por otro lado, los estados de fosforilación basales son diferentes entre las células, dado que en las células GFP la fosforilación es prácticamente nula, mientras que en las células PKD se observa una banda tenue. Esto evidencia que la sobre-expresión de PKD1 por sí sola genera una activación basal.

Posteriormente se quisieron evaluar los niveles de expresión de diferentes microRNAs al estimular las células PKD y GFP con estrés salino. La figura 2 muestra los niveles de expresión de éstos miRs en células PKD y GFP sometidas a estrés salino.

El miR-27a pertenece al grupo de miRs donde la activación de la PKD1 por el estrés salino reduce su expresión, esto tanto en las células PKD como en células GFP. Podemos observar en el caso específico del miR-27a, que en las células PKD sometidas a estrés salino la expresión se reduce un 58% con respecto al valor basal. En las células GFP sometidas a estrés salino, la expresión se reduce un 32% con respecto al basal. También cabe destacar que el miR-27a es uno de los microRNAs que tienen mayores niveles de expresión en los fibroblastos 3T3, comparado con la expresión de los otros miRs que se encuentran dentro del grupo que disminuyen su expresión ante el estrés salino.

Genes asociados a APOPTOSIS	Genes asociados a AUTOFAGIA
Btf3: basic transcription factor 3	Map1lc3b: microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
Pawr: PBAC, apoptosis, WT1, regulator	Herc1: HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 1
Skil: SKI-like proto-oncogene	Wdly3: WD repeat and FYVE domain containing 3
Rassf5: Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5	
Sap18: Sin3-associated polypeptide 18	

Figura 3. Blancos del miR-27a asociados a los procesos de apoptosis y autofagia. Se muestran algunos de los genes blanco del miR-27a previstos en la base de datos miRDB (32), los procesos a los que se encuentran asociados y por tanto sugerentes de regulación.

Para continuar se buscaron proteínas en diferentes bases de datos, que cumplieran dos requisitos: el primero es que sean blancos del miR27a. El segundo requisito es que estas proteínas deberán participar en vías de señalización que la PKD regula. Se encontró que varios de los genes blanco del miR-27a son proteínas que participan en la apoptosis y autofagia. Estas vías son blanco de la PKD. Por tal motivo, se decidió

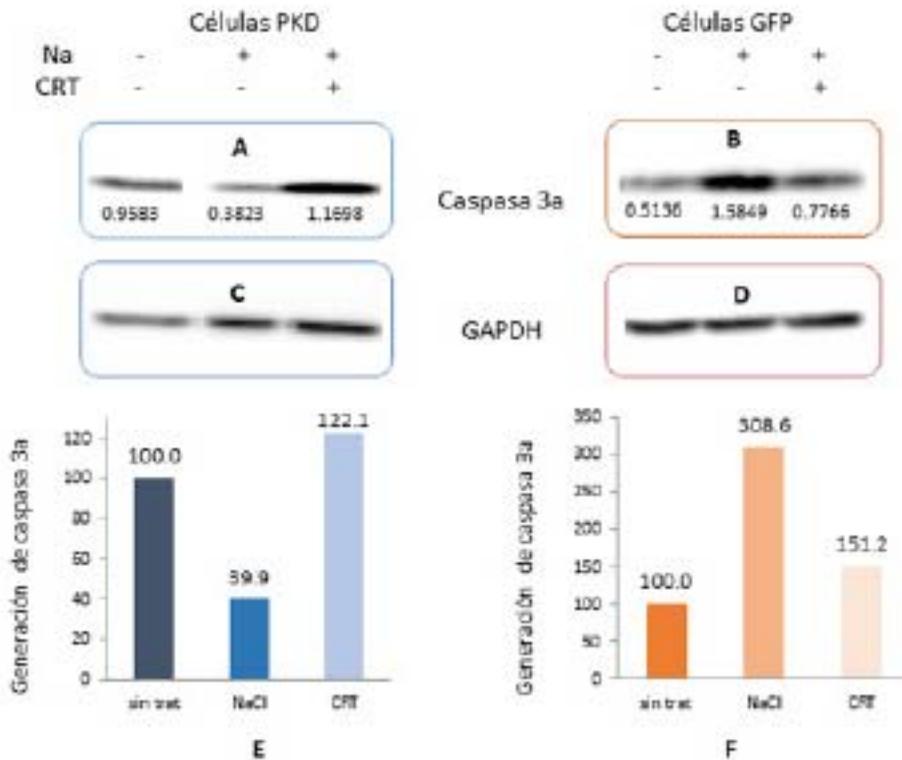


Figura 4. Activación de PKD1 inducido por estrés salino y su efecto en la generación de la caspasa 3 activa (marcador de apoptosis). En A y B se muestra la generación de la caspasa 3 activa en células PKD y células GFP respectivamente, además se muestran los valores de la relación Caspasa3a/GAPDH obtenidos a partir de la cuantificación de bandas medido con el programa Fujifilm Multi Gauge Software. C y D muestran la expresión de GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) usado como control de carga. En E y F comparan el efecto de la activación o inhibición de la PKD1 en células PKD y GFP sobre la generación de la caspasa 3a respecto al basal, los valores se expresan en porcentaje considerando a las células control como el 100%.

analizar los efectos ejercidos por la PKD sobre los procesos de apoptosis y autofagia. Considerando que los cambios generados por la diferente expresión de las proteínas participantes en la vía contribuirán al resultado final de la misma. Estas vías se miden por los cambios en las proteínas seleccionadas como se describirá en la sección correspondiente. La figura 3 muestra algunos genes blanco del miR-27a asociados a los procesos de apoptosis y autofagia. Los genes que se presentan tienen un puntaje mayor a las 75 unidades según la base de datos miRDB ⁽³²⁾.

En el caso de la apoptosis, se eligió al fragmento de la caspasa 3 activa (caspasa 3a) como objetivo de medición, porque es la proteína marcadora donde convergen las vías que disparan la apoptosis. Dado que estamos evaluando si la activación de PKD1 por estrés salino influye en el proceso de apoptosis, y como aún no se tiene claro en cuál de las dos vías de activación (intrínseca o extrínseca) podría estar participando, la caspasa 3a es entonces el marcador indicado.

El efecto que tiene la PKD1 activada por estrés salino sobre la generación de la caspasa 3 activa en células GFP y PKD, se muestra en la figura 4. Se puede observar en las células GFP (figuras 4B y 4F) que la generación de la caspasa 3a aumento tres veces sobre el basal, al estimularlas con estrés salino. Entonces la activación de la caspasa correlaciona con la activación aguda o de “bajo nivel” de la PKD1 y sugiere que tiene una función pro-apoptótica. Al inhibir a PKD1 con CRT

la generación de la caspasa 3a se redujo un 52%, confirmando una participación pro-apoptótica parcial.

En las células PKD (figuras 4A y 4E), la generación de la caspasa 3a por estrés salino estuvo por debajo del basal (39.9%), lo que sugiere que cuando hay una actividad elevada de PKD1, esta cinasa ahora tiene una función anti-apoptótica. Cuando se inhibió a PKD1, la generación de la caspasa 3a ahora si tuvo lugar por encima del valor basal (122%). Esto concuerda con que una baja actividad de PKD tiene función pro-apoptótica.

El segundo proceso en donde se evaluó el efecto de la activación de PKD1 por estrés salino fue en la autofagia. Por lo cual se eligió al marcador de autofagia LC3A/B, que es la subunidad de cadena ligera-3 asociada a microtúbulos 1A y 1B, presente en la membrana del autofagosoma. Esta estructura es característica de la autofagia ^(44, 49).

En la figura 5 se muestra el efecto que tiene la PKD1 activada por estrés salino sobre la expresión de la proteína LC3A/B. Inicialmente, podemos observar que la expresión basal de LC3A/B es mayor en las células PKD que en las células GFP. Lo que sugiere que la sobre-expresión de PKD estimula la autofagia.

Además, se observa que el estrés salino induce la disminución de la expresión de LC3A/B en las células GFP y PKD respecto a los valores basales.

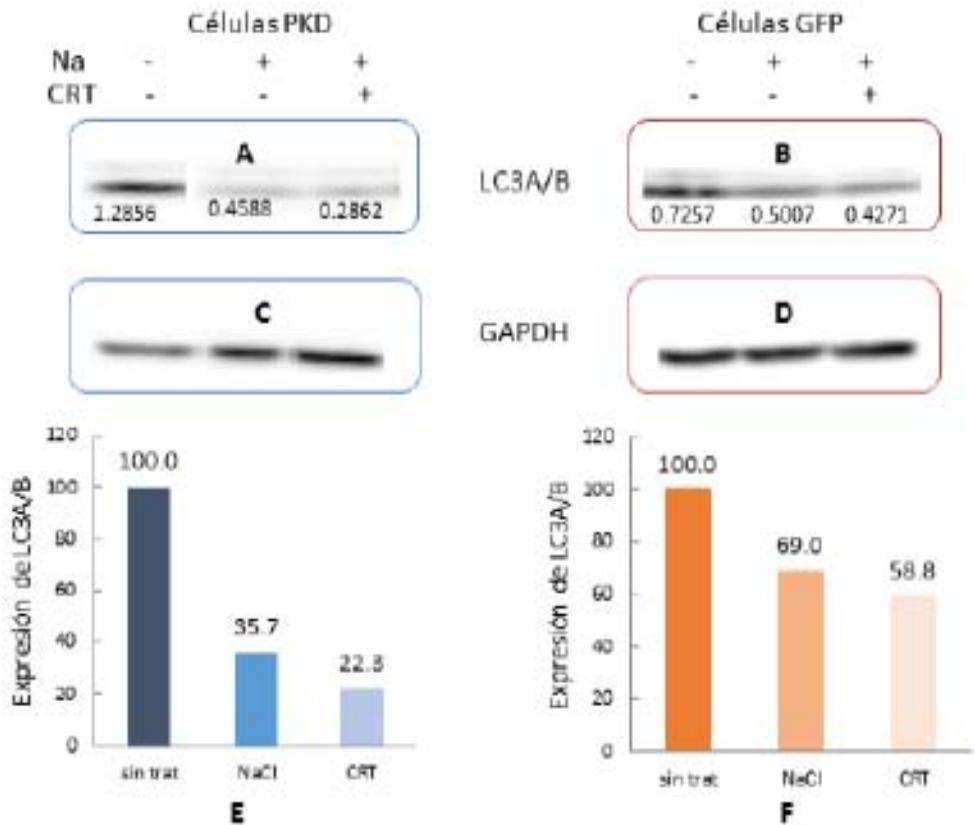


Figura 5. Activación de PKD1 inducido por estrés salino y su efecto en la expresión de la proteína de cadena ligera-3 asociada a microtúbulos (LC3A/B, marcador de autofagia). En A y B se muestra la expresión de LAC3A/B en células PKD y células GFP respectivamente, además de los valores de la relación LC3A/B/GAPDH obtenidos a partir de la cuantificación de bandas medido con el programa Fujifilm Multi Gauge Software. C y D muestran la expresión de GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) usado como control de carga. En E y F comparan el efecto de la activación o inhibición de PKD1 en células PKD y GFP sobre la expresión LC3A/B respecto al basal, los valores se expresan en porcentaje considerando a las células control como el 100%.

En el caso de las células GFP con NaCl (figuras 5B y 5F), la expresión de LC3A/B se redujo por debajo del basal (69%) y cuando se inhibió a la PKD1 con CRT, el efecto en la expresión de LC3A/B fue ligeramente más pronunciado (58.8% del basal).

En las células PKD (figuras 5A y 5E) la disminución en la expresión de LC3A/B fue más pronunciada, ya que al activar a PKD1 con estrés salino la expresión de LC3A/B se redujo al 35.7% del basal. Nuevamente, la inactivación de la PKD1 con CRT, disminuyó la expresión de LC3A/B incluso en la misma proporción (10-13%). Esto sugiere que el estímulo hiperosmótico afecta la expresión de LC3A/B, y la estimulación que tiene la PKD1 no correlaciona con el efecto hiperosmótico en la autofagia.

Con la intención de averiguar si la PKD1 activada por estrés salino interviene en la regulación de los procesos anteriores a través del miR-27a, se bloqueó al miR-27a en las células PKD y GFP. El bloqueo se realizó mediante la transfección de un antago-miR (ver métodos).

En las células con el miR-27a bloqueado, se activó a PKD1 con NaCl hiperosmolar y la activación de PKD1 se inhibió con CRT, para medir si donde hay participación de la PKD, esta es mediada o no por el miR.

El efecto que tiene la PKD1 sobre la expresión de la caspasa 3a al bloquear la actividad del miR-27a, se muestra en la figura 6. Se observa en las células GFP (figuras 6B y 6F) que cuando el miR-27a está bloqueado y la PKD1 se activa por estrés salino, la generación de la caspasa 3a disminuyó un 69%. Esto sugiere que el efecto pro-apoptótico de la PKD1 en las células GFP se abate con el bloqueo del miR27a.

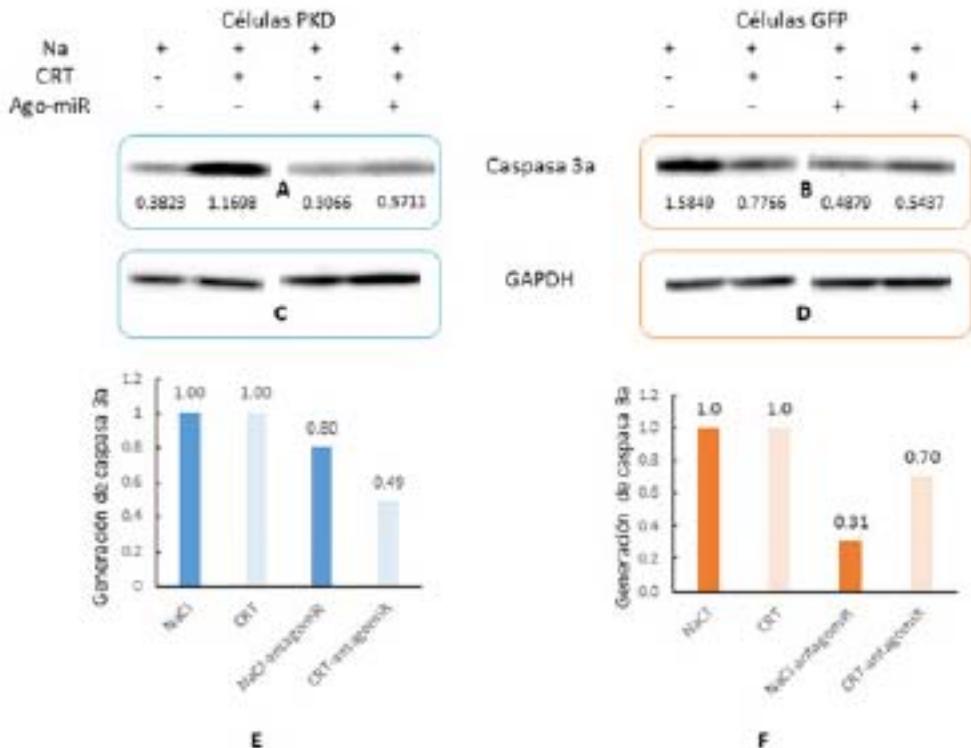


Figura 6. Regulación del miR-27a por la actividad de PKD1 inducida con estrés salino. En A y B se muestra la generación de la caspasa 3 activa en células PKD y GFP transfectadas con antago-miR y no transfectadas con antago-miR, respectivamente, además se muestran los valores de la relación Caspasa3a/GAPDH obtenidos a partir de la cuantificación de bandas medido con el programa Fujifilm Multi Gauge Software. En C y D se muestra la expresión de GAPDH en células PKD y GFP con antago-miR y sin antago-miR. Los gráficos E y F comparan la generación de la caspasa 3a para las células PKD y GFP transfectadas con antago-miR contra las no transfectadas, los valores se expresaron como el número de veces que aumenta o disminuye la generación de caspasa 3a considerando a las células control sin antago-miR como 1.

Mientras tanto, cuando el miR-27a está bloqueado y la PKD1 estimulada por estrés salino se inhibe con CRT, el efecto anti-apoptótico disminuye (se observa un aumento de la caspasa 3a, de 31% a 70%). Estos datos sugieren que los efectos pro-apoptóticos de la PKD1 activa a niveles “bajos”, son mediados por el miR-27a, pues al eliminarlo ahora

la PKD1 puede ser anti-apoptótica, semejante a cuando tiene un estado activo “alto”.

Por otro lado, en las células PKD (figuras 6A y 6E) si el miR-27a es bloqueado y la PKD1 se activa por estrés salino, la generación de la caspasa 3a disminuye solo un 20% en relación a las células PKD estimuladas con NaCl. Estos resultados refuerzan la noción de que la activación de la PKD1 contrapone el efecto pro-apoptótico del miR-27a. Entonces al eliminar el efecto pro-apoptótico de miR-27a, la PKD1 activa ya no tiene el efecto fuerte para antagonizar.

El efecto que tiene la PKD1 sobre la expresión de LC3A/B al bloquear el miR-27a en las células PKD y GFP se muestra en la figura 7. Particularmente en las células GFP (figuras 7B y 7F) cuando el miR-27a se bloqueó y la PKD1 se estimuló por estrés salino, la expresión de LC3A/B aumentó 86% respecto a la expresión de LC3A/B en células con el miR-27a presente.

En el caso de las células GFP sin miR-27a y PKD1 inhibida, la expresión de LC3A/B aumentó más de 2 veces, respecto a la expresión de LC3A/B en células GFP con el miR-27a presente. Estos resultados sugieren que ante una baja estimulación de PKD1 la disminución de la autofagia es mediada por el miR-27a, pues al eliminarlo la autofagia incrementó, y este efecto se amplifica si se inhibe a PKD1.

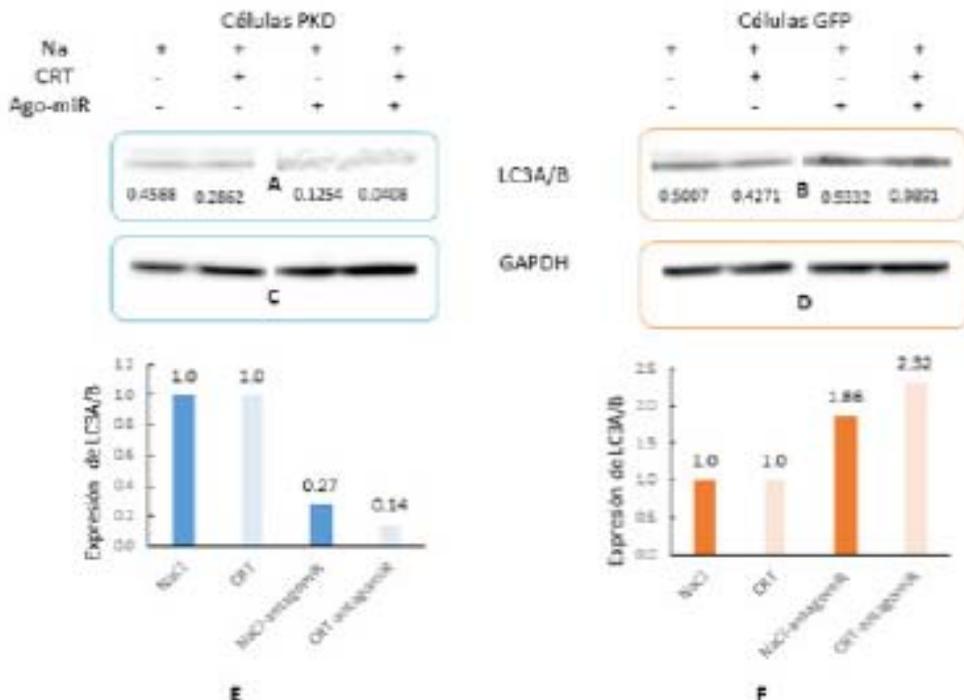


Figura 7. Regulación del miR-27a por la actividad de PKD1 inducida por estrés salino. A y B muestra la expresión de LC3A/B en células PKD y GFP con antago-miR y sin antago-miR respectivamente, además de los valores de la relación LC3A/B/GAPDH obtenidos a partir de la cuantificación de bandas medido con el programa Fujifilm Multi Gauge Software. En C y D se muestra la expresión de GAPDH en células PKD y GFP con antago-miR y sin antago-miR. Los gráficos E y F comparan la expresión de LC3A/B en las células PKD y GFP transfectadas con antago-miR contra las no transfectadas, los valores se expresaron como el número de veces que aumenta o disminuye expresión de LC3A/B considerando a las células control sin antago-miR como 1.

Por otro lado, cuando el miR-27a es bloqueado en las células PKD (figuras 7A y 7E), se observa que al activar a PKD1 por estrés salino, la expresión de LC3A/B disminuye un 73% respecto a la expresión en las células PKD que tienen al miR-27a y la PKD1 activos. Mientras que en las células PKD sin miR-27a y con PKD1 inhibida, la expresión de LC3A/B disminuyó 86% respecto a las células PKD que tienen el miR-

27a activo y PKD inhibida. Entonces una elevada actividad de PKD1 sumado a la ausencia del miR-27a induce la disminución de la autofagia, aún más que cuando el miR-27a se encuentra activo en la célula. Por otro lado, se observa que al inhibir la activación de la PKD1 el efecto se amplía, independientemente de si el miR-27a se encuentra presente o no. Es decir que, en células con baja actividad de PKD1 se estimula la autofagia mediada por el miR-27a. Mientras que una elevada actividad de la PKD1 hace más pronunciada la disminución de la autofagia en ausencia del miR-27a.

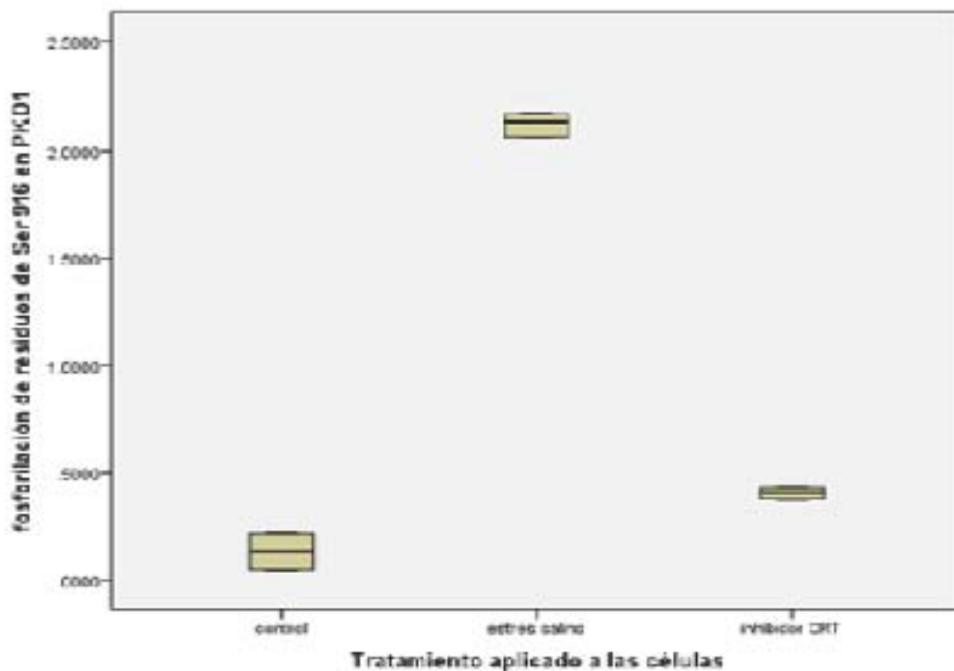


Figura 8. Variación de medias de la fosforilación de residuos de Serina 916 de células PKD y GFP ante el estrés salino. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado, utilizando una ANOVA de un factor con un intervalo de confianza de 95%.

Los resultados del análisis (figura 8) muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa (significancia de 0.001) entre las medias de la fosforilación de residuos de Serina 916 de células PKD y GFP, ante los tratamientos aplicados a cada una de ellas.

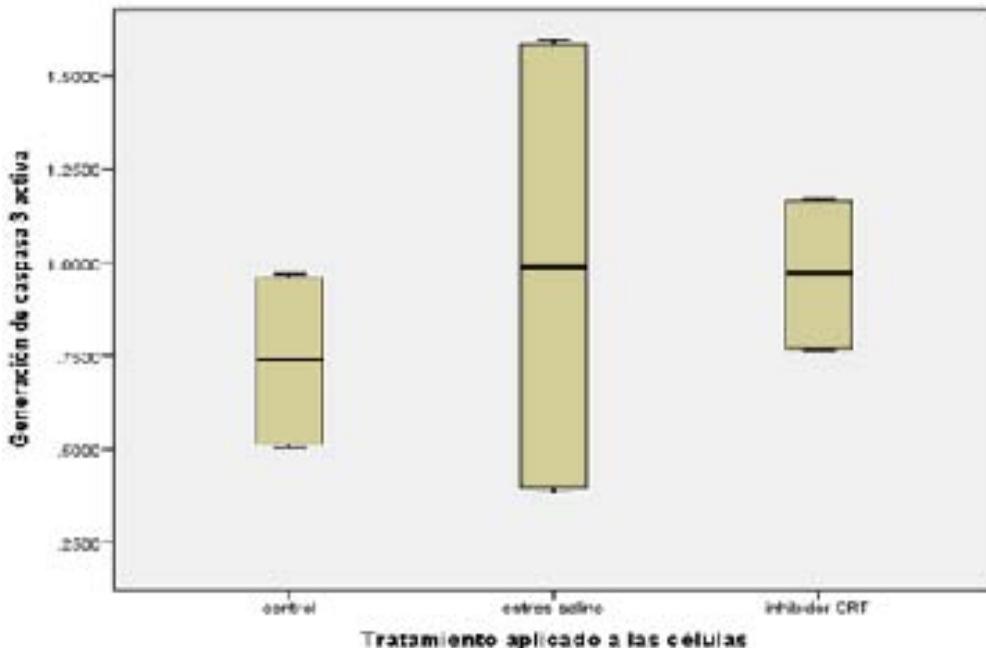


Figura 9. Variación de medias de la generación de la caspasa 3 activa en células PKD y GFP, como resultado de la activación de PKD1 inducido por estrés salino. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado, utilizando una ANOVA de un factor con un intervalo de confianza de 95%.

Los resultados del análisis estadísticamente hablando (figura 9), muestran que no existe diferencia significativa entre las medias de la generación de la caspasa 3 activa en células PKD y GFP, ante los tratamientos aplicados a cada una de ellas, ya que la significancia de las medias es mayor a 0.05.

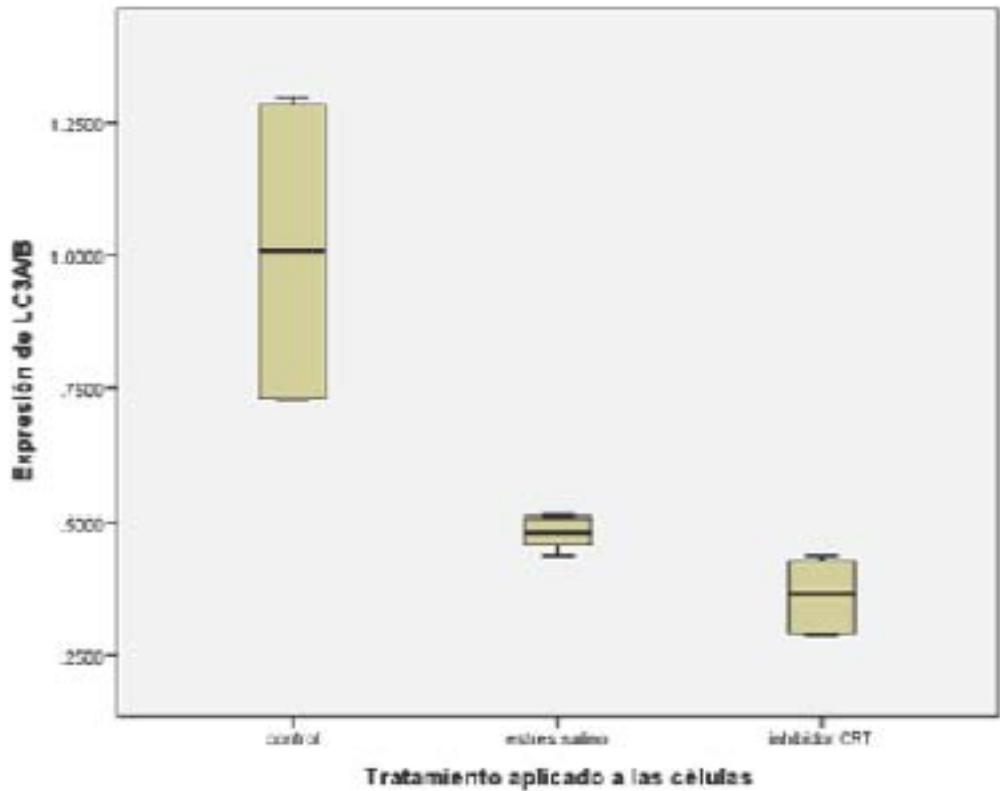


Figura 10. Variación de medias de la expresión de la proteína LC3A/B en células PKD y GFP, como resultado de la activación de PKD1 inducido por estrés salino. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado, utilizando una ANOVA de un factor con un intervalo de confianza de 95%.

Por otro lado, en la figura 10, el análisis muestra que estadísticamente hablando existe una diferencia significativa de la expresión de la proteína LC3A/B en las células PKD y GFP, ante los tratamientos aplicados a cada una de ellas, ya que la significancia de las medias es menor a 0.05, con un valor de 0.001.

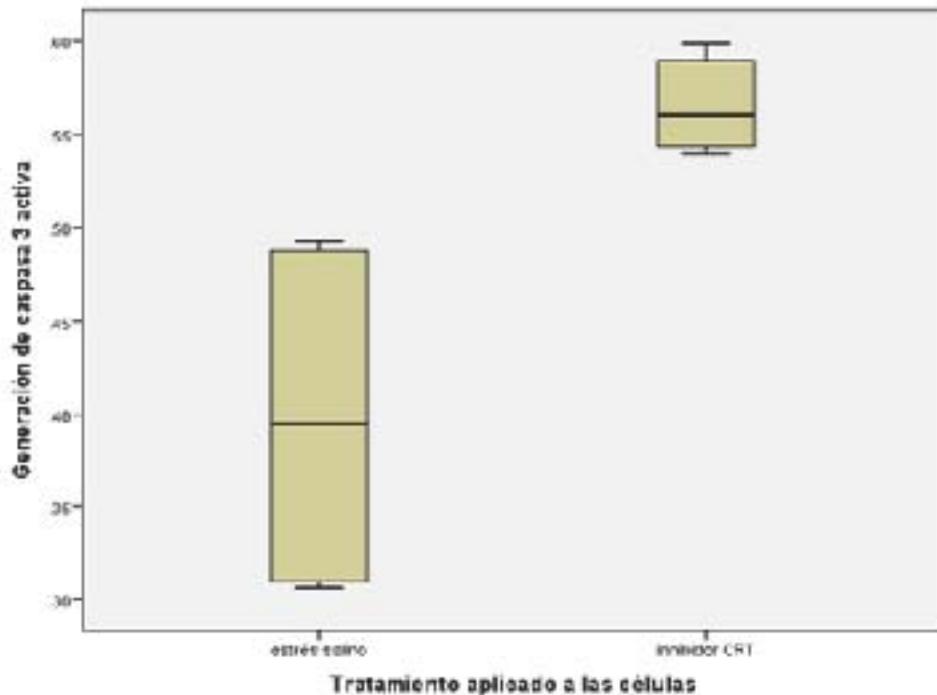


Figura 11. Variación de medias de la generación de la caspasa 3 activa en células PKD y GFP transfectadas con antago-miR-27a, como resultado de la activación de PKD1 inducido por estrés salino. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado, utilizando una T de Student para muestras independientes con un intervalo de confianza de 95%.

El análisis estadístico para la generación de caspasa 3a en células PKD y GFP transfectadas con antago-miR-27a (figura 11), indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con una significancia del 0.002.

Finalmente, el análisis estadístico para la expresión de la proteína LC3A/B en las células PKD y GFP transfectadas con antago-miR-27a (figura 12), indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con una significancia mayor al 0.05.

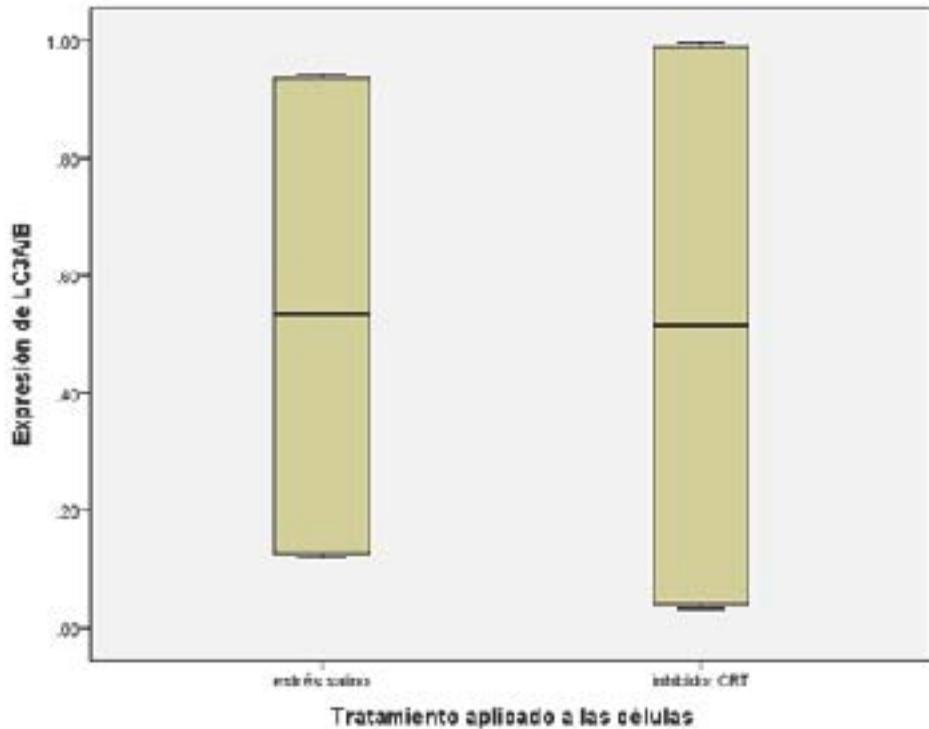


Figura 12. Variación de medias de la expresión de la proteína LC3A/B en células PKD y GFP transfectadas con antago-miR-27a, como resultado de la activación de PKD1 inducido por estrés salino. El análisis estadístico fue realizado con el programa IBM SPSS Statics versión 20. Los datos provienen de la cuantificación de bandas realizada por triplicado, utilizando una T de Student para muestras independientes con un intervalo de confianza de 95%.

VIII. DISCUSIÓN

La proteína cinasa D (PKD) pertenece a una familia de proteínas Serina/Treonina cinasas altamente conservadas evolutivamente, que tiene lugar en las vías de transducción de señales iniciadas por DAG y PKC ^(33, 34). La PKD1 es la isoforma más estudiada de esta familia, y se sabe que en células no estimuladas PKD1 se encuentra en un estado de baja actividad catalítica ^(7, 35, 36). Con lo anterior en mente se propuso estudiar el efecto que tiene el estrés salino sobre la actividad catalítica de la PKD1 en fibroblastos 3T3 que presentan niveles basales de esta proteína y en otros que la sobre-expresan.

Posteriormente, se quiso saber si existe alguna relación entre la actividad de PKD1 y la expresión del miR-27a, debido a que los microRNAs regulan la expresión de genes a niveles post-transcripcionales. Puesto que hasta ahora se desconoce cómo es que la PKD participa en los procesos a los que ha sido involucrada, una manera de hacerlo podría ser a través de la regulación de la expresión de diferentes microRNAs. Por esto es que se midió la expresión del miR-27a ⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Los resultados mostraron que el estrés salino sí induce la activación de la proteína PKD1 por auto-fosforilación de residuos de Serina en la posición 916. Cuando las células GFP y PKD se sometieron al estrés salino se observó claramente un aumento en la fosforilación de

PKD1, asimismo, el inhibidor CRT bloqueó la fosforilación en un 80%. Esto confirma que el inhibidor CRT tiene una alta afinidad por la familia de las PKDs, y en consecuencia, que el estrés salino efectivamente induce la activación de la proteína PKD1 por auto-fosforilación en los residuos de Ser916 ⁽³⁰⁾. No obstante, aún no se sabe cómo es que éste estímulo puede activar la vía de señalización de PKD1 en los fibroblastos 3T3.

Un evento a destacar es, que al parecer la sobre-expresión de la PKD1 induce su auto-fosforilación en los fibroblastos 3T3, como se observó en las células PKD control, donde a pesar de no recibir estímulo alguno, su estado de fosforilación basal era mayor al de las células GFP control. Esto es importante porque, en células no estimuladas la PKD1 debería de estar en un estado de baja actividad catalítica, como se había mencionado antes, pero al parecer un exceso de PKD1 en la célula puede inducir ligeramente su auto-fosforilación. Este hecho se tomó en cuenta al evaluar los procesos celulares subsecuentes.

Consecutivamente, se observó que la activación de la PKD1 por estrés salino reduce la expresión de diferentes miRs. En el caso del miR-27a, los resultados indican que la PKD1 inhibe su expresión, y en consecuencia, podría estar participando en la regulación de los procesos que han relacionado al miR-27a.

Al evaluar el efecto de la activación de la PKD1 por estrés salino sobre la generación de la caspasa 3a, se observó que la proteína PKD1 tiene actividad anti-apoptótica cuando se sobre-expresa, pero posee actividad pro-apoptótica cuando se encuentra a “niveles” normales en los fibroblastos 3T3. Cuando la PKD1 se encuentra a niveles “bajos” en las células PKD, ésta posee actividad pro-apoptótica como en el caso de las células GFP, dado que los niveles de fosforilación en éstos dos casos son semejantes, los niveles de PKD1 activa entonces son equivalentes.

Lo anterior sugiere que la PKD1 tiene una actividad dual en la regulación de la apoptosis y que su acción está condicionada por la cantidad de PKD1 disponible en la célula. Esto es, que la baja actividad de PKD1 tiene un efecto pro-apoptótico (hasta 9.8 veces de la actividad basal), mientras que una elevada activación de esta cinasa es anti-apoptótica (hasta 45 veces de la actividad basal). Esto cuando el estímulo que induce su fosforilación es el estrés salino, ya que se debería analizar si otro tipo de estímulo induce una respuesta diferente en la apoptosis de los fibroblastos 3T3.

Estos resultados se anteponen en cierta parte con lo mencionado en estudios anteriores, en donde mencionan que la PKD está implicada en la regulación de la sobrevivencia celular y en la inhibición de la apoptosis, ya que demostraron que la PKD inhibe la apoptosis en células

de cáncer cérvico-uterino (HeLa cells) a través de la modulación de las vías del factor NF- κ B y c-Jun-N terminal cinasa (JNK) ^(12, 14, 22). Esto quiere decir, que el efecto de la PKD1 no solo estaría condicionado por su concentración en la célula, sino también por el tipo de célula en la que se estuviera evaluando el proceso.

Sumado a lo anterior, al investigar si la actividad de la PKD1 sobre la vía de la apoptosis se relaciona con la expresión del miR-27a, se observó que la activación de la PKD1 se contrapone al efecto pro-apoptótico del miR-27a. Dado que en ambos modelos celulares al eliminar el efecto pro-apoptótico del miR-27a e inhibir la activación de la PKD1, el fragmento de la caspasa 3 aumenta moderadamente, esto quiere decir que al bloquear al miR-27a, la PKD1 ya no tiene efecto fuerte para antagonizar; sugiriendo que uno de los mecanismos de señalización posteriores a la activación de la PKD1 en el proceso de apoptosis, podría estar mediado por el miR-27a a través de la regulación de su expresión.

Analizando en conjunto los resultados, parece ser que cuando la PKD1 se encuentra activa a niveles “bajos” o “normales” en los fibroblastos 3T3, ésta no interacciona directamente con el miR-27a, y por lo tanto la cinasa no inhibe su efecto pro-apoptótico; no obstante, al sobre expresarse la PKD1 activada en los fibroblastos 3T3, ahora ésta inhibe el efecto pro-apoptótico del miR-27a.

En estudios previos se ha mencionado, que el miR-27a es oncogénico en múltiples tipos de cáncer, porque promueve el crecimiento de tumores y la metástasis, y se ha indicado que promueve la apoptosis por la vía mitocondrial, sugiriendo que el blanco potencial del miR-27a es Apaf-1 de la vía intrínseca de la apoptosis ⁽⁴⁰⁾. Esto quiere decir que la PKD1 puede estar regulando la apoptosis desde diferentes vías, a través de la regulación de la expresión de otros micro-RNAs o directamente por fosforilación, pues como se dijo antes, PKD1 modula la activación del factor NF- κ B, una proteína que promueve la proliferación celular.

Para analizar los resultados relacionados con la autofagia, es importante señalar que la autofagia es un proceso homeostático que se da en respuesta al estrés metabólico y falta de nutrientes, donde a partir de la degradación de organelos o la célula completa, se generan aminoácidos para la síntesis de proteínas ^(41, 44).

Ahora, al evaluar la expresión de LC3A/B en ambos modelos celulares (células PKD y GFP), se observó que el estímulo hiperosmótico afecta la expresión de este marcador, en consecuencia, no se aprecia que la actividad de la PKD1 correlacione con el proceso de autofagia. Esto se antepone a lo mencionado en estudios previos donde sugieren que la PKD1 junto con Akt/PKB regulan la actividad cinasa de mTor, por lo cual se esperaba que la activación de PKD1 y Akt/PKB indujeran un

aumento en la actividad de mTor inhibiendo de esta manera la autofagia ⁽⁴²⁾. Por consiguiente, se esperaba que al inhibir a la PKD1 la autofagia aumentara, dado que la actividad de mTor se vería reducida, y entonces el estrés osmótico generado debería inducir la autofagia.

No obstante no ocurrió así, y esto puede deberse a que el mantener la isotonicidad celular es un requisito fundamental para la sobrevivencia. Cuando una célula se expone a estrés osmótico, ésta activa diferentes mecanismos osmoprotectores para garantizar su sobrevivencia, uno de ellos ocurre cuando existe una acumulación de electrolitos fuera de la célula (como en el estrés salino), ante esto la célula pierde agua rápidamente para igualar las presiones osmóticas, a través del proceso de regulación de volumen incrementado (RVI). A pesar del proceso RVI, la acumulación de iones y la agregación molecular desestabilizan la estructura secundaria de las proteínas, es decir, que el daño de proteínas y la formación de agregados se produce por la exposición al estrés hipertónico ⁽⁴³⁾.

La degradación de proteínas mal plegadas o dañadas se realiza principalmente por el Sistema Ubiquitin proteasoma (UPS), mientras que en la vía de la autofagia es responsable de la degradación de proteínas de vida larga, agregados macromoleculares, y organelos citoplasmáticos dañados ⁽⁴⁴⁾. Durante la degradación en el UPS, las

proteínas desnaturalizadas son reconocidas por la proteína CHIP que realiza la ubiquitinación, posteriormente la proteína ubiquitinizada se integra al proteasoma, donde es degradada por proteólisis ⁽⁴⁵⁾.

Lo anterior sugiere que la activación de la PKD1 en fibroblastos 3T3 no se relaciona con el proceso de autofagia, porque el estrés osmótico que genera el estímulo hiperosmótico, induce la desnaturalización de proteínas, y la vía encargada de la degradación de éstas proteínas mal plegadas es el Sistema Ubiquitin proteasoma. Por lo cual, se sospecha que si una vía osmoprotectora ya está activada, la otra vía se ve inhibida. La disminución en la expresión de LC3A/B en ambos modelos celulares, puede deberse principalmente a que los fibroblastos han iniciado un mecanismo de muerte celular inducido por el estrés hiperosmótico.

Por otra parte, al bloquear la expresión del miR-27a, se observó en las células con baja actividad de PKD1 que la autofagia aumenta, mientras que una elevada actividad de la PKD1 hace más pronunciada la disminución de la autofagia. Esto sugiere que el miR-27a probablemente no está relacionado con el papel que la PKD1 juega en ésta vía, pero de algún modo, el bloquearlo permite observar que a bajas concentraciones de PKD1 la autofagia se ve aumentada, pero si la PKD1 se sobre expresa entonces la autofagia se inhibe casi por completo.

IX. CONCLUSIONES

El estrés salino puede activar a la PKD1 por auto-fosforilación en el residuo de Serina 916.

El miR-27a tiene actividad pro-apoptótica en los fibroblastos 3T3, y la PKD1 puede contrarrestar el efecto pro-apoptótico del miR-27a cuando se tiene una elevada actividad de ésta cinasa.

El miR-27a participa en la autofagia por un mecanismo independiente de PKD1.

X. PERSPECTIVAS

Dado que se observó que la actividad de la PKD1 fue diferente en los procesos evaluados dependiendo de sus niveles de fosforilación, ahora se podría probar si al variar las concentraciones de NaCl, la activación de la PKD1 por auto-fosforilación de Serina 916 cambia en los fibroblastos 3T3.

El miR-27a tiene actividad pro-apoptótica y la PKD solo interfiere con esta acción cuando se encuentra sobre expresada, entonces podría evaluarse este modelo, pero ahora en células tumorales. Esto permitiría conocer si el miR-27a tiene la capacidad de detener la proliferación celular, y en consecuencia detener el crecimiento de tumores.

XI. REFERENCIAS

1. Rozengurt E, Rey O and Waldron RT. Protein Kinase D Signaling: Multiple Biological Functions in Health and Disease. *Physiology*. 2011; 26: 23-33.
2. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [internet] France: Jean-Loup Huret; 2012 [actualizado el 16 de noviembre del 2015; citado el 16 de noviembre del 2015] Disponible en: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR27A.html.
3. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 390: 247-251.
4. Musto A, Navarra A, Vocca A, et al. miR-23a, miR-24 and miR-27a protect differentiating ESCs from BMP4-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2015; 22:1047-1057.
5. Wang Y, Zhao Y, Sun C, et al. Chitosan Degradation Products Promote Nerve Regeneration by stimulating Schwann cell proliferation via miR-27a/FOXO1 Axis. *Mol Neurobiol*. 2014; 1: 1-12.
6. Rejas J, Fidalgo LE, and Goicoa A. Aplicaciones de fluidos en veterinaria. Valencia: Consulta de Difusión Veterinaria. 2011.
7. Rozengurt E, Rey O, and Waldron RT. Protein kinase D signaling. *J Biol. Chem*. 2005; 280: 13205–13208.
8. Rey O, Yuan J, Young S, and Rozengurt E. Protein Kinase C α /Protein

Kinase D3 Nuclear Localization, Catalytic Activation, and Intracellular Redistribution in Response to G Protein-coupled Receptor Agonists. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 23773-23785.

9. Sokha N. Protein Kinase D signaling through substrate phosphorylation. Cambridge: Harvard University, 2009.

10. Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, et al. Protein Kinase D Regulates the Fission of Cell Surface Destined Transport Carriers from the Trans-Golgi Network. *Cell.* 2001; 104: 409-420.

11. Nichols CB, Chang CW, Ferrero M, et al. β -Adrenergic Signaling Inhibits Gq-Dependent Protein Kinase D Activation by Preventing Protein Kinase D Translocation. *Circ Res.* 2014; 114: 1398-1409.

12. Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27:317-323.

13. Bagowski CP, Stein-Gerlach M, Choidas A and Ullrich A. Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor. *EMBO J.* 1999; 18: 5567–5576.

14. LaValle CR, George KM, Sharlow ER, et al. Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *BBA-Rev. Cancer.* 2010; 1806:183-192.

15. George KM, Frantz MCL, Bravo-Altamirano K, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of PKD inhibitors. *Pharmaceutics.* 2011; 3:186-228.

16. Woods AJ, White DP, Caswell PT and Norman JC. PKD1/PKC μ promotes $\alpha\beta$ 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J.* 2004; 23: 2531-2543.

17. Wong C and Jin ZG. Protein Kinase C-dependent protein Kinase D activation modulates ERK signal Pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2005; 280: 33262-33269.

18. Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, et al. PKC μ prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumor cells. *Oncogene.* 2003; 22: 8939-8947.

19. Wang Y, Waldron RT, Dhaka A, et al. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 916–926.

20. Hurd C, Waldron RT and Rozengurt E. Protein Kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene.* 2002; 21: 2154-2160.

21. Mottet D, Bellahcene A, Pirotte S, et al. Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis. *Circ Res.* 2007; 101: 1237–1246.

22. Storz P, Doppler H and Toker A. Protein kinase C δ selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF- κ B in oxidative stress signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 2614–2626.

23. Cai Y, Yu X, Hu S and Yu J. A Brief Review on the Mechanism of miRNA regulation. *GBP*. 2009; 7: 147-154.

24. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, et al. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem*. 2011; 67: 129-139.

25. Ha M and Kim NV. Regulation of microRNA biogenesis. *Mol Cell Bio*. 2014; 15: 509-524.

26. Smirnova L, Grafe A, Seiler A, et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*. 2005; 21: 1469-1477.

27. Zhang Z, Liu S, Shi R, and Zhao G. miR-27 promotes human gastric cancer cell metastasis by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Genet*. 2011; 204:486–491.

28. Velarde-Buendía AM. Modulación del transporte iónico por poliamidas y especies reactivas de oxígeno y su posible impacto en la respuesta de plantas al estrés salino. [Tesis] Colima: Universidad de Colima; 2009.

29. Torres-Marquez E, Sinnott-Smith J, Guha S, et al. CID755673 enhances mitogenic signaling by phorbol esters, bombesina and EGF through a protein kinase D-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 391: 63-68.

30. Matthews SA, Rozengurt E, and Cantrell. Characterization of Serine 916 as an in vivo Autophosphorylation Site for Protein Kinase D/ Protein Kinase C μ . *J Biol Chem*. 1999; 274: 26543-26549.

31. Livak K and Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *METHODS*. 2001; 25: 402-408.

32. Nathan Wong and Xiaowei Wang (2015) miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*. 43 (D1): D146-152.

33. Zhukova E, Sinnett-Smith J and Rozengurt E. Protein Kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*. 2001; 276: 40298-40305.

34. Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 317-323.

35. Valverde AM, Sinnett-Smith J, Van Lint J and Rozengurt E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: A target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994; 91: 8572–8576.

36. Sturany S, Van Lint J, Gilchrist A, et al. Mechanism of activation of protein Kinase D2 (PKD2) by the CCKB/Gastrin receptor. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 29431–29436.

37. Dong H, Lei J, Ding L, et al. MicroRNA: Function, Detection and Bioanalysis. *Chem Rev*. 2013; 113: 6207–6233.

38. Li C, Feng Y, Coukos G, and Zhang L. Therapeutic microRNA

strategies in human cancer. *AAPS J.* 2009; 11: 747- 757.

39. Shenouda SK and Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28: 369–378.

40. Zhou S, Huang Q, Zheng S, et al. miR-27a regulates the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin treatment via BAK-SMAC/DIABLO-XIAP axis. *Tumor Biol.* 2015; 1: 1-9.

41. Su Z, Yang Z, Xu Y, et al. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget.* 2015; 6: 8474-8490.

42. Criollo-Caspedes AG. Regulación de la autofagia por el receptor del inositol trifosfato (IP3R) [tesis doctoral]. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2009.

43. Nunes P, Hernandez T, Roth I, et al. Hypertonic stress promotes autophagy and microtubule-dependent autophagosomal clusters. *Autophagy.* 2013; 9: 550-567.

44. Kuma A, Matsui M and Mizushima N. LC3, an Autophagosome Marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy.* 2007; 3: 323-328.

45. Goldberg A. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003; 426: 895-899.

46. LaValle CR, George KM, Sharlow ER, et al. Protein kinase D as a

potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1896: 183-192.

47. Durand N, Borges S, and Storz P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci*. 2015; 72: 4369-4382.

48. neXtProt BETA. [base de datos en internet]. Switzerland: SIB Swiss Institute of Bioinformatics and Geneva Bioinformatics (GeneBio) SA; 2008, [actualizado en 2011; fecha de consulta: Enero 15, 2016]. Disponible en: http://www.nextprot.org/db/entry/NX_P60510/function

49. Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Jenkins B, et al. Functional expression cloning reveals proapoptotic role for protein phosphatase 4. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 1016-1024.

50. QIAGEN [sitio web] United States of America: SABiosciences, a QIAGEN company; 2000, [actualizado en 2012; fecha de consulta: Febrero 12, 2016]. Disponible en: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Cellular_Apoptosis_Pathway